

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



Д.Л. Пиневич

20 декабря 2012 г.

Регистрационный № 164-1112

**ПРОГРАММА МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ АНОМАЛИЙ ХРОМОСОМЫ X ПРИ МУЖСКОМ
И ЖЕНСКОМ БЕСПЛОДИИ, НАРУШЕНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ
ФУНКЦИИ И В СЛУЧАЯХ ХРОМОСОМНОЙ БОЛЕЗНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Политыко А.Д.,

Хурс О.М.,

Исакович Л.В.,

к.м.н. Наумчик И.В.

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
20.12.2012
Регистрационный № 164-1112

**ПРОГРАММА МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ АНОМАЛИЙ ХРОМОСОМЫ X
ПРИ МУЖСКОМ И ЖЕНСКОМ БЕСПЛОДИИ,
НАРУШЕНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ
И В СЛУЧАЯХ ХРОМОСОМНОЙ БОЛЕЗНИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.Д. Политыко, О.М. Хурс, Л.В. Исакович,
канд. мед. наук И.В. Наумчик

Минск 2012

Инструкция предназначена для специалистов медицинских учреждений, занимающихся лабораторной диагностикой генетических заболеваний и медико-генетическим консультированием.

Область применения: клиническая и лабораторная медицинская генетика.

Уровень внедрения: областной, республиканский.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование, которым должна располагать цитогенетическая лаборатория, представлено в инструкции Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 118-1109 от 12.02.2010 «Диагностика сложных форм хромосомной патологии человека на основе молекулярно-цитогенетических методов исследования».

Биологический материал для исследования патологии хромосомы X

В качестве биологического материала могут использоваться клетки лимфоцитов периферической крови, буккального эпителия, фибробластов кожи, ворсин хориона, амниотической жидкости и др.

Основные реагенты, необходимые при работе с помощью метода FISH, представлены в инструкции Минздрава РБ № 118-1109 от 12.02.2010.

ДНК-пробы, рекомендуемые для диагностики патологии хромосомы X

Выбор флуоресцентно-меченных ДНК-проб в каждом клиническом случае зависит от установленного при стандартном кариотипировании диагноза и продиктован задачами, поставленными в процессе медико-генетического консультирования пациента/семьи. В таблице представлены основные разновидности молекулярных ДНК-проб, которые могут быть использованы в диагностике.

Таблица — ДНК-пробы для диагностики аномалий хромосомы X

CEP — специфические центромерные	CEP X (DXZ1 alpha-satellite DNA) CEP Y (DYZ3 alpha-satellite DNA)
LSI — локус-специфические	LSI STS (steroid sulfatase gene) LSI SRY (sex determination region Y) LSI CEP Yq12 (DYZ1 satellit III DNA)
WCP — цельнохромосомные	WCP X

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Пре- и постнатальная молекулярно-цитогенетическая диагностика патологии хромосомы X с помощью метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) применяется для установления причин аномальной дифференцировки пола, мужского и женского бесплодия, нарушений репродуктивной функции, а также для установления и уточнения хромосомного дисбаланса, связанного с хромосомой X.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Молекулярно-цитогенетическая диагностика методом FISH

Проведение FISH. Приготовление цитогенетических препаратов и технология проведения FISH осуществляются в соответствии с инструкцией Минздрава РБ № 118-1109 от 12.02.2010.

Цитогенетический анализ результатов FISH проводится с использованием флуоресцентного микроскопа с набором соответствующих оптических фильтров. Флуоресцентные сигналы на хромосомах-мишенях должны быть достаточно интенсивными и иметь четкие очертания. Анализ сигналов на метафазных хромосомах включает просмотр не менее 20–25 метафаз при отсутствии мозаицизма. Для уточнения мозаичного статуса кариотипа просматривают 100 метафаз и более. Анализ сигналов на интерфазных хромосомах включает просмотр не менее 50 интерфазных клеток. Для уточнения мозаичного статуса кариотипа просматривают 500 интерфаз и более.

Интерпретация результата

Цитогенетический анализ завершается протоколированием результатов, внесением микрофотографий хромосом в компьютерную базу данных. Кариотип пациента, исследованный с помощью молекулярно-цитогенетического метода FISH, записывают согласно правилам Международной системы номенклатуры хромосом человека (Shaffer L.G. et al. An international system for human cytogenetic nomenclature (ISCN 2009), recommendations of the international standing committee on human cytogenetic nomenclature) с указанием вида использованной для диагностики ДНК-пробы.

Примеры записи кариотипов

Пример 1.

