Тороповский А.Н.[1], Никитин А.Г.[2], Маркелова А.Н.[3], Тюмина О.В.[1,3]

Неинвазивная диагностика резус-фактора плода по крови беременной

1ГБУЗСО «Клинический центр клеточных технологий»
2ФГУП «ГосНИИ генетика»
3ГОУ ВПО СамГМУ Росздравразвития России

Несовместимость по резус-фактору – одна из самых частых причин гемолитической болезни новорожденных. Однако преодолеть нежелательные реакции во время беременности и родов возможно при использовании анти-резус иммуноглобулина. В случае, если отец гетерозиготен по гену RHD, а мать резус-отрицательна, существует 50% вероятность, что ребенок будет резус-положительным. Пренатальная диагностика RHD-статуса в этих случаях имеет исключительную важность, потому что при выявлении отрицательного резус-фактора плода дальнейшие анализы по определению титра антител и терапевтические процедуры становятся ненужными. Если же выявится резус-положительный плод, необходимо будет вести беременность с соответствующими предосторожностями и назначать анти-резус иммуноглобулин в целях профилактики [1,2].

Традиционно резус-фактор плода устанавливается при тестировании амниотической жидкости, ворсин хориона либо пуповинной крови. Однако, для получения материала для исследования необходимо проведение инвазивных процедур (биопсия хориона, амниоцентез либо кородоцентез). Эти процедуры являются довольно опасными, а, кроме того могут привести к повышению риска сенсибилизации матери. Для предотвращения этих рисков несколько групп исследователей изучали возможность определения RHD-статуса плода по фетальным клеткам, выделенным из крови беременной женщины. Главной проблемой такого подхода является сложность в получении достаточного количества клеток из крови беременной женщины. В ряде исследований показана возможность выделения растворенной фетальной ДНК из плазмы матери для проведения генетических тестов [3–6]. В настоящем исследовании для определения резус фактора плода мы использовали фетальную ДНК из плазмы крови беременной резус-отрицательной женщины.

Цель исследования

Оценить метод неинвазивной диагностики резус-фактора плода по крови беременной женщины с использованием новых диагностических наборов для идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери «ДНК-резус ребенка» производства ООО «Гентехнология» (Россия).

Материалы и методы

Для определения специфичности применяемых диагностических ПЦР систем мы использовали 10 образцов RHD-положительной и 10 образцов RHD-отрицательной свежезаготовленной пуповинной крови (резус-фактор был определен серологическим методом с использованием цоликлонов). Для определения диагностической ценности тест-системы мы использовали образцы крови ста беременных резус-отрицательных женщин объемом 5 мл. Двадцать женщин были в I триместре беременности (7–12 недель), тридцать восемь – во II триместре (13–24 недели) и 42 – в III триместре (25–40 недель). Кровь женщины сдавали либо при проведении стандартных обследований, либо целенаправленно для вступления в исследование. В каждом случае женщины подписывали информированное согласие.

Подготовка образца к исследованию

Образцы крови собирали в пробирки, содержащие EDTA в качестве антикоагулянта. Затем пробирки центрифугировали при 1600g в течение 10 минут и осторожно, не захватывая лейкоцитарный слой, отбирали плазму в 1,5 мл одноразовые микроцентрифужные пробирки. Далее плазму либо сразу использовали для выделения ДНК, либо хранили при температуре минус 40?С для последующего выделения.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из 1 мл плазмы, модифицировав протокол выделения, с использованием набора набором для выделения QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Объем раствора ДНК составлял 60 мкл

Выявление гена резус-фактора

Для выявления гена резус-фактора применялась ПЦР в реальном времени с использованием диагностических наборов для идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери «ДНК-резус ребенка» производства ООО «Ген-технология» (Россия, РУ № ФСР2010/09565). В целях контроля качества выделения ДНК использовался ген GAPDH (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы). Амплифицировались два экзона гена резус-фактора. Заключение о положительном резус-факторе плода делалось на основании прохождения реакции с GAPDH и двумя экзонами одновременно. Заключение об отрицательном резус-факторе делалось при прохождении ПЦР с GAPDH и отсутствии реакции в пробирках с экзонами гена резус-фактора.

Исследование выполнялось на амплификаторе BioRad IQ5 с детекцией в режиме реального времени.

Результаты

Для определения возможности применения диагностической системы на первом этапе мы использовали геномную ДНК, полученную из 20 резус-положительных и резус-отрицательных образцов пуповинной крови. Мы получили полное соответствие между полученными генетическими результатами и серологичесткими результатами.

Для определения чувствительности тест-системы мы использовали контрольную ДНК разведенную в в деионизованной воде и в выделенной из резус-отрицательных образцов геномной ДНК. Чем ниже была концентрация ДНК, тем больше циклов ПЦР требовалось для получения детектируемого количества флюоресцентных молекул (*рисунок 1*). Пределом чувствительности метода оказалась концентрация в 10 копий ДНК на мл.

