

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц Д.Л. Пиневиц

шона 2014 г.

Регистрационный № 153-1113

МЕТОД ИНВАЗИВНОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ХРОМОСОМНОЙ ПАТОЛОГИИ ПЛОДА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.м.н. Прибушена О.В., к.б.н. Головатая Е.И.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
06.06.2014
Регистрационный № 153-1113

**МЕТОД ИНВАЗИВНОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ХРОМОСОМНОЙ ПАТОЛОГИИ ПЛОДА**

инструкция по применению

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

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

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью выбора наиболее оптимального подхода к пренатальному кариотипированию в I (9–13 недель беременности) и II (13–22 недели беременности) триместрах беременности.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-акушеров-гинекологов и врачей-генетиков.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование и посуда:

- ламинарный шкаф;
- инкубатор с возможностью установки необходимого температурного режима, уровня влажности и CO₂;
- вытяжной шкаф;
- центрифуга;
- термостат;
- стереомикроскоп;
- инвертированный микроскоп;
- стандартный микроскоп для кариотипирования;
- термостол;
- водяная баня;
- pH-метр;
- холодильник;
- морозильник;
- стерильные чашки Петри;
- пробирки со скошенным дном;
- слайд-флаконы;
- пипетки;
- предметные стекла.

Необходимые реагенты:

- среда для культивирования клеток для пренатального кариотипирования;
- эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС);
- ультросер;
- антибиотик;
- раствор Хэнкса;
- колхицин (или колцемид);
- цитрат натрия;
- хлорид калия;
- коллагеназа;
- этанол (или метанол);
- уксусная кислота;
- трипсин (0,25%);
- версен;
- краска Гимза;
- Na₂HPO₄ 12H₂O;

- KH_2PO_4 ;
- би-, дистиллированная вода.

Необходимые растворы

Для культуры клеток в пренатальной диагностике рекомендуется использовать среды типа Amniotax или Chang с питательными добавками.

При использовании сухих смесей готовим следующие питательные среды:

- 1) для амниотической жидкости и длительной культуры БВХ — 10% среда

НАМ:

- 10 мл ЭТС;
- 2 мл ультросер;
- 1 мл антибиотик;
- 87 мл среды НАМ;

- 2) для полупрямого метода БВХ — 20% среда НАМ:

- 20 мл ЭТС;
- 80 мл среды НАМ.

Приготовление 100% фиксатора:

- 10 мл уксусной кислоты;
- 30 мл этанола (96°).

Приготовление гипотонических растворов:

- 1% цитрат натрия: 1 г цитрата натрия на 100 мл дистиллированной воды;
- сывороточная гипотония 1: 10 мл сыворотки на 100 мл дистиллированной воды;

- сывороточная гипотония 2: 55 мг КСI на 100 мл дистиллированной воды;
- смешанная гипотония: 1 мл сывороточной гипотонии, 5 мл 0,55% раствора КСI, 9 мл дистиллированной воды.

Приготовление остальных растворов:

- 60% уксусная кислота: 60 мл уксусной кислоты, 40 мл дистиллированной воды (концентрацию уксусной кислоты можно варьировать, подбирая эмпирическим путем);

- фосфатный буфер: 23,880 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ растворить в 1 л дистиллированной воды, 9,078 г KH_2PO_4 растворить в 1 л дистиллированной воды; смешать в соотношении 1:1, рН, доведенный до 6,8.

Допускается использование других вариантов буфера, подбор которых осуществляется эмпирическим путем.

Приготовление рабочего раствора краски Гимза (5% раствор): 5 мл краски на 95 мл фосфатного буфера.

Можно использовать 10% раствор краски Гимза на фосфатном буфере.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Высокий риск по рождению ребенка с хромосомным заболеванием. К ним относятся следующие состояния.

1. Анамнез семьи:

- возраст женщины 38 лет и старше;
- носительство хромосомных перестроек одним из супругов;

- синдром Дауна у ранее рожденного ребенка или плода, abortированного по медико-генетическим показаниям.

2. Показания, сформированные в ходе выполнения популяционных скринирующих программ (риск по хромосомным болезням 1:360 и выше, рассчитанный по результатам пренатального скрининга).

