



Дашкевич Э.В.¹✉, Пешняк Ж.В.¹, Белуга М.В.², Еремин В.Ф.¹, Новак Л.В.¹,
Курлович И.В.²

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

Алгоритм ведения женщин при резус-конфликтной беременности

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Пешняк Ж.В. (ответственный автор) – сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка статьи; Белуга М.В. (соавтор) – проведение исследований, сбор материала, подготовка и систематизация данных; Дашкевич Э.В. (соавтор) – замысел и дизайн исследования, окончательный вариант и одобрение статьи для публикации; Еремин В.Ф. (соавтор) – проведение исследований, сбор материала, одобрение статьи для публикации; Новак Л.В. (соавтор) – проведение исследований, подготовка данных; Курлович И.В. (соавтор) – одобрение статьи для публикации.

Подана: 09.03.2023

Принята: 24.04.2023

Контакты: eleonoravdoc@gmail.com

Резюме

Проведено исследование по идентификации гена RHD плода в крови матери у 60 беременных резус-отрицательных женщин и подклассов Ig G1 и G3 у 67 резус-отрицательных беременных женщин. Данные исследования направлены на профилактику осложнений при резус-конфликтной беременности.

Ключевые слова: неинвазивная пренатальная диагностика, ген RHD плода, сенсibilизированные резус-отрицательные беременные женщины, подклассы Ig G1 и G3, ПЦР, гелевый тест, посттрансфузионные осложнения гемолитического типа



Dashkevich E.¹, Peshnyak J.¹, Beluga M.², Eremin V.¹, Novak L.¹, Kurlovich I.²

¹ Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

² Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child", Minsk, Belarus

Algorithm for the Management of Women in Rh Conflict Pregnancy

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Peshnyak J. (responsible author) – collection, analysis and interpretation of data, preparation of the article; Beluga M. (co-author) – conducting research, collecting material, preparing and systematizing data; Dashkevich E. (co-author) – the idea and design of the study, the final version and approval of the article for publication; Eremin V. (co-author) – conducting research, collecting material, approving the article for publication; Novak L. (co-author) – conducting research, preparing data; Kurlovich I. (co-author) – approval of the article for publication.

Submitted: 09.03.2023

Accepted: 24.04.2023

Contacts: eleonoravdoc@gmail.com

Abstract

A study was conducted to identify the fetal RHD gene in the mother's blood in 60 and Ig G1 and G3 subclasses in 67 Rh-negative pregnant women. These studies are aimed at preventing complications in Rh-conflict pregnancy.

Keywords: non-invasive prenatal diagnostics, RHD gene of the fetus, sensitized Rh-negative pregnant women, G1 and G3 subclasses of immunoglobulin G, PCR, gel test, post-transfusion complications of the hemolytic type

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время стремительно развиваются методы неинвазивной пренатальной диагностики (НИПД). НИПД основана на анализе плодного материала, проникающего в материнский кровоток, что открывает огромные возможности для диагностики состояний и патологий плода уже на ранних сроках беременности без риска первичной изоиммунизации при инвазивных процедурах (амниоцентез, кордоцентез и др.).

Одним из наиболее существенных диагностических показателей риска развития гемолиза у плода при гемолитической анемии (ГБН) является определение количества IgG у резус-сенсibilизированных беременных женщин эритроцитами плода. Причем из субклассов IgG наиболее важно и информативно определение количества IgG1 и IgG3, которые чаще участвуют в активации комплемента, в отличие от IgG2 и IgG4.

В то же время в период родов нередко возникает необходимость трансфузий эритроцитных компонентов крови (ЭКК), что требует разработки профилактических мер, в частности определения сенсibilизации к антигенам системы резус у резус-отрицательных беременных при беременности резус-положительным плодом. Клинические проявления этого вида реакций отличаются более поздним началом, менее бурным течением, замедленным или отсроченным внесосудистым гемолизом,

что зависит от вида иммунных антител и их титра. Причиной таких реакций в подавляющем большинстве случаев является недоучет акушерского и трансфузионного анамнеза, а также невыполнение или нарушение других правил, предупреждающих несовместимость при гемотрансфузии [1–5].

