

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
Республики Беларусь



Д.Л. Пиневиц

«21» Апреля 2019 г.

Регистрационный № 046 - 0419

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХРОМОСОМНОГО НАБОРА
СПЕРМАТОЗОИДОВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ:

Громько О.А., к.б.н. Головатая Е.И., к.м.н. Прибушеня О.В.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

25.04.2019

Регистрационный № 046-0419

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХРОМОСОМНОГО НАБОРА
СПЕРМАТОЗОИДОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр “Мать и дитя”»

АВТОРЫ: О. А. Громько, канд. биол. наук Е. И. Головатая, канд. мед. наук
О. В. Прибушеня

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения хромосомного набора сперматозоидов, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику хромосомных болезней у плода и новорожденного.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-акушеров-гинекологов, врачей-генетиков медико-генетических центров, врачей-урологов, а также иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с бесплодием и невынашиванием беременности в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или отделениях дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование: центрифуга лабораторная (1000–3000 об/мин), термостат, программируемый гибридизатор, флуоресцентный микроскоп с набором флуоресцентных фильтров, лабораторная водяная баня, вортекс, пробирки центрифужные, пипетки, предметные стекла, покровные стекла, парафиновая пленка, сосуд Коплина, микропипетки с одноразовыми сменными наконечниками.

Реактивы: хлорид калия, гидроокись натрия, этанол 70, 85 и 96°, уксусная кислота, физиологический раствор, дистиллированная вода, флуоресцентные ДНК-пробы, краска для флуоресценции DAPI, 20xSSC, иммерсионное масло для флуоресценции.

Необходимые растворы:

гипотонический раствор (0,55 % KCl): 55 мг KCl растворить в 100 мл дистиллированной воды;

фиксатор: 10 мл ледяной уксусной кислоты добавить к 30 мл этанола (96°).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Q 95.0 Сбалансированные транслокации и инсерции у нормального индивида.

2. Q 95.3 Сбалансированные половые/аутосомные перестройки у нормального индивида.

3. Q 95.8 Другие сбалансированные перестройки и структурные маркеры.

4. N 46 Мужское бесплодие (азоо-, олигоспермия).

5. R 86 Отклонения от нормы, выявленные при исследовании препаратов из мужских половых органов.

Отклонения от нормы, выявленные при исследовании: секрета предстательной железы, спермы и семенной жидкости, аномальные сперматозоиды.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

До определения хромосомного набора сперматозоидов первоначально проводится кариотипирование лимфоцитов периферической крови (стандартное кариотипирование) пациента для установления типа хромосомной перестройки. В случае выявления сбалансированной хромосомной перестройки выполняется подбор необходимых флуоресцентных ДНК-проб для метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Этап 1. Получение биологического материала для исследования (сперма)

Забор спермы выполняется согласно инструкции по применению «Метод диагностики генетически обусловленных форм мужского бесплодия» от 16.03.2016 № 196-1115.

Этап 2. Приготовление препаратов сперматозоидов

1. Образцы спермы поместить в пробирки и центрифугировать 5–7 мин (1000 об/мин). Добавить 5 мл физиологического раствора; центрифугировать 5–7 мин (1000 об/мин); удалить надосадочную жидкость.

2. Гипотоническая обработка: центрифугировать 5–7 мин (1000 об/мин), удалить надосадочную жидкость, добавить 7 мл 0,55 % раствора KCl. Ресуспензировать. Поместить пробирки в термостат (37 °C) на 10 мин.

3. Для фиксации добавить в пробирки по 1 мл фиксатора. Ресуспензировать. Центрифугировать 5–7 мин (1000 об/мин), удалить надосадочную жидкость.

4. Ввести в пробирки по 7 мл предварительно охлажденного фиксатора. Ресуспензировать. Центрифугировать 5–7 мин (1000 об/мин), удалить надосадочную жидкость.

5. Повторить п. 4 еще раз.