Для расчета риска могут быть использованы следующие варианты исследований:

- результаты биохимического скрининга II триместра: α -фетопротеин (АФП), хорионический гонадотропин (ХГ), эстриол, ингибин А, возраст беременной;

- результаты ультразвукового (УЗ) популяционного скрининга I триместра по NT (синонимы NT: «шейная складка», «толщина воротникового пространства», ТВП) с учетом возраста беременной, копчико-теменного размера плода (КТР), данных анамнеза о синдроме Дауна у ранее рожденного ребенка или плода, abortированного по медико-генетическим показаниям;

- результаты комбинированного популяционного скрининга I триместра по пяти параметрам: NT, возраст беременной, АФП, ХГ, белок, ассоциированный с беременностью (РАРР-А);

- результаты комбинированного УЗ популяционного скрининга I триместра и биохимического скрининга II триместра (АФП, ХГ, эстриол, возраст беременной женщины и др.).

3. Косвенные УЗ-маркеры хромосомных болезней, выявленные во II триместре беременности (сочетание 2-х и более маркеров), с учетом результатов популяционного скрининга I триместра:

- расширение чашечно-лоханочной системы почек плода 5 мм и более;

- кисты сосудистого сплетения головного мозга плода (множественные, билатеральные, большого размера — 5 мм и более в диаметре);

- гиперэхогенный кишечник (сравнимый по эхогенности с подвздошной костью);

- пограничная вентрикуломегалия (задние рога боковых желудочков более 10 мм);

- гиперэхогенный фокус в полости сердца плода;

- укорочение бедренной и/или плечевой кости (длина кости менее 5 центиля);

- преназальный отек 6 мм и более.

4. Врожденные пороки развития плода, выявленные в результате УЗИ при данной беременности.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

- тяжелая экстрагенитальная патология в стадии декомпенсации;

- тяжелые гемостазиопатические заболевания, характеризующиеся повышенной кровоточивостью (в т. ч. и наследственные);

- гнойно-септические заболевания.

Относительными противопоказаниями к применению ИПП могут быть:

- воспалительные заболевания с повышением температуры;

- угроза прерывания беременности с кровянистыми выделениями;
- предшествовавшие лапаротомии и операции на матке;
- наличие множественных фиброматозных узлов в матке;
- результаты анализа выделений из влагалища III–IV ст. чистоты;
- многоплодие.

При обнаружении инфекций половых путей необходимо провести их санацию до получения нормального результата анализа, затем произвести ИПП.

Постановка диагноза хромосомной болезни у плода возможна только посредством ИПД. Биохимические и УЗ-исследования позволяют лишь заподозрить эти заболевания. Кариотип плода устанавливается при исследовании культуры клеток. Биологическим материалом для цитогенетического исследования служат клетки плода, амниотической оболочки, ворсины хориона и плаценты. Для получения биологического материала используют ряд ИПП: амниоцентез, биопсия ворсин хориона, биопсия ворсин плаценты, кордоцентез.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Проведение ИПП

Условия проведения ИПП

Специально оборудованный процедурный кабинет: операционный стол; УЗ-аппарат высокого или среднего класса с трансабдоминальным конвексным датчиком 5 МГц; столик для инструментов.

Для забора материала используются спинальные иглы типа YALE с атравматическим срезом Qinke, диаметром 19–22 G длиной 9 и 15 см. Забор хориального или плацентарного материала осуществляют с помощью трехкомпонентного шприца Луер-Лок объемом 20 мл. Процедура является амбулаторной, проводится врачом-акушером-гинекологом медико-генетической службы.

Порядок проведения ИПП

Пациентка ложится на спину на операционный стол, врач-акушер-гинеколог пальпирует живот и определяет высоту положения дна матки.

Процедура проводится под УЗ-контролем, в ходе которого врач лучевой диагностики определяет состояние плода, констатирует наличие у него сердцебиения, локализацию плаценты, количество амниотических вод и местоположение наиболее удобного для пункции пустого пакета вод, а также положение мочевого пузыря. Мониторинг сердцебиения плода выполняется и по завершении процедуры. Кожа пациентки внизу живота обрабатывается 70% спиртом и специальной спинальной иглой производится пункция выбранного участка амниотической полости. Положение иглы фиксируется на мониторе УЗ-аппарата, после чего удаляется троакар и производится забор биологического материала.