Разработка алгоритма ведения резус-конфликтной беременности с включением методов по идентификации гена RHD плода в крови женщин начиная с 12 недель, определение подклассов IgG анти-Rh(D) позволит оценить степени риска ГБН, рекомендовать тактику ведения при данной беременности, выбор компонента крови при необходимости трансфузии эритроцитных компонентов крови в период родов [6–9].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать алгоритм диагностики резус-сенсibilизации у резус-отрицательных женщин, беременных резус-положительным плодом.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась сыворотка 67 и плазма крови 60 резус-отрицательных беременных женщин в возрасте от 21 года до 43 лет со сроками беременности от 12 до 39 недель и с выявленными титрами анти-Rh(D) антител от 1:2 до 1:8192, поступивших для обследования в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий из отделения патологии беременности РНПЦ «Мать и дитя» (Республика Беларусь).

Для идентификации гена RHD плода в крови матери беременные резус-отрицательные женщины подписывали «Информированное согласие на проведение лабораторного исследования по определению резус-фактора плода по крови матери» (утверждено на заседании комитета по этике РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий от 10.07.2019, протокол № 5).

Забор крови для получения плазмы проводили в пробирки вакуумные VACUETTE с K₂ ЭДТА (Greiner Bio-One, Австрия).

Идентификацию ДНК гена резус-фактора плода (RHD) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией проводили в три этапа:

- 1) выделение ДНК из исследуемого материала (образцов плазмы) проводили с помощью комплекта реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери «ПРОБА-НК-ФЕТ» (производство «ДНК-Технология», РФ);
- 2) ПЦР-амплификацию ДНК с одновременной гибридационно-флуоресцентной детекцией проводили с помощью набора реагентов для выявления гена RHD плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени «Резус-фактор плода» (производство «ДНК-Технология», РФ);
- 3) интерпретация результатов по идентификации гена RHD плода в крови резус-отрицательной беременной женщины производилась автоматически с помощью программного обеспечения амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», РФ).

Для количественной оценки подклассов IgG1 и IgG3 иммуноглобулина G в гелевом тесте врачом – акушером-гинекологом РНПЦ «Мать и дитя» были выданы «Направления для изосерологического исследования крови» на проведение лабораторного исследования по определению подклассов IgG (IgG1 и IgG3) в сыворотке крови матери.



При направлении на исследование учитывались данные:

- акушерского анамнеза (количество беременностей, родов, аборт, невынашивания беременности, информация о сенсибилизации с указанием титров анти-Rh(D) антител);
- трансфузионного анамнеза (переливания компонентов крови и лекарственных средств из плазмы крови, в том числе специфического иммуноглобулина анти-Rh(D)).

Для получения сыворотки крови забор венозной крови проводили в вакуумную пробирку с активатором свертывания, затем центрифугировали 3000 об/мин 15 минут.

Скрининг IgG и определение содержания подклассов IgG1 и IgG3 в сыворотке крови проводили в гелевом тесте с использованием диагностических гелевых карт DiaMed-ID MicroTyping System (DiaMed, Швейцария):

- 1) ID-Dia Cell I-II-III – для скрининга антиэритроцитарных антител;
- 2) ID-DiaPanel – для определения специфичности антиэритроцитарных антител;
- 3) ID-DC-Screening I – для дифференциации класса иммуноглобулинов G, A, M и/или компонентов комплемента C3c и C3d;
- 4) ID-DAT IgG1/IgG3 – для определения субклассов IgG1/IgG3 и их титров.

Все исследования проводили согласно инструкции по применению изготовителя [10, 11].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения MS Excel (Microsoft, USA).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время безопасными являются неинвазивные технологии, включающие идентификацию ДНК гена резус-фактора плода (RHD) методом ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией из плазмы крови матери и определение подклассов IgG IgG1 и IgG3 в гелевом тесте с использованием диагностических гелевых карт DiaMed-ID MicroTyping System (DiaMed, Швейцария), имеющие прогностическое значение [9].