6. Ресуспензировать осадок в 0,5–1 мл фиксатора.

7. Приготовление препаратов: на холодные влажные чистые предметные стекла с помощью пипетки нанести по несколько капель ресуспензированных осадков из каждой пробирки. Оценить под микроскопом неокрашенные предметные стекла с нанесенным материалом (далее — предметные стекла). Оставшийся осадок сохраняется в холодильнике при 4 °C.

8. Предметные стекла высушить на воздухе.

9. Оставить при комнатной температуре на 3-е сут для реализации процесса «старения».

Этап 3. Нанесение флуоресцентной ДНК-пробы (этап FISH)

1. На предметных стеклах отметить область нанесения флуоресцентной ДНК-пробы.

2. Предметные стекла поместить в раствор 20xSSC комнатной температуры на 10 мин, далее в раствор 1M NaOH комнатной температуры на 3 мин, промыть дистиллированной водой, провести поочередно дегидратацию в этаноле 70, 85, 96° по 1 мин соответственно, высушить на воздухе.

3. Приготовить гибридизационную флуоресцентную ДНК-пробу согласно инструкции фирмы-производителя.

4. На выделенную область предметного стекла нанести флуоресцентную ДНК-пробу в количестве согласно прилагаемой к ней инструкции фирмы-

производителя, накрыть покровным стеклом, плотно заклеить область с пробой парафиновой пленкой.

5. Положить стекла в гибридизатор с установленной программой согласно указанному в инструкции фирмы-производителя режиму денатурации/гибридизации.

6. После выполнения программы снять покровное стекло и провести постгибридизационную обработку предметного стекла с нанесенным образцом сперматозоидов согласно инструкции фирмы-производителя.

7. Нанести на предметное стекло флуоресцентную краску, накрыть покровным стеклом.

8. Анализ приготовленных предметных стекол с нанесенным образцом сперматозоидов выполняется на флуоресцентном микроскопе с применением флуоресцентных фильтров, которые соответствуют используемым флуоресцентным ДНК-пробам, с помощью объектива x100 и иммерсионного масла.

Этап 4. Интерпретация результатов

Для оценки хромосомного набора сперматозоидов необходимо выполнять исследование не менее 1000 клеток. Возможные типы несбалансированного набора хромосом (сегрегации при носительстве Робертсоновских и реципрокных транслокаций) показаны на рисунках в приложении 1. Проводится оценка частоты несбалансированных мужских гамет. Доля сперматозоидов с разным типом сегрегации выражается в процентах. На основании полученных данных оформляется заключение примерная форма указана в приложении 2.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Учитывая высокую чувствительность метода, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Для предотвращения диагностических ошибок требуется соблюдать следующие правила:

использовать только химически чистую, стерильную посуду, одноразовые пробирки и наконечники для пипеток;

строго соблюдать температурные и временные режимы этапов метода;

перед открыванием крышек пробирок с флуоресцентными ДНК-пробами осаждать растворы со стенок центрифугированием; перед использованием растворы перемешивать;

этапы работы с флуоресцентными ДНК-пробами и анализ приготовленных стекол производить в условиях пониженной освещенности.

2. Ошибки, связанные с нарушением правил забора, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований.

Для предупреждения ошибок этой группы необходимо соблюдать правила работы с биологическим материалом.

3. Ошибки при выполнении лабораторных исследований, связанные с несоблюдением протоколов, использованием реагентов, утративших активность, загрязнением исследуемых образцов продуктами реакций и др.

Для предупреждения таких ошибок необходимо соблюдать требования инструкции фирмы-производителя, контролировать годность реагентов, использовать контрольные материалы и образцы.

4. Ошибки, связанные с неправильной интерпретацией полученных результатов. Для предупреждения данных ошибок необходимо обучение и повышение квалификации специалистов.