Биопсия ворсин хориона (БВХ) и биопсия плаценты

Срок беременности для проведения БВХ составляет 10–14 недель, для биопсии ворсин плаценты — 15–21 неделя. Процедура выполняется врачом-акушером-гинекологом медико-генетической службы. Процедуры биопсии осуществляются трансабдоминальным доступом методом «свободной» руки с

выполнением аспирационных тракций в течение 15–30 с. Материал после извлечения вымывается в стерильную чашку Петри с физиологическим раствором или питательной средой.

Амниоцентез

Рекомендуемый срок беременности для проведения амниоцентеза — 15–21 неделя. Процедура выполняется врачом-акушером-гинекологом медико-генетической службы. Забор амниотической жидкости проводится трансабдоминальным доступом методом «свободной» руки. Рекомендуемый объем вод составляет 10–20 мл. Такое количество аспирированной жидкости не влияет на общий объем амниотических вод, на перинатальные результаты и в то же время является достаточным для проведения необходимых исследований. Амниотические воды после извлечения помещают в стерильную пробирку. При заборе амниотической жидкости оцениваются ее физические свойства и прежде всего цвет, т. к. его изменение косвенно может свидетельствовать о внутриутробном состоянии плода и о перспективах развития беременности.

Культивирование клеток и приготовление цитогенетических препаратов

Культивирование, задача которого получить как можно большее количество размножающихся клеток, является важнейшим этапом между взятием биологического материала и приготовлением хромосомных препаратов.

БВХ и биопсия плаценты

При БВХ в операционной врачом лабораторной диагностики (цитогенетиком) проводится качественная и количественная оценка полученных ворсин. Количество материала оценивается в сравнении с приготовленными стандартами. Затем материал отправляется в лабораторию для дальнейшей обработки. Цитогенетическая диагностика ворсин хориона проводится двумя способами: прямым (полупрямым) методом и с помощью длительного культивирования.

Условия для цитогенетического исследования клеток БВХ:

- все этапы работы с культурой клеток выполняются в стерильном помещении — боксе;
- после взятия ворсины помещают в питательную среду или раствор Хэнкса с гепарином (3 мл гепарина и 0,7 мл антибиотика на 70 мл);
- до посадки клеток под контролем стереомикроскопа в стерильных условиях должен быть произведен отбор материала плода от материнских тканей; для дальнейшего анализа отбираются лишь те фрагменты, которые обладают типичной морфологией хориальных ворсин;
- для получения корректного результата кариотипирование должно быть сделано двумя методами;
- для цитогенетического анализа ворсин двумя методами необходимо 15–20 мг ворсин хориона;
- необходимо анализировать не менее 10 метафазных пластинок каждым методом.

Полупрямой метод

1. Посадка клеток БВХ: ворсины промыть в растворе Хэнкса и поместить в 2 чашки Петри с 3 мл питательной среды в каждой; чашки Петри поставить в инкубатор на 20–24 ч (37°C, 5% CO₂, 80% влажность).

2. Остановка клеточного деления: ввести 0,30 мкл колхицина и оставить в инкубаторе на 30 мин.

3. Гипотоническая обработка: удалить среду пипеткой и добавить 4 мл 1% раствора цитрата натрия, оставить на 10 мин при температуре 37°C.

4. Фиксация: добавить 4 мл 100% фиксатора и оставить на 3–5 мин, удалить пипеткой смесь гипотонического раствора и фиксатора и добавить 4 мл предварительно охлажденного 100% фиксатора, оставить при комнатной температуре не менее чем на 15–60 мин.

5. Приготовление препаратов: ворсины достать и подсушить на фильтровальной бумаге, часть ворсин перенести на предметное стекло, расположенное на нагревательном столике; ворсины поместить в каплю 60% или 80% уксусной кислоты на 10–20 с, осторожно перемещать каплю по стеклу, периодически добавляя ворсины и уксусную кислоту; стекла высушить, общее время нахождения ворсин в уксусной кислоте не должно превышать 6–7 мин; температура нагревательного столика, концентрация уксусной кислоты, длительность приготовления стекол подбираются эмпирическим путем.

6. Окрашивание препаратов:

- рутинное: поместить стекла в раствор краски Гимза примерно на 5 мин (время подобрать эмпирическим путем), промыть препараты водой и высушить стекла;

- дифференциальное: поместить препараты в раствор трипсина на 30–40 с, время обработки подобрать эмпирическим путем; промыть проточной водой; поместить препараты в раствор краски Гимза на 8–10 мин, промыть препараты водой и высушить стекла.

7. Анализ полученного препарата врачом-цитогенетиком.