Идентификация гена RHD плода в крови резус-отрицательных беременных женщин

Проведена идентификация гена RHD плода в крови матери у 60 беременных резус-отрицательных женщин.

Установлено, что у 51 (85%) из 60 беременных резус-отрицательных женщин согласно автоматизированному программному анализу методики неинвазивной пренатальной диагностики по идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови резус-отрицательной беременной женщины методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени получен результат «Ген RHD обнаружен». В крови у 9 (15%) женщин получен результат «Ген RHD не обнаружен», следовательно, плод имеет резус-отрицательную принадлежность.

В связи с тем что у 16 (26,6%) из 60 обследованных резус-отрицательных беременных, у которых обнаружен в крови ген RHD плода, не выявлены анти-Rh(D) антитела, было рекомендовано в качестве профилактики резус-сенсибилизации введение иммуноглобулина антирезус-D.

Анализ полученных данных позволил подтвердить соответствие результатам анализа ПЦР по идентификации резус-фактора (RHD) плода в крови резус-отрицательной беременной женщины и у новорожденных.

Анализ количественной оценки подклассов IgG1 и IgG3 иммуноглобулина G в гелевом тесте у резус-сенсibilизированных женщин

При выявлении анти-Rh(D) антител у резус-отрицательной беременной женщины при резус-положительной принадлежности биологического отца ребенка с целью прогнозирования риска развития тяжелых форм ГБН проведено определение субклассов IgG (IgG1 и IgG3) и их титра в гелевом тесте у 67 резус-сенсibilизированных беременных женщин. Определение титра субклассов IgG1 и IgG3 позволяет установить степень риска гемолиза эритроцитов плода и направлено на выявление степени сенсibilизации и раннюю диагностику ГБН.

Вначале с помощью карт ID-DC-Screening I проводили идентификацию иммуноглобулинов G, A, M и/или компонентов комплемента C3c и C3d для анти-Rh(D) антител (рис. 1А). Затем, после определения класса иммуноглобулина G, с помощью карт ID-DAT IgG1/IgG3 определяли подклассы IgG1/IgG3 и их титры (рис. 1В).

Установлено, что высокий титр антирезус-D антител (1:32 и более) коррелирует с высоким титром IgG1 и/или IgG3 антител (разведение 1:100) у 41 (61,2%) из 67 обследованных беременных резус-отрицательных сенсibilизированных женщин, следовательно, можно дать заключение о высоком риске у них гемолиза эритроцитов плода. При сопоставлении у беременных (при количестве наблюдений $n=63$) титра антител анти-Rh(D) и IgG1 коэффициент корреляции по Спирмену составил $R=0,75$ при $p<0,000001$, что показывает высокую положительную корреляционную зависимость между данными показателями. У 10 (14,9%) из 67 беременных женщин с низким титром подкласса IgG1 (1:1) определен умеренный риск гемолиза эритроцитов плода. У 13 (19,4%) из 67 беременных женщин ввиду очень низкого титра анти-Rh(D)

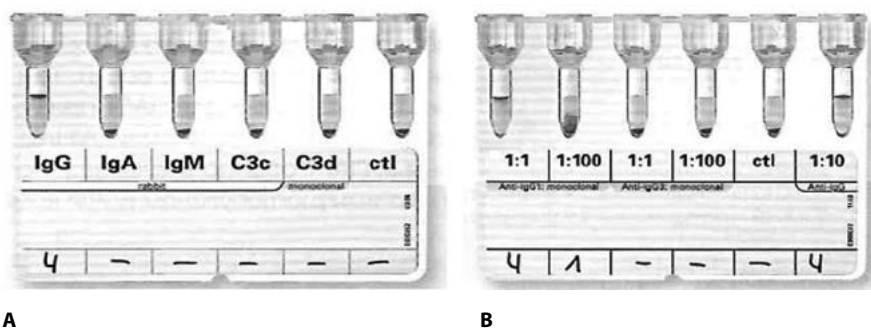


Рис. 1. ID-карта DC-Screening I для дифференциации класса иммуноглобулинов G, A, M и/или компонентов комплемента C3c и C3d (А); ID-карта DAT IgG1/IgG3 для определения субклассов IgG1/IgG3 и их титров (В)