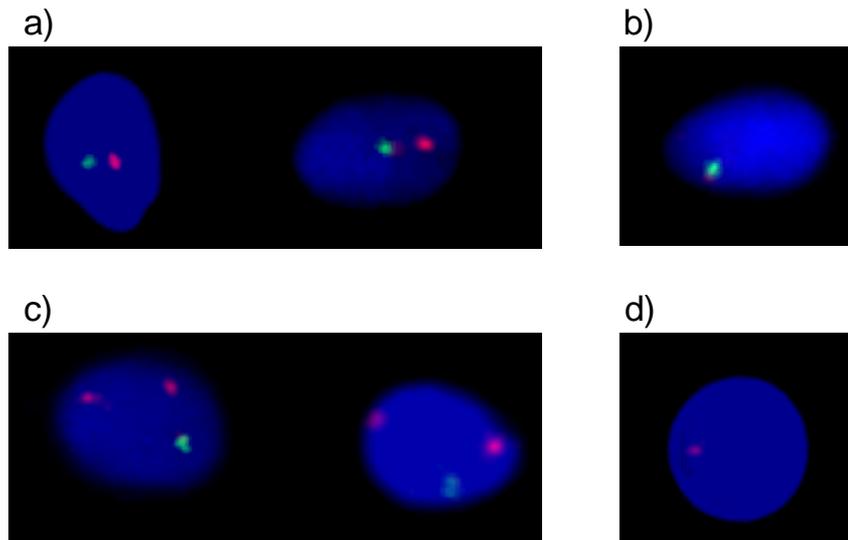
Клинический пример

Пациент С. направлен для обследования и кариотипирования в связи с выявлением при инвазивной пренатальной диагностике в 12 недель гестации транслокационной формы синдрома Дауна у плода (кариотип плода 46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21). Беременность наступила в результате экстракорпорального оплодотворения в связи с мужским фактором бесплодия (№ 46 по МКБ-10) и была прервана во II триместре после выявления хромосомной болезни у плода. При анализе спермограммы установлена олигозооспермия. При стандартном кариотипировании получен кариотип 45,XY,der(14;21)(q10;q10). Проведено медико-генетическое консультирование. Для оценки прогноза потомства и планирования деторождения выполнено молекулярно-цитогенетическое исследование половых клеток для определения хромосомного набора сперматозоидов. Использован метод FISH с применением локус-специфических ДНК-проб на 14 (LSI IGH Dual Color (14q32 SO SG) и 21 (LSI 21 SO) хромосому. Проанализировано 1020 сперматозоидов. Данные исследования представлены в таблице и на рисунке.

Таблица — Результаты определения хромосомного набора сперматозоидов

Тип сегрегации (сегрегационная модель)	Число сперматозоидов/(%)	Хромосомный набор
Альтернативная	820 (80,4)	Нормальный/сбалансированный
Совместная	26 (2,6)	Дисомия 14
	29 (2,8)	Нуллисомия 14
	87 (8,5)	Дисомия 21
	50 (4,9)	Нуллисомия 21
Другие	8 (0,8)	
Общее число	1020	

Заключение: при молекулярно-цитогенетическом исследовании гамет альтернативный тип сегрегации составил 80,4 %.



- a) нормальный или сбалансированный хромосомный набор;
 b) нуллисомия 21 хромосомы; c) дисомия 21 хромосомы;
 d) нуллисомия 14 хромосомы

Рисунок — Молекулярно-цитогенетическое определение хромосомного набора сперматозоидов методом FISH

Доля сперматозоидов с трисомией по 21 хромосоме, приводящая к рождению ребенка с синдромом Дауна, составила 8,5 %.