Длительное культивирование

1. Посадка биологического материала:

- 1-й метод (с предварительной механической обработкой): ворсины измельчить, перенести в пробирку, оставить на 1 ч без среды, добавить 2 мл питательной среды, поставить в инкубатор и оставить до появления роста культуры (37°C, 5% CO₂, 80% влажность);

- 2-й метод (с предварительной ферментативной обработкой):

а) поместить ворсины в пробирку со скошенным дном, добавить 2 мл раствора трипсина, оставить в инкубаторе на 30–60 мин; пробирка должна быть в наклонном положении, периодически ворсины встряхивать;

б) центрифугировать 5 мин (1000 об./мин), удалить пипеткой трипсин, добавить 1 мл раствора коллагеназы, инкубировать 1–2 ч (37°C); пробирка должна быть в наклонном положении, периодически ворсины встряхивать;

в) центрифугировать 5 мин (1000 об./мин), удалить пипеткой раствор коллагеназы, добавить 2 мл питательной среды; оставить пробирку в инкубаторе до появления культурального роста (37°C, 5% CO₂, 80% влажность).

2. Ежедневный контроль роста культуры под инвертированным микроскопом, каждые 2–3 дня проводить смену среды.

3. Субкультивирование: удалить среду, добавить 2 мл раствора версена, удалить; добавить 2 мл трипсина, удалить; оставить в термостате на 5–6 мин, залить 1 мл среды и с помощью пипетки снять колонии; перенести суспензию клеток в чашки Петри, добавить среду, оставить в инкубаторе на 2–3 сут до получения монослоя. При посадке БВХ в чашки Петри субкультивирование может проводиться внутри них без переноса суспензии на другие единицы.

4. Остановка клеточного деления: ввести 0,3 мкл колхицина на 30–40 мин, оставить в инкубаторе.

5. Гипотоническая обработка: удалить пипеткой среду, добавить 2–3 мл гипотонического раствора (смешанная гипотония), оставить на 20 мин в термостате (37°C).

6. Фиксация: добавить 2 мл 50% фиксатора, удалить; добавить 2 мл 50% фиксатора, удалить; повторить обработку 50% фиксатором еще 2 раза; в последний фиксатор добавить 1 мл 100% фиксатора, удалить; залить 2 мл 100% фиксатора, удалить. Повторить обработку 100% фиксатором еще 2 раза.

7. Высушивание препаратов: метод высушивания подбирается эмпирическим путем с учетом температуры и влажности окружающей среды.

8. Поместить препараты на сутки в термостате (56°C).

9. Дифференциальное окрашивание препаратов: поместить препараты в раствор трипсина на 30–40 с, время обработки подобрать эмпирическим путем; промыть проточной водой; поместить препараты в раствор краски Гимза на 8–10 мин, промыть препараты водой и высушить стекла.

10. Анализ полученного препарата врачом-цитогенетиком.

Длительность цитогенетического исследования уменьшается при методе снятия *in situ* (культивирование и фиксация первичных колоний). В этом случае посадка материала производится в чашки Петри, чашки Петри с покровными стеклами, слайд-флаконы и исключается этап 3.

Проблемы при работе с культурой клеток ворсин хориона и возможные варианты их решения

Проблема	Решение
Неполные метафазные пластинки или наложение хромосом (более 3)	1. Изменить время нахождения ворсин в уксусной кислоте (при полупрямом методе). 2. Изменить тип гипотонии (например, сывороточную заменить на смешанную — КСІ::сывороточная 1::1). 3. Изменить концентрацию гипотонического раствора. 4. Изменить время гипотонической обработки.

Отсутствие роста или слабый рост	1. Изменить время нахождения ворсин в ферментативных растворах (п. 1а, 1б). 2. Встряхнуть ворсины до инкубирования в растворе коллагеназы (п. 1б).
Рост хороший, но после снятия мало метафазных пластинок на препаратах	1. Изменить концентрацию и время воздействия колхицина (п. 4). 2. Изменить соотношение спирта и уксусной кислоты в фиксаторе. 3. Осторожно добавлять и удалять растворы из чашек Петри (п. 5, 6).

Амниоцентез

Одним из основных методов изучения кариотипа плода является цитогенетический анализ культуры клеток амниотической жидкости, полученной во II триместре беременности. Принцип метода заключается в культивировании содержащихся в амниотической жидкости клеток и последующем их анализе. В культуре клеток амниотической жидкости наблюдается несколько типов клеток, различающихся по росту и жизнеспособности в культуре.