Fig. 1. DS-Screening I ID card for differentiation of the class of immunoglobulins G, A, M and/or complement components C3c and C3d (A); DAT IgG1/IgG3 ID card for determination of IgG1/IgG3 subclasses and their titers (B)



антител (1:2–1:8) титры подклассов IgG1/IgG3 не определялись (антитела не были выявлены), но общий IgG определялся в титре 1:10 (риск сомнительный – согласно инструкции к набору), что требует динамического наблюдения в течение беременности. В 3 случаях (4,5%) из 67 анти-Rh(D) антитела не были выявлены, а выявлены антитела к другим антигенам системы резус (анти-C), что также требует наблюдения в течение беременности и не отменяет введения иммуноглобулина антирезус-D.

Результаты одновременного клинико-лабораторного исследования по определению подклассов иммуноглобулина G (IgG1 и IgG3) и их титров в гелевом тесте и ПЦР по идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери у 15 резус-отрицательных беременных женщин из обследованных в возрасте от 21 года до 43 лет со сроками беременности от 12 до 38 недель и с выявленными титрами анти-Rh(D) антител от 1:2 до 1:2048 представлены в таблице.

Результаты клинико-лабораторного исследования по определению подклассов иммуноглобулина G (IgG1 и IgG3) и их титров в гелевом тесте и ПЦР по идентификации гена резус-фактора (RHD) плода в крови матери резус-отрицательных беременных женщин
The results of a clinical and laboratory study to determine the subclasses of immunoglobulin G (IgG1 and IgG3) and their titers in a gel test and PCR to identify the Rh factor gene (RHD) of the fetus in the blood of the mother of Rh-negative pregnant women

№ п/п	Ф.И.О. беременной	Возраст, лет	Срок беременности, недель	Акушерский анамнез	Титр анти-Rh(D) антител	Заключение: риск гемолиза эр. плода (титры анти-IgG1/IgG3)	Результат ПЦР: ген RHD обнаружен / не обнаружен / сомнительный результат	Резус-фактор новорожд.	Наличие ГБП/ГБН
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	К.Ю.Н.	32	12	Б. 2, роды – 1	1:16	умеренный (1:1/–)	Ген RHD не обнаружен	Rh–	
2	У.Е.Н.	30	38	Б. 9, роды – 5 (1 умер на 2-е сутки – ГБН), мед. аборт – 3	1:128	высокий (1:100/–)	Ген RHD обнаружен	Rh+	ГБН III ст. т.
3	М.Е.А.	27	21–22	Б. 1, роды – 1	1:64	высокий (1:100/1:100)	Ген RHD обнаружен	Rh+	
4	В.А.А.	30	30	Б. 3, роды – 1, настоящая беременность в повторном браке	1:64	высокий (1:1/1:100)	Ген RHD обнаружен	Rh+	
5	У.Н.Н.	36	20–21	Б. 9, роды – 3, мед. аборт – 1, самопроизв. выкидыш – 1, неразвивш. берем. – 3	1:512	высокий (1:100/–)	Ген RHD обнаружен	Rh+	
6	Ф.И.Н.	37	30–31	Б. 1 – роды, ребенок резус-положительный; Б. 2 – роды, ребенок резус-отрицательный; Б. 3 – настоящая	1:2	сомнительный (–/–)	Ген RHD обнаружен	Rh+	ГБН I ст. т.

