

УДК 618.3—06:616.15—097.34:612.118.221.2

Л.Р. Абдрахманова (Казань). Практическое применение определения резус-принадлежности и групп крови (ABO) молекулярно-генетическим методом при иммуноконфликтной беременности

С 1999 г. нами определяется резус-принадлежность плода по амниоцитам при резус-изоиммунизации молекулярно-генетическим методом. Всего проведено 24 таких исследования.

С целью пренатальной диагностики мы проводили амниоцентез у Rh(-) беременных с Rh-изоиммунизацией и высоким риском гемолитической болезни плода (ГБП) на сроке 20—37 нед. Для определения резус-принадлежности плода методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали ДНК амниоцитов. ПЦР осуществляли на два локуса: амплифицировали фрагмент ДНК RhCcEe и RhD генов размером 136 н.п. (7-й экзон) и фрагмент ДНК RhD гена размером 186 н.п. (10-й экзон). Для RhD-положительного генотипа характерно наличие продуктов амплификации размером 136 н.п. и 186 н.п., для RhD-отрицательного — только 136 н.п. Параллельно определяли относительную плотность билирубина в амниотической жидкости спектрофотометрическим методом. Резус-принадлежность новорожденного подтверждали после родов серологическим методом. У 17 плодов было установлено наличие 7 и 10-го экзона, у 7 — только 7-го. Данные молекулярной диагностики в 100% случаев совпадали с результатами постнатальных серологических исследований (см. табл.).

Нами выделены три группы риска при резус-изоиммунизации.

1-я группа (n=7). У беременных с относительной плотностью билирубина в околоплодных водах (ОПБОВ), составляющей ΔOD 450-0 (пологая кривая), и наличием Rh-отрицательной принадлежности крови плода по амниоцитам ПЦР-диагностикой обнаружен 7-й экзон. Таким образом, у данных беременных резус-изоиммунизации нет, и резус-антитела в крови сохранились от предшествующих беременностей и несовместимых гемотрансфузий. Беременным этой группы не требуется специфического лечения и преждевременного родоразрешения, роды возможны в срок без предварительного родовозбуждения. Прогностическая ценность ОПБОВ — 89,4%, определение резус-принадлежности плода по амниоцитам ПЦР-диагностикой — 100%.

2-я группа (n=12). У беременных, у которых ОПБОВ ΔOD 450-0 (пологая кривая) и определено наличие Rh-положительной принадлежности крови плода по амниоцитам ПЦР-диагностикой, обнаружены 7 и 10-й экзоны. Прогноз для беременных данной группы — послеродовая форма гемолитической болезни новорожденного. Показано плановое родоразрешение на доношенном сроке 37—40 нед. Прогностическая ценность ОПБОВ — 82,8%, определение резус-принадлежности плода по амниоцитам ПЦР-диагностикой — 100%.

3-я группа (n=15). У беременных с ОПБОВ (ΔOD 450) выше нормы и наличием Rh-положительной принадлежности крови плода по амнио-

Пре- и постнатальная диагностика резус-принадлежности плода и новорожденного

Срок беременности при амниоцентезе, нед	Резус-принадлежность плода по амниоцитам ПЦР-диагностикой	Резус-принадлежность новорожденного серологическим методом
33	Rh(+)	Rh(+)
36	Rh(+)	Rh(+)
35	Rh(+)	Rh(+)
35	Rh(-)	Rh(-)
35	Rh(-)	Rh(-)
31	Rh(-)	Rh(-)
12	Rh(-)	Rh(-)
(биопсия ворсин хориона)		
35	Rh(+)	Rh(+)
20	Rh(-)	Rh(-)
34	Rh(-)	Rh(-)
34	Rh(+)	Rh(+)
33	Rh(+)	Rh(+)
32	Rh(+)	Rh(+)
35	Rh(+)	Rh(+)
34	Rh(+)	Rh(+)
36	Rh(+)	Rh(+)
35	Rh(+)	Rh(+)
35	Rh(+)	Rh(+)
33	Rh(+)	Rh(+)
32	Rh(-)	Rh(-)
36	Rh(+)	Rh(+)
33	Rh(+)	Rh(+)
35	Rh(+)	Rh(+)
33	Rh(+)	Rh(+)