46,X,+mar.ish r(X)(p22q21)(wcpX+,pcpXp+,pcpXq+,KAL+,XIST+)

Интерпретация: запись означает, что в результате стандартного цитогенетического анализа в женском кариотипе установлено общее число хромосом, равное 46, в т. ч. обнаружена маркерная хромосома, эта информация ограничена точкой. Далее без интервала следует аббревиатура *ish*, означающая «*in situ hybridization*», и после интервала записаны результаты гибридизации на аномальную хромосому использованных ДНК-проб. Маркерной является кольцевая хромосома с точками разрыва-воссоединения Xp22 и Xq21.

Пример 2. 46,XX.ish der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)(cepX+,SRY+)

Интерпретация: запись означает, что у пациента мужского пола в результате стандартного цитогенетического анализа установлен женский кариотип. По результатам молекулярно-цитогенетического исследования выявлена аномалия одной из хромосом X, являющейся дериватом транслокации между участками коротких плеч хромосом X и Y и несущей ген *SRY* на сегменте Xp22.3.

Пример 3. 46,XY.ish del(X)(p22.3p22.3)(STS-)

Интерпретация: запись соответствует нормальному мужскому кариотипу, установленному при стандартном кариотипировании. Методом FISH

идентифицирована микроделеция области короткого плеча хромосомы X, включающая ген стероидной сульфатазы *STS*.

Пример 4. 46,XY.ish Xp22.3(STS+)

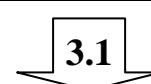
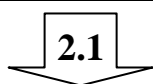
Интерпретация: запись соответствует нормальному мужскому кариотипу, установленному при стандартном кариотипировании. Методом FISH показано отсутствие микроделеции области короткого плеча хромосомы X с геном стероидной сульфатазы *STS*.

По завершении анализа оформляется заключение о результатах молекулярно-цитогенетической диагностики в соответствии с инструкцией Минздрава РБ № 118-1109 от 12.02.2010.

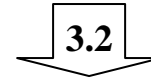
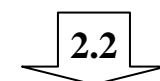
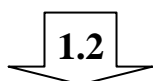
АЛГОРИТМЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АНОМАЛИЙ ХРОМОСОМЫ X В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ РИСКА

1. Пациенты с аномалиями половой дифференцировки и аномальным формированием половых органов

Группы риска		
подгруппа 1	подгруппа 2	подгруппа 3
Основные фенотипические признаки		
- гениталии по мужскому типу - гипоплазия яичек - азооспермия - недостаточность тестостерона	- двойственное строение гениталий - нарушение формирования внутренних половых органов	- гениталии по женскому типу - аномалии формирования наружных половых органов - нарушение формирования внутренних половых органов - низкорослость
Стандартное цитогенетическое исследование		



Варианты кариотипов, требующие дальнейшего тестирования гена <i>SRY</i>		
46,XX	46,XX	45,X 45,X/46,XX 46,XX
Молекулярно-цитогенетическое исследование (метод FISH)		



Тестирование наличия гена <i>SRY</i>
<i>Примечание:</i> следует сочетать указанную ДНК-пробу с ДНК-пробой для центромеры X или целой хромосомы X.

Результат при отсутствии в кариотипе гена *SRY*: ish Xp22.3(*SRY*-)

Возможные результаты при обнаружении в кариотипе гена *SRY*:

1. Ген *SRY* идентифицирован на одной из хромосом X:
ish der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)(cepX+,*SRY*+)
 2. Ген *SRY* идентифицирован на одной из аутосом (в записи кариотипа рекомендуется использовать символы ? и der):
45,X.ish Xp11.1-q11.1(cepX+),der(?)t(?;Y)(?;p11.3)(*SRY*+) или
46,XX.ish Xp11.1-q11.1(cepX×2),der(?)t(?;Y)(?;p11.3)(*SRY*+)
- В данных случаях проводится дополнительный анализ FISH с целью установления природы перестроенной аутосомной хромосомы

3

Анализ мозаичного статуса кариотипа по хромосоме X

2. Пациенты, имеющие малую маркерную хромосому в регулярном или мозаичном кариотипе

Группы риска	
подгруппа 1	подгруппа 2
Основные фенотипические признаки	
- женский пол - клинические признаки синдрома Шерешевского—Тернера	- мужской пол - клинические признаки синдрома Клайнфельтера
Стандартное цитогенетическое исследование	

1.1

2.1

Возможные варианты кариотипов

46,X,+mar 46,X,+mar/46,XX 45,X/46,X,+mar	47,XY,+mar 47,XY,+mar/47,XXY 47,XY,+mar/46,XY
Молекулярно-цитогенетическое исследование (метод FISH)	

1.2

2.2

Тестирование наличия центromеры хромосомы X или материала хромосомы X

Результат при обнаружении в составе маркерной хромосомы:
центromеры хромосомы X ish der(X)(DXZ1+)
материала хромосомы X ish der(X)(wcpX+)

3

Анализ мозаичного статуса кариотипа по хромосоме X

3. Пациенты с клинически предполагаемым рецессивным X-сцепленным ихтиозом и члены их семей