Окончание таблицы

№ п/п	Ф.И.О. беременной	Возраст, лет	Срок беременности, недель	Акушерский анамнез	Титр анти-Rh(D) анти-тел	Заключение: риск гемолиза эр. плода (титры анти-тел IgG1/IgG3)	Результат ПЦР: ген RHD обнаружен / не обнаружен / сомнительный результат	Резус-фактор новорожд.	Наличие ГБП/ГБН
7	Г.А.Ю.	34	24–25	Б. 4, роды – 2, самопроизв. выкидыш – 1	1:64	высокий (1:100/–)	Ген RHD обнаружен	Rh+	
8	К.А.В.	35	15	Б. 3, роды – 2 (1 реб. – Rh положит., 2 реб. – Rh отрицат.)	1:32	умеренный (1:1/–)	Ген RHD обнаружен	Rh+	
9	Ч.В.И.	39	20–21	Б. 2, роды – 1, брак 2-й	1:2048	высокий (1:100/1:1)	Ген RHD обнаружен	Rh+	
10	М.С.К.	43	24–25	Б. 15, роды – 10, самопроизв. выкидыш – 3, неразвивш. берем. – 1	1:512	высокий (1:100/1:1)	Ген RHD обнаружен	Rh+	
11	М.Е.П.	36	17	Б. 9, роды – 3, мед. аборт – 2, самопроизв. выкидыш – 2, неразвивш. берем. – 2	1:512	высокий (1:100/1:100)	Ген RHD обнаружен	Rh+	
12	К.О.С.	26	12–14	Б. 5, Р – 1, с/выкидыш – 3	1:16	умеренный (1:1/–)	Ген RHD не обнаружен	Rh–	
13	Б.В.В.	40	35	Б. 4, роды – 2. В 28 недель введение антирезус-D иммуноглобулина	1:2	сомнительный (–/–)	Ген RHD обнаружен	B(III) Rh+	
14	Ж.В.В.	30	36	Б. 9, роды – 4, самопроизвольный выкидыш – 2, замершая беременность – 1. Введения антирезус-D иммуноглобулина не было	1:1024	высокий (1:100/1:1)	Ген RHD обнаружен	A(II) Rh+	КЦ, ВГТ 36 нед.
15	Ч.О.В.	36	34	Б. 5, роды – 3 (КС), мед. аборт – 1, антирезус-D иммуноглобулин 19.05.2020, переливание эр. массы и плазмы в 2020 г. В течение 12 ч. перед сдачей образца крови принимала комет п/к, эноксапарин 2000	1:8	сомнительный (–/–)	Ген RHD не обнаружен	Rh–	



Как видно из таблицы, у 12 (80%) из 15 беременных резус-отрицательных женщин получен результат «Ген RHD обнаружен», следовательно, плод имеет резус-положительную принадлежность.

У 3 (20%) из 15 обследованных беременных с низким титром подкласса IgG1 (1:1) расценивается как умеренный риск гемолиза эритроцитов плода, в 2 случаях (13%) при результате обследования «Ген RHD не обнаружен» и учитывая то, что плод имел