Все 100 женщин, вступившие в исследование, были резус-отрицательными по результатам серологического анализа. Для 60 из них стал известен резус-фактор рожденного ребенка. Резус-фактор рожденных детей оценивался серологическим методом в роддоме. Результаты соотнесения генетического метода по крови матери и серологического представлены *в таблице 1*.

ДНК-анализ 37 образцов указал на положительный резус-фактор плода, в 23 случаях был установлен отрицательный резус-фактор. Результаты анализа были подтверждены анализом крови детей после их рождения. В одном случае результат анализа не совпал (при отрицательном резус-факторе по данным тест-системы фактический резус-фактор оказался положительным). Следует отметить, что срок беременности для этой пациентки составил 9 недель, в то время как минимальным сроком, гарантирующим правильность результатов анализа, является срок 10 недель. Следовательно, данный результат не может использоваться при оценке аналитических характеристик тест-системы. Таким образом, чувствительность и специфичность применяемого метода диагностики составила 100%.

Обсуждение полученных результатов

Успешно проведенное клиническое исследование нового метода диагностики доказывает возможность применения его в практике. Актуальность внедрения данной инновационной методики по раннему определению резус-фактора плода у резус-отрицательных беременных очевидна, т.к. она позволяет на раннем сроке беременности определить резус-принадлежность плода и таким образом выделить беременных, у которых резус-фактор плода и её собственный несовместимы. Такие женщины нуждаются на весь срок беременности в специальном медицинском наблюдении и профилактики резус-конфликта с целью исключения гемолитической болезни новорожденного.

Другая группа резус-отрицательных беременных, у которых в результате применения данной методики устанавливается, что плод также резус-отрицательный (а таких около 50% от общего числа), не нуждается в специальном медицинском наблюдении, т.к. резус-конфликт у них исключается.

При определении резус-фактор плода у резус-отрицательной беременной на ранних сроках решается сразу несколько проблем.

1. Психологическая – женщины, беременные резус-отрицательным плодом не будут волноваться о возможной патологии беременности;

2. Экономическая:

– в результате определения резус-отрицательного плода половине женщин не нужно будет регулярно сдавать анализы на определение титра антител (сейчас это делают все резус-отрицательные беременные 10–12 раз за беременность за счет государства);

– отсутствует необходимость в проведении профилактических мероприятий с использованием дорогостоящего препарата – антирезус-иммуноглобулина для всех резус-отрицательных беременных, тем самым в два раза уменьшается сумма выделяемых бюджетных средств или средств самих беременных женщин.

Новые диагностические наборы для идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери «ДНК-резус ребенка» производства ООО «Гентехнология» (Россия) можно рекомендовать для внедрения в медицинскую практику акушер-гинекологам для ранней неинвазивной диагностики резус-фактора плода по крови беременной женщины.

Таблица 1.

Результаты соотнесения генетического и серологического метода оценки резус-фактора по крови матери. Сопоставление резус-фактора рождённого ребенка с результатами ДНК-анализа

№	Срок беременности	Резус ребенка	Результат ДНК-анализа
1	39	+	+
6	25	+	+
7	39	+	+
9	39	+	+
11	35	+	+
14	32	+	+
15	неизвестно	+	+
16	23	+	+
18	24	+	+
23	27	+	+
25	9	+	–
27	23	+	+
28	10	+	+
31	12	+	+
33	28	+	+
34	29	+	+
36	13	+	+
39	29	+	+
41	23	+	+
45	13	+	+
48	18	+	+
49	18	+	+
51	19	+	+
53	33	+	+
55	22	+	+
56	22	+	+
58	20	+	+
61	29	+	+
68	38	+	+
69	34	+	+
71	38	+	+
78	20	+	+
82	24	+	+
85	15	+	+
90	40	+	+
91	17	+	+
93	12	+	+
105	33	+	+
8	39	–	–
10	32	–	–
19	34	–	–
20	24	–	–
21	19	–	–
22	10	–	–
24	неизвестно	–	–
26	12	–	–
29	19	–	–
30	13	–	–
35	18	–	–
38	33	–	–
43	32	–	–
66	30	–	–
67	25	–	–
73	35	–	–
74	38	–	–
76	19	–	–
77	20	–	–
79	21	–	–
80	25	–	–
88	32	–	–

Литература

1. Daniels G., Hadley A, Soothill P. Blood group antibodies in haemolytic disease of the fetus and newborn // Alloimmune disorders of pregnancy. University Press – 2002. p. 21–40
2. Lee AI, Kaufman RM. Transfusion medicine and the pregnant patient // Hematol Oncol Clin North Am. – 2011 Vol. 25, Issue 2, P. 393–413
3. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma // N Engl J Med – 1998 Vol. 339, P. 1734–1738
4. Moise KJ. Diagnosing hemolytic disease of the fetus-time to put the needles away ? // N Engl J Med – 2006 Vol. 355 P. 192–194.
5. Minon JM, Schaaps JP, Retz MC et al. Prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: two-years experience of routine clinical use. // J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) – 2005 Vol. 34 P. 448–453.
6. Minon JM, Gerard Ch., Senterre J.-M. et al. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium // Transfusion – 2008 P. 373–381