Группа риска: пациенты мужского пола с проявлениями ихтиоза

Основные фенотипические признаки

- сухость кожи, шелушение
- на лице, туловище, конечностях темно-серые многоугольные чешуйки
- ладони и стопы чистые
- недостаточность стероидной сульфатазы С
- крипторхизм (редко)
- задержка психоречевого развития/умственная отсталость (редко)
- низкорослость (редко)

Стандартное цитогенетическое исследование

Возможные варианты кариотипов

подгруппа 1	подгруппа 2
46,XY	46, Y,der(X)?t(X;Y)(p22;q12) 46, Y,der(X)?t(X;Y)(p22;q11.2)

Подгруппа 1

**Молекулярно-цитогенетическое исследование (метод FISH):
тестирование наличия гена STS**

**Результат при отсутствии делеции
гена STS: ish Xp22.3(STS+)**

**Результат при обнаружении делеции
гена STS: ish del(X)(p22.3p22.3)(STS-)**

**Тестирование с помощью субтеломерной ДНК-пробы
p-плеча хромосомы X**

Результат при наличии сигнала:
ish del(X)(p22.3p22.3)(subtelXp+) → интерстициальная делеция

Результат при отсутствии сигнала:
ish del(X)(p22.3)(subtelXp-) → терминальная делеция

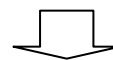
Нуллисомия по участку Xpter→p22.3

Дополнительные фенотипические признаки у пациентов — умственная отсталость и низкорослость

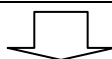
Обследование кровных родственников пробанда с установленным X-сцепленным ихтиозом
Молекулярно-цитогенетическое исследование (метод FISH)
<p>1. Обследование матери на гетерозиготное носительство делеции гена STS</p> <p>Тестирование с помощью ДНК-пробы на ген <i>STS</i>: $ish\ Xp22.3(STS_{x2})$ отсутствие делеции → спорадическая форма заболевания у пробанда</p> <p>Тестирование с помощью ДНК-пробы на ген <i>STS</i> и субтеломерной ДНК-пробы р-плеча хромосомы X: $ish\ del(X)(p22.3p22.3)(subtelXp+,STS-)$ наличие интерстициальной делеции на одной из хромосом X → унаследованная форма заболевания у пробанда</p> <p>$ish\ del(X)(p22.3)(subtelXp-,STS-)$ наличие терминальной делеции на одной из хромосом X → унаследованная форма заболевания у пробанда</p>
<p>2. Обследование деда или бабушки пробанда по материнской линии</p> <p>Тестирование с помощью ДНК-пробы на ген <i>STS</i>: $ish\ del(X)(p22.3p22.3)(STS-)$ наличие делеции → унаследованная форма заболевания у пробанда</p>
<p>3. При унаследованной форме заболевания в семье рекомендовано обследование родных сестер и братьев (при наличии специфических клинических проявлений) матери пробанда</p>

Подгруппа 2

Молекулярно-цитогенетическое исследование (метод FISH): тестирование наличия гена STS	
Результат при отсутствии делеции гена STS: $ish\ Xp22.3(STS+)$	Результат при обнаружении делеции гена STS: $ish\ der(X)(STS-)$



Тестирование с помощью ДНК-пробы гетерохроматина q-плеча хромосомы Y
<p>Результат при наличии сигнала: $ish\ der(X)t(X;Y)(p22.3;q12)(DYZ3+),Yq12(DYZ3+)$ → нуллисомия по участку Xpter → p22.3 $ish\ der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.2)(DYZ3+),Yq12(DYZ3+)$ → нуллисомия по участку Xpter → p22.3 и частичная дисомия по сегменту Yq12 <i>Дополнительные фенотипические признаки у пациентов – умственная отсталость и низкорослость</i></p>