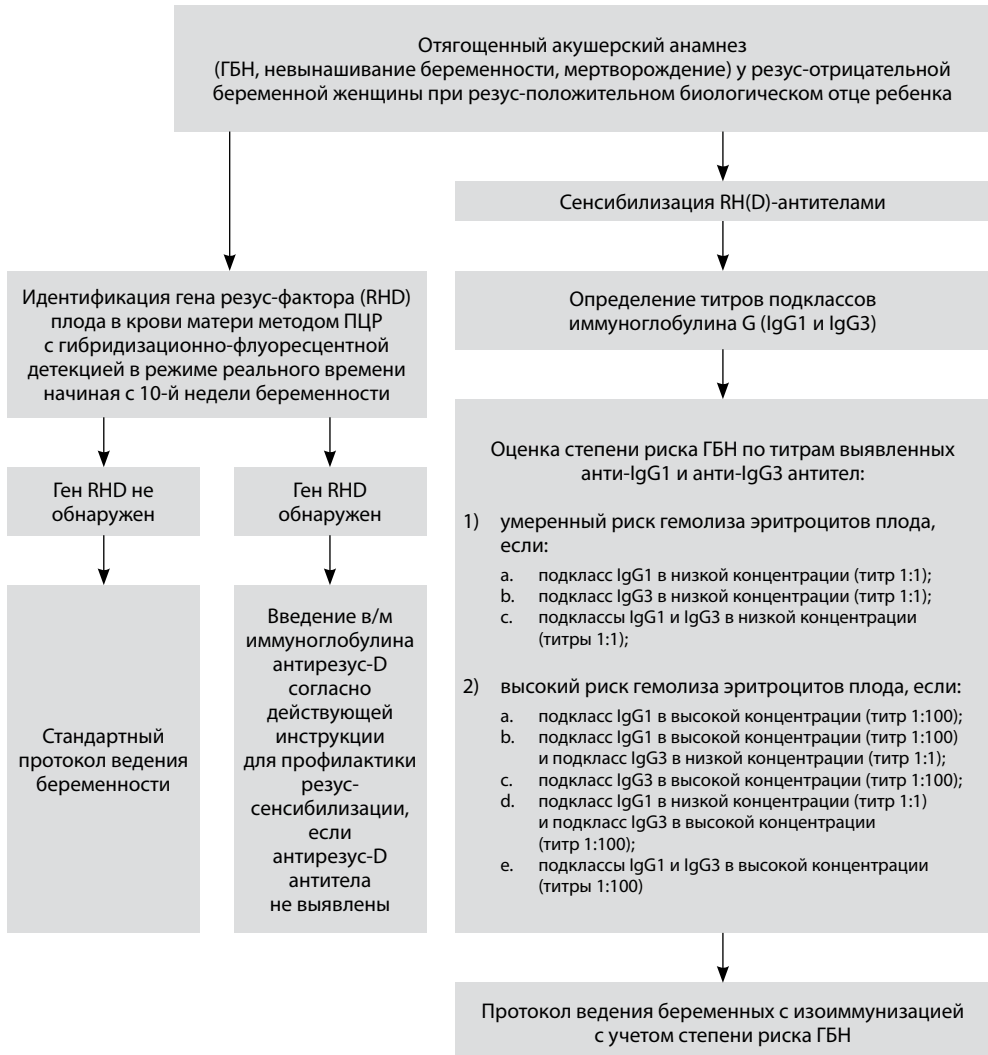


Рис. 2. Алгоритм медицинского наблюдения и оказания медицинской помощи беременным с изоиммунизацией

Fig. 2. Algorithm of medical supervision and medical care for pregnant women with isoimmunization

резус-отрицательную принадлежность, выявлены титры анти-D антител 1:16 в связи с отягощенным предшествующим акушерским анамнезом у матери.

У 3 (20%) из 15 беременных женщин ввиду очень низкого титра анти-Rh(D) антител (1:2–1:8) титры подклассов IgG1/IgG3 не определялись (антитела не были выявлены), но общий IgG определялся в титре 1:10 (риск сомнительный – согласно инструкции к набору), что потребовало динамического наблюдения их титров в течение беременности у 2 женщин, а у одной беременной с установленным ПЦР отсутствием гена RHD плода в крови матери рекомендована тактика ведения как при физиологически протекающей беременности.

У пациенток, в крови которых ген RHD обнаружен и у которых определялся высокий риск гемолиза эритроцитов плода (титры субклассов IgG1 и/или IgG3 высокие – 1:100), у новорожденного диагностирована ГБН III степени тяжести. В случае, когда ген RHD обнаружен, но при сомнительном риске гемолиза эритроцитов плода у резус-положительного новорожденного выявлена ГБН легкой степени тяжести.

На основании полученных результатов разработан «Алгоритм медицинского наблюдения и оказания медицинской помощи беременным с изоиммунизацией» (рис. 2), который лег в основу клинического протокола «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам с резус-иммунизацией и другими формами изоиммунизации» (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 128 от 30.12.2022).

При выявлении анти-D антител и резус(D)-положительной принадлежности крови плода по данным НИПД методом ПЦР либо неопределенной резус(D)-принадлежности крови плода выполняется контроль доплерометрии с оценкой пиковой систолической скорости кровотока в средней мозговой артерии плода 1 раз в 14 дней с 18–20 недель до родоразрешения. При необходимости выполняется идентификация антиэритроцитарных антител с определением их подклассов и концентрации с целью прогнозирования развития тяжелых форм ГБП и ГБН при резус-иммунизации (определение подклассов IgG1, IgG3).