Условия для проведения цитогенетического исследования клеток амниотической жидкости:

- амниотическая жидкость берется в количестве 10–20 мл в стерильные пробирки;
- полученный материал как можно быстрее направляется в лабораторию для исследования, однако, при необходимости образцы могут быть транспортированы на большие расстояния;
- работа с амниотической жидкостью производится в стерильных условиях;
- анализ амниотической жидкости должен быть сделан минимум по двум независимым единицам;
- должно быть проанализировано не менее 20 метафазных пластинок.

Цитогенетическое исследование культур клеток амниотической жидкости

1. Посадка амниотической жидкости:

- 1-й метод: амниотическую жидкость центрифугировать, надосадочную жидкость удалить, оставив 1–2 мл; осадок клеток ресуспендировать и добавить 3–5 мл питательной среды; из исходного образца амниотической жидкости поставить 3–4 параллельных культуры, используя чашки Петри (35 мм), чашки Петри с покровными стеклами, слайд-флаконы или пробирки со скошенным дном; оставить в инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 80% влажность) на 7 сут;

- 2-й метод: в чашки Петри (35 мм), слайд-флаконы, пробирки со скошенным дном налить по 2–3 мл амниотической жидкости и добавить по 2 мл питательной среды; оставить в инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 80% влажность) на 7 сут;

- смена питательной среды: каждые 3-и сут менять питательную среду до получения не менее 6 колоний; после смены питательной среды — ежедневный контроль роста культуры под инвертированным микроскопом;

- субкультивирование: удалить питательную среду из пробирки, добавить 2 мл версена, удалить; добавить 2 мл трипсина, удалить; оставить пробирки в термостате на 5–6 мин; добавить 1 мл питательной среды, с помощью пипетки снять колонии, перенести суспензию клеток в чашки Петри, добавить среду до 2 мл, оставить в инкубаторе на 2–3 сут до получения монослоя; в исходную культуральную пробирку добавить свежую питательную среду для дальнейшего роста оставшихся клеток. Субкультивирование может проводиться внутри исходных слайд-флаконов и чашек Петри без переноса суспензии в другую посуду); хромосомные препараты готовятся методом *in situ* (культивирование и фиксация исходных колоний клеток) из клеток, культивируемых в чашках Петри на покровных стеклах; этап 3 исключается;

- остановка клеточного деления: ввести 0,3 мкл колхицина на 30–40 мин, оставить в инкубаторе;

- гипотоническая обработка: удалить среду, добавить 2–3 мл гипотонического раствора; оставить на 20 мин в термостате (37°C);

- фиксация: в гипотонический раствор добавить 2 мл 50% фиксатора, удалить; добавить 2 мл 50% фиксатора, удалить; повторить обработку 50% фиксатором еще 2 раза; в последний фиксатор добавить 2 мл 100% фиксатора, удалить, залить 2 мл 100% фиксатора, удалить; повторить обработку 100% фиксатором еще 2 раза;

- высушивание препаратов: метод высушивания подбирается эмпирическим путем с учетом температуры и влажности окружающей среды;

- оставить препараты на сутки в термостате (56°C);

- дифференциальное окрашивание препаратов: поместить препараты в раствор трипсина на 30–40 с, время обработки подобрать эмпирическим путем; промыть препараты проточной водой; поместить препараты в раствор краски Гимза на 8–10 мин, промыть препараты водой и высушить стекла;

- анализ полученного препарата врачом-цитогенетиком.

Проблемы при работе с культурой клеток амниотической жидкости и возможные варианты их решения

Проблемы	Причины	Решения
Хромосомы короткие	Слишком большое время обработки ингибитором	Уменьшить время обработки колхицином
Цитоплазма остается видимой	Проблема высушивания: слишком быстро или слишком медленно	Контролировать влажность (например, если влажность низкая, высушивание идет слишком быстро, то сушить препараты на влажной поверхности)
	Неудовлетворительная гипотоническая обработка	Изменить тип или концентрацию гипотонического раствора
Неполные	Неудовлетворительная	Изменить длительность

метафазные пластинки или наложение хромосом (более 3-х)	гипотоническая обработка	гипотонической обработки; предварительно нагревать до 37°C гипотонический раствор
	Проблема высушивания	Менять скорость высушивания препаратов в зависимости от влажности