Обследование кровных родственников пробанда с установленным X-сцепленным ихтиозом
Стандартное цитогенетическое исследование Молекулярно-цитогенетическое исследование (метод FISH)
<p>1. Обследование матери на наличие деривативной хромосомы X Тестирование с помощью ДНК-пробы на ген <i>STS</i> и ДНК-пробы гетерохроматина q-плеча хромосомы Y: 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.2).ish der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.2)(DYZ3+,STS-) или 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q12).ish der(X)t(X;Y)(p22.3;q12)(DYZ3+,STS-) У матери пробанда в кариотипе моносомия Xpter→p22.3: → 50% риск рождения мальчика с умственной отсталостью, → 50% дочерей будут иметь в кариотипе моносомию участка Xpter→p22.3 (деривативная хромосома X)</p>
<p>2.1. Обследование деда по материнской линии на наличие сбалансированной реципрокной транслокации между хромосомами X и Y Тестирование с помощью ДНК-пробы на ген <i>STS</i> и ДНК-пробы гетерохроматина q-плеча хромосомы Y. При отсутствии реципрокной транслокации в кариотипе – аномалия возникла спорадически в гамете При установлении носительства реципрокной транслокации: 46,t(X;Y)(p22.3;q12).ish t(X;Y)(p22.3;q12)(DYZ3+,STS-;DYZ3+,STS+) → все дочери будут иметь в кариотипе моносомию участка Xpter→p22.3 (деривативная хромосома X) → все сыновья будут иметь в кариотипе дисомию участка Xpter→p22.3 (деривативная хромосома Y) 46,t(X;Y)(p22.3;q11.2).ish t(X;Y)(p22.3;q11.2)(DYZ3+,STS-;STS+,DYZ3-) → все дочери будут иметь в кариотипе моносомию участка Xpter→p22.3 (деривативная хромосома X) → все сыновья будут иметь в кариотипе дисомию участка Xpter→p22.3 и частичную делецию сегмента Yq11.2 (деривативная хромосома Y)</p>
<p>2.2. Обследование бабушки пробанда по материнской линии на гетерозиготное носительство деривативной хромосомы der(X)t(X;Y)</p>
<p>3. При унаследованной форме заболевания в семье рекомендовано обследование родных сестер и братьев (при наличии специфических клинических проявлений) матери пробанда</p>

4. Пациенты со структурными аномалиями хромосомы X

Группа риска: пациенты женского пола
Основные фенотипические признаки
- низкорослость или высокорослость - нарушение полового развития

- нарушение репродуктивной функции
- возможны другие врожденные пороки развития

Стандартное цитогенетическое исследование

1

Наиболее распространенные варианты кариотипов

подгруппа 1	подгруппа 2	
46,X,r(X) 46,X,r(X)/46,X X	46,X,i(X)(q10) 46,X,i(X)(q10)/46,X X	46,X,i(X)(p10) 46,X,i(X)(p10)/46,X X
45,X/46,X,r(X)	45,X/46,X,i(X)(q10)	45,X/46,X,i(X)(p10)

Молекулярно-цитогенетическое исследование (метод FISH)

1.2

2.2

Тестирование наличия центромеры хромосомы X

Варианты перестроек хромосомы X после уточнения строения

ish r(X)(DXZ1+) – одинарное кольцо ish r(X)(DXZ1++) – двойное кольцо	ish i(X)(p10)(DXZ1+) – изохромосома X по p-плечу ish i(X)(q10)(DXZ1+) – изохромосома X по q-плечу ish idic(X)(q11.2)(DXZ1++) – изодицентрическая хромосома X по p-плечу ish idic(X)(p11.2)(DXZ1++) – изодицентрическая хромосома X по q-плечу
---	--

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При выполнении флуоресцентной *in situ* гибридизации:

1. Для сокращения количества актов гибридизации рекомендуется использовать «коктейли» ДНК-проб, т. е. комбинирование различных ДНК-проб.

2. Если в состав используемых локус-специфических ДНК-проб не входят «контрольные» участки, необходимо вносить их в смесь дополнительно. Для адекватной оценки наличия/отсутствия тестируемой «критической» области, содержащей гены *SRY* и *STS*, в «коктейле» ДНК-проб должен быть использован «контрольный» сегмент (флуоресцентный сигнал), позволяющий идентифицировать хромосому X.

3. ДНК-проба для «критического» региона хромосомы должна быть помечена флуорохромом, имеющим отличный от «контрольного» сигнала спектр свечения.

4. Не допускается комбинированное применение ДНК-проб одинакового спектра свечения.

5. Комбинированное применение двух или нескольких ДНК-проб одновременно требует перерасчета конечной концентрации каждой ДНК-пробы,

взятой в состав «коктейля» согласно рекомендациям производителя.

6. При отсутствии на препарате гибридизации флуоресцентной ДНК-пробы (отсутствие четкого флуоресцентного сигнала) следует изменить температуру денатурации ДНК-пробы либо температуру денатурации препарата хромосом. Температура подбирается экспериментально.

При интерпретации полученных результатов:

1. Отсутствие микроделеции гена *STS* у пациента с клиническим диагнозом X-сцепленный ихтиоз исключает хромосомную этиологию данного заболевания. В дальнейшем для таких пациентов требуется исследование мутаций в гене *STS*.

2. Для идентификации происхождения малой маркерной хромосомы в кариотипе 46,X,+mar рекомендуется использовать «коктейль» из ДНК-проб на центромеры хромосом X и Y с целью установления этиологии аномальной гоносомы в одном акте гибридизации. В случае если малая маркерная хромосома не является гоносомой, требуется дальнейшее молекулярно-цитогенетическое исследование для установления ее аутосомной природы.