При этом учитывается, что вероятность появления антител у резус-отрицательной беременной женщины зависит от различных факторов: фенотипа плода, иммуногенности эритроцитарного антигена, объема трансплацентарного кровотока, а также от иммунологической способности матери к выработке антител.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение методик неинвазивной пренатальной диагностики у резус-отрицательных беременных по идентификации гена RHD плода в крови матери и количественной оценки подклассов IgG1 и IgG3 в гелевом тесте при различных клинико-анамнестических данных в качестве ранних диагностических исследований будет способствовать своевременному назначению превентивных терапевтических мероприятий (введение иммуноглобулина антирезус(D)) для сохранения жизнеспособности плода.

Для выявления и профилактики аллосенсибилизации у беременных, прогнозирования течения конфликтной по групповым эритроцитарным антигенам беременности внедрена инструкция по применению «Метод медицинской профилактики посттрансфузионных осложнений гемолитического типа и аллосенсибилизации



при беременности» (утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 25.04.2019, регистрационный № 254-1218).

Подбор совместимых эритроцитных компонентов крови резус-отрицательным беременным, роженицам, родильницам после проведенной специфической иммунопрофилактики анти-D иммуноглобулином не проводится ввиду наличия пассивно передаваемых анти-D антител, кроме случаев выявления у женщин антител другой специфичности (например, системы MNS, Келл и др.).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Svirnovskaya E.L., Bondarenko V.S., Brovko I.V. *Transfusion of donor blood and its components: instructions for use, Reg. No. 118-1103, approved. Ministry of Health of the Republic of Belarus dated 01.07.2003.* (in Russian)
2. Peshnyak Zh.V., Dvorina E.M., Dashkevich E.V. Occurrence of transfusion significant erythrocyte antigens and detection of anti-erythrocyte antibodies in donors, recipients, pregnant women in Minsk, Grodno and Grodno region. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe.* 2017;3(4):776–784. (in Russian)
3. Kozlyakova O.V. Clinical experience in the management of pregnant women with Rh immunization at a high risk of developing fetal hemolytic disease. *Healthcare.* 2009;4:56–61. (in Russian)
4. Dvorina E.M., Peshnyak Zh.V., Dashkevich E.V., Bondaruk O.N., Karpenko F.N. *Method of medical prevention of post-transfusion complications of the hemolytic type and allosensitization during pregnancy: instructions for use. Reg. No. 254-1218, approved. Ministry of Health of the Republic of Belarus dated April 25, 2019.* (in Russian)
5. Dvorina E.M., Peshnyak Zh.V., Glinskaya T.N. Domestic panel of test erythrocytes to determine the specificity of anti-erythrocyte antibodies. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe.* 2019;5(4):560–562. (in Russian)
6. Guinchard E. Non-invasive fetal RHD genotyping: Validation of the method with 200 patients. *Transfus. Clin. Biol.* 2014;21(1):1–14. doi: 10.1016/j.traccli.2013.12.001
7. Kent J., Farrell M., Soothill P. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14(87). doi: 10.1186/1471-2393-14-87
8. Mitrya I.V. Methods of prevention, diagnosis and treatment of Rh sensitization. *AG-info.* 2012;3:12–20. (in Russian)
9. Peshnyak Zh.V., Dashkevich E.V., Kurlovich I.V. The method of non-invasive prenatal diagnosis to assess the risk of developing hemolytic disease of the fetus and newborn in Rh-sensitized pregnant women. *Collection of scientific works "Modern perinatal medical technologies in solving the problems of demographic security".* 2021;14:234–239. (in Russian)
10. *DIAMED-ID MICRO TYPING SYSTEM: instructions for use.* DiaMed, Switzerland.
11. Baranova E.E., Gnetetskaya V.A., Belenikin M.S. *Non-invasive determination of the sex and Rh factor of the fetus by real-time polymerase chain reaction.* Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. M.: FGBOU DPO RMANPO, 2018:56. (in Russian)