При формировании половых клеток во время мейоза для прохождения кроссинговера хромосомам, участвующим в робертсоновской транслокации, и их гомологам, необходимо сформировать фигуру, так называемый тривалент, для последующего обмена генетическим материалом и прохождения следующего этапа – сегрегации. Под сегрегацией следует понимать процесс расхождения хромосом по полюсам при делении половых клеток. У носителей робертсоновских транслокаций может образоваться 6 типов гамет. В зависимости от типа сегрегации у носителей робертсоновских транслокаций могут образовываться гаметы с нормальным, сбалансированным и несбалансированным набором хромосом. Только 2 типа гамет из 6 будут сбалансированы: одна гамета с нормальным набором хромосом, другая — с родительской робертсоновской транслокацией. Оставшиеся 4 гаметы будут несбалансированными по хромосомному набору: 2 приведут у плода к моносомии по одной из хромосом, участвующих в робертсоновской транслокации, и 2 — к трисомии по этим же хромосомам.

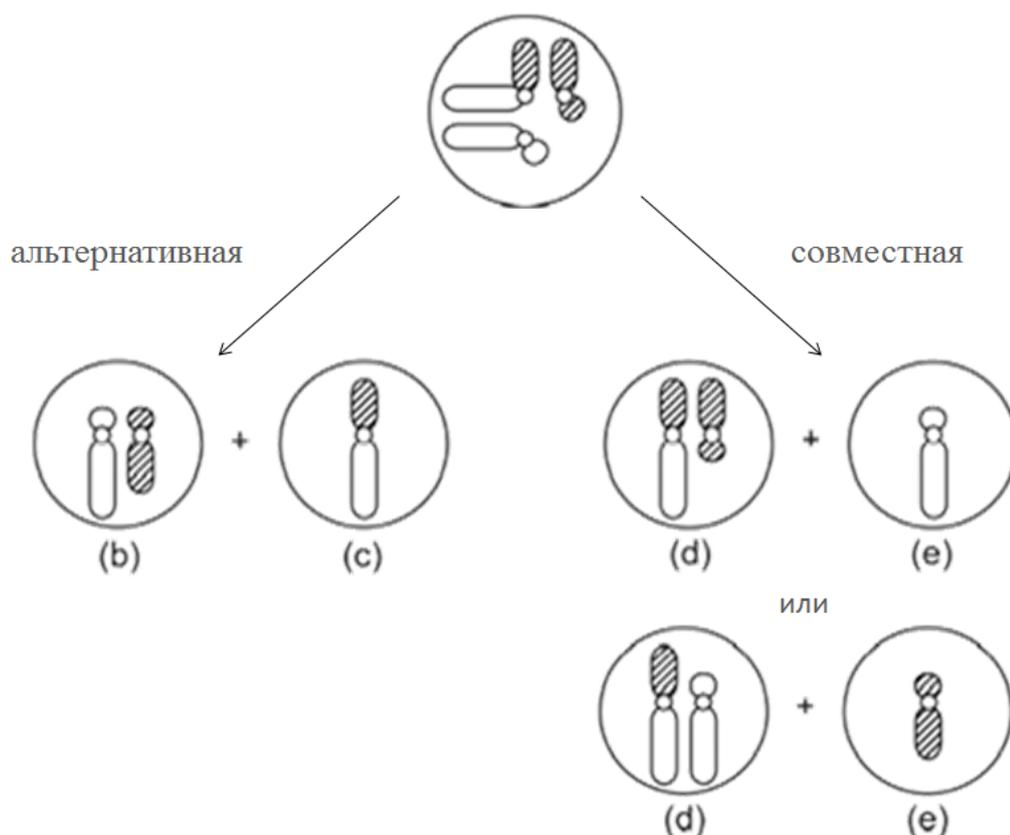


Рисунок 1. — Основные типы сегрегации хромосом у носителей робертсоновских транслокаций. Образуются гаметы с нормальным (b), сбалансированным (c) набором хромосом, дисомией (d) или нуллисомией (e) по одной из участвующих в робертсоновской транслокации хромосом

Во время мейоза хромосомы, участвующие в реципрокной транслокации, и их гомологи формируют фигуру в виде тетравалента. Это необходимо для обмена генетическим материалом — кроссинговера и прохождения следующего этапа — сегрегации. У носителей реципрокных транслокаций может образоваться 12 типов гамет. В зависимости от типа сегрегации у носителей таких транслокаций могут образовываться гаметы с нормальным, сбалансированным и несбалансированным набором хромосом. Только два типа гамет из 12 будут сбалансированы: одна гамета с нормальным набором хромосом, другая — с родительской транслокацией.