цитам ПЦР-диагностикой выявлен 7 и 10-й экзоны. Показано плановое преждевременное родоразрешение в течение недели после амниоцентеза в случае тяжелой степени ГБП (ΔOD 450=0,36—0,7) при достаточной зрелости плода, средней тяжести (ΔOD 450=0,23—0,35) на сроке 36—37 нед, легкой степени ГБП (ΔOD 450=0,16—0,22) на сроке 37—38 нед. Следовательно, прогноз для беременных данной группы — врожденная форма ГБП. Прогностическая ценность ОПБОВ — 80,6%, определение резус-принадлежности плода по амниоцитам ПЦР-диагностикой — 100%.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой корреляции между данными ПЦР-анализа и серологических методов. Высокая вероятность рождения Rh(-) ребенка от гетерозиготного Rh(+) отца делает необходимой пренатальную диагностику резус-принадлежности плода.

Существует подобная методика определения ABO генотипа (Носои Е., 1997) путем постановки ПЦР — ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) на ген А-трансферазы. Впервые в Казани в лаборатории генной диагностики (зав. — А.А. Зайнуллин) с помощью праймеров ABO в 2001 г. начато определение генотипа ABO супружеских пар (беременной и ее мужа) при риске ABO- и резус-изоиммунизации. Данный метод можно применять и для выявления ABO-принадлежности группы крови плода по амниоцитам при инвазивном методе диагностики — амниоцентезе, который используется при резус-изоиммунизации.

Приводим 2 собственных наблюдения беременных, у которых использовались молекулярно-генетические методы диагностики групп крови (ABO).

1. Х., 38 лет. Группа крови O(I) Rh(+), у мужа — A(II)Rh(+), гемотрансфузии отрицает. Из анамнеза: первая беременность закончилась срочными родами живой доношенной девочкой массой тела 3000 г, группой крови A(II)Rh(+). В неонатальном периоде у ребенка развилась послеродовая желтушная форма ГБН легкой степени по ABO-системе. При вторых родах также родилась живая доношенная девочка массой тела 3050 г и группой крови A(II) Rh(+): диагностирована послеродовая желтушная форма средней тяжести. Соответствующее лечение проведено без заменного переливания крови (ЗПК). Третья беременность закончилась миниаборт, четвертая — самопроизвольный аборт на сроке 8 нед. При пятой беременности на сроке 18 нед женщину направили на обследование в РКБ.

Выполнены изосерологические исследования крови беременной на антиА-агглютинины по эритроцитам мужа — 1:128(сол.)/1:128 (сыв.), иммунные 1:2, солевой титр 1:256 (норма — 1:256); на сроке 28 нед беременности — 1:128(сол.)/1:128 (сыв.) по эритроцитам мужа, иммунные 1:4, солевой титр 1:512; на сроке 33-34 нед беременности 1:64(сол.)/1:64 (сыв.) по эритроцитам мужа, иммунные 1:2, солевой титр 1:256, непрямая реакция Кумбса отрицательная и на сроке 37 нед 1:128(сол.)/1:128 (сыв.) по эритроцитам мужа. При изучении генотипа супружеской пары ПЦР реакцией получены следующие результаты: у беременной группа крови OO, у мужа — AA.

Таким образом, муж беременной гомозиготен по A(II) группе крови, отсюда возможно рождение ребенка с A (II) группой крови. С учетом предыдущих рождений детей с ABO-конфликтом прогноз гемолитической болезни у будущего ребенка был максимален. Проведен комплекс лечения, включающий метионин, фолиевую, глютаминовую и липоевую кислоты по одной таблетке 3 раза в день (курсы по 10 дней через месяц), энзимотерапию — вобэнзим по схеме в течение 7 дней, эссенциале по 2 капсулы 3 раза в день в течение 3 нед на сроке 30 нед. При УЗИ плода и плаценты на сроках 11—12 нед, 22—24 нед патологии плода не обнаружено. На сроке 33—34 нед проведена доплерометрия — систоло-диастолическое отношение (СДО) — 3,0. Беременность закончилась родовызыванием по Барцу с амниотомией на сроке 38—39 нед. Родился живой доношенный мальчик массой тела 3080 г, оценкой по шкале Апгар от 8 до 9 баллов, группой крови A(II) Rh(+). В неонатальном периоде гемолитическая болезнь не проявилась. Титр групповых антиА-агглютининов в молоке составил 1:16 (сол.)/1:16 (сыв.). С 4-х суток ребенок на грудном вскармливании. На 8-е сутки родильницу и ребенка выписали домой. Таким образом, своевременно проведенный комплекс клинко-лабораторных исследований и лечение позволили женщине родить здорового ребенка.

2. С., 25 лет. Группа крови A(II)Rh(-), у мужа — B(III)Rh(+). В анамнезе один миниаборт вне брака. Вторая беременность завершилась мертворожде-

нием на сроке 36 нед. На протяжении беременности Rh-антитела при исследовании по месту жительства не обнаружены. Патологоанатомическое исследование не проводилось. Вне беременности женщина получала комплекс лечения по поводу выявленного хламидиоза. При третьей беременности на сроке 20 нед ее направили в РКБ в связи с выявленным титром Rh- антител 1:8 на сроке 12 недель, 1:16 на сроке 18 недель. На протяжении беременности титр Rh антител в изосерологической лаборатории РКБ составил 1:4, 1:8. По данным УЗИ плода и плаценты, видимой патологии не обнаружено.

Проведен комплекс лечения, включающий вобэнзим по схеме, инфузионную терапию (5% глюкоза — 400, аскорбиновая кислота — 10,0, рибоксин — 10,0, реополиглюкин — 400, трентал — 10,0, с 28 нед эссенциале — 5,0 на аутокрови (№5), затем в капсулах по схеме 3 нед, курантил по 2 табл. 3 раза в день). Генотипы беременной и ее мужа изучены молекулярно-генетическим методом — АО и ВО, оба являются гетерозиготами. Прогноз у будущего ребенка: возможны все четыре группы крови.

С целью определения тяжести ГБП на сроке 33—34 нед проведен амниоцентез под ультразвуковым контролем. Относительная плотность билирубина околоплодных вод спектрофотометрическим методом составила ΔOD 450—0,48, что свидетельствовало о тяжелой степени ГБП. Молекулярно-генетическим методом по амниоцитам подтверждена резус-положительная принадлежность плода. Группа крови — OO(I). Беременность завершилась операцией кесарева сечения на сроке 34—35 нед ввиду неэффективности родовызывания и отягощенности акушерского анамнеза. Родился живой недоношенный мальчик массой тела 2565 г, группа крови O(I)Rh(+), с тяжелой внутриутробной формой гемолитической болезни (Hb — 6,9 г/л, Вi в пуповинной крови — 99 мкм/л, непрямой — 87 мкм/л). Произведено 2 ЗПК, на 9-е сутки ребенок переведен в ДМЦ на 2-й этап лечения с диагнозом: гемолитическая болезнь по Rh-системе, врожденная желтушная форма тяжелой степени; гепатоспленомегалия; синдром холестаза; респираторный дистресс-синдром тяжелой степени; перинатальное повреждение ЦНС гипоксически-ишемического генеза; гипертензионный синдром; недоношенность II ст. Исход — ребенок выжил.

Приведенные наблюдения свидетельствуют о возможности обследования семьи на информативность по генотипу групп крови молекулярно-генетическим методом, что наряду с классическими изосерологическими исследованиями улучшает прогноз риска ABO-изоммунизации и позволяет своевременно провести профилактический курс лечения. При резус-изоммунизации возможен косвенный прогноз групп крови будущего ребенка по генотипу родителей. При необходимости без выполнения кордоцентеза прямым методом по амниоцитам определяются резус-принадлежность и группа крови будущего ребенка ПЦР-диагностикой, что улучшает прогноз тяжести гемолитической болезни и дает возможность повысить готовность обслуживающего учреждения службы переливания крови к оказанию трансфузионной помощи ребенку.