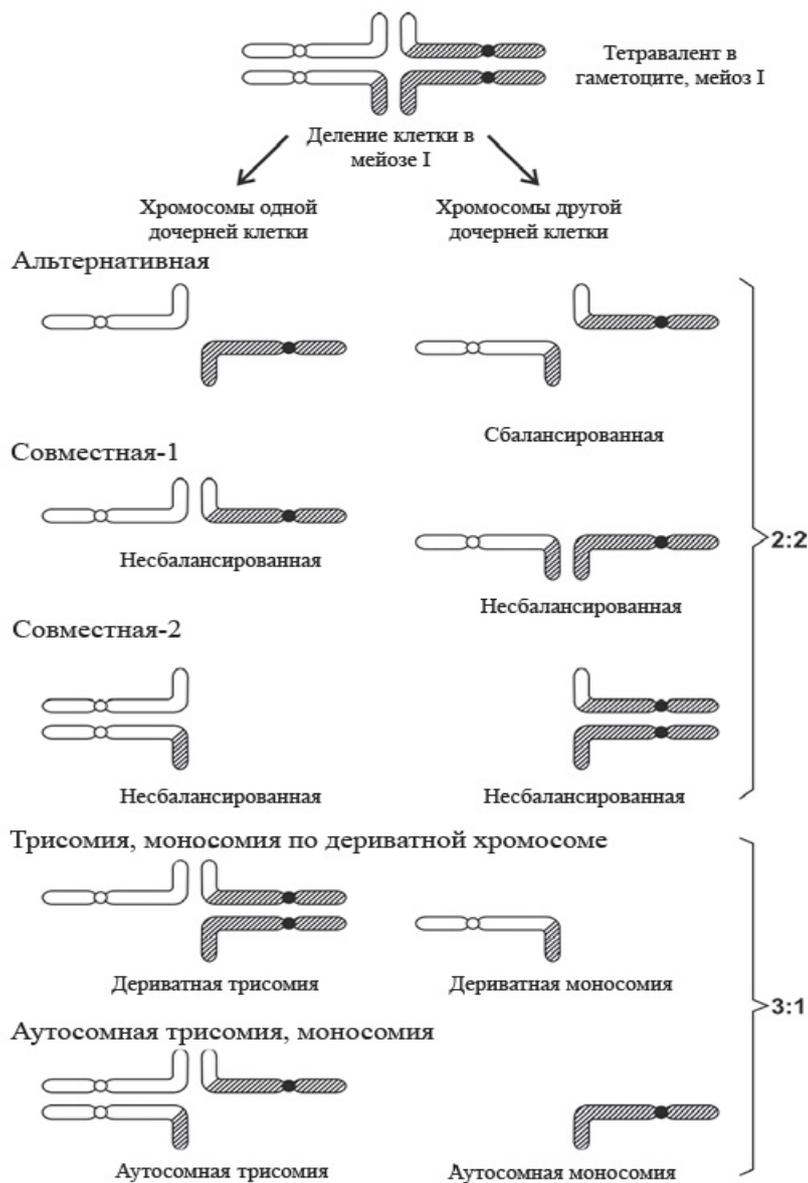


Рисунок 2. — Типы сегрегации хромосом в мейозе у носителей реципрокных транслокаций

Бланк-заключение

Ф.И.О.:

Дата рождения:

Адрес:

Диагноз, кариотип:

Используемые флуоресцентные ДНК-пробы:

Тип сегрегации (сегрегационная модель)	Число(%)	Хромосомный набор
Альтернативная		Нормальный/сбалансированный
Совместная		Дисомия
		Нуллисомия
		Дисомия
		Нуллисомия
Другие		
Общее число		

Заключение:

Врач-специалист

Дата