

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2014 г.

Регистрационный № 201-1213



МЕТОД КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА
НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ И ХРОМОСОМНЫХ
БОЛЕЗНЕЙ ПЛОДА И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПОЗДНИХ
МЕТАБОЛИЧЕСКИХ И СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ
БЕРЕМЕННОСТИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Гусина Н.Б., к.м.н. Прибушеня О.В., к.м.н Гусина А.А.,
Лемешевская Т.В., к.м.н Наумчик И.В.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

06.03.2014

Регистрационный № 201-1213

**МЕТОД КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА
НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ И ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ
ПЛОДА И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПОЗДНИХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ
И СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ БЕРЕМЕННОСТИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук Н.Б. Гусина, канд. мед. наук О.В. Прибушеня, канд.
мед. наук А.А. Гусина, Т.В. Лемешевская, канд. мед. наук И.В. Наумчик

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью создания эффективной системы пренатального скрининга на ранних сроках беременности для диагностики врожденных пороков развития и хромосомных болезней плода и прогнозирования поздних метаболических и сосудистых осложнений беременности.

Инструкция предназначена для врачей-акушеров-гинекологов и врачей-генетиков медико-генетических центров, врачей лабораторной диагностики, а также врачей-акушеров-гинекологов женских консультаций и учреждений здравоохранения.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Оборудование для выполнения ультразвукового исследования (УЗИ) — УЗ-аппараты высокого и экспертного класса, оснащенные датчиками конвексного и эндополостного типа, опциями, позволяющими провести доплерометрическое исследование.

2. Оборудование для измерения артериального давления (АД) осциллометрическим методом — электронные откалиброванные автоматические тонометры.

3. Оборудование для измерения индекса массы тела беременной — весы, ростомер.

4. Комплект оборудования для измерения концентрации сывороточных маркеров.

5. Реагенты для измерения концентрации сывороточных маркеров: α -фетопротеин (hAFP), свободная бета-субъединица хорионического гонадотропина (free hCGb); ассоциированный с беременностью плазменный белок А (РАРР-А); ингибин А; свободный эстриол (uE30); плацентарный инсулиноподобный фактор роста (PIGF).

6. Аппаратное и программное обеспечение для расчета рисков хромосомной патологии плода и поздних метаболических и сосудистых осложнений беременности.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Беременность в сроке 11–13 недель.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Материал для исследования

Венозная кровь.

Алгоритм проведения комбинированного пренатального скрининга беременных

1. Ультразвуковое исследование.

2. Измерение АД.

3. Измерение концентрации сывороточных маркеров хромосомной патологии плода и поздних метаболических и сосудистых осложнений беременности.

Этапы комбинированного и контингентного пренатального скрининга

Расчет риска по хромосомным болезням

1. Оценка риска наличия хромосомной патологии у плода в 11–13 недель беременности с использованием данных УЗИ плода, определения концентрации сывороточных маркеров хромосомной патологии плода (hAFP, free hCGb, PAPP-A). По результатам скрининга в I триместре беременности формируются группы беременных с риском хромосомной патологии у плода:

- группа беременных с высоким ($>1:50$) риском хромосомной патологии у плода. Лицам этой группы рекомендуется проведение инвазивной пренатальной диагностики в I триместре беременности;

- группа беременных с низким ($<1:1001$) риском хромосомной патологии у плода. В этой группе дополнительный биохимический скрининг во II триместре беременности не проводится;

- группа беременных с промежуточным ($1:51–1:1000$) риском хромосомной патологии у плода. Пациенткам этой группы рекомендуется исследование дополнительных УЗ-маркеров хромосомной патологии плода (оценка носовой кости, кровотока в венозном протоке, трикуспидальной регургитации) в I триместре. В случае обнаружения хотя бы одного из исследуемых маркеров необходимо рекомендовать инвазивную пренатальную диагностику. Беременным, у которых эти маркеры не выявлены, необходимо рекомендовать биохимический скрининг во II триместре беременности с расчетом суммарного риска.

2. Оценка риска наличия хромосомной патологии у плода в 15–19 недель в группе беременных промежуточного риска с использованием quadro-теста (hAFP, free hCGb, ингибин А, uE30). По результатам скрининга в I и II триместрах оценить суммарный риск наличия хромосомной патологии у плода. При величине суммарного риска, превышающем $1:360$, пациентке необходимо рекомендовать проведение инвазивной пренатальной диагностики во II триместре беременности. При величине суммарного риска менее $1:360$ проведение инвазивной пренатальной диагностики не рекомендуется.

Расчет риска по поздним метаболическим и сосудистым осложнениям беременности

1. Оценка риска развития поздних метаболических и сосудистых осложнений беременности в 11–13 недель беременности с использованием данных анамнеза, доплерометрии маточных артерий, средних значений АД, концентрации PIGF, PAPP-A.

2. По результатам скрининга выделить группу беременных с высоким риском развития поздних метаболических и сосудистых осложнений беременности ($1:50$ и выше) и направить к врачу-акушеру-гинекологу для проведения превентивных профилактических мероприятий.

Алгоритм проведения основных этапов комбинированного пренатального скрининга в I и II триместрах беременности и расчета риска по гестозу представлен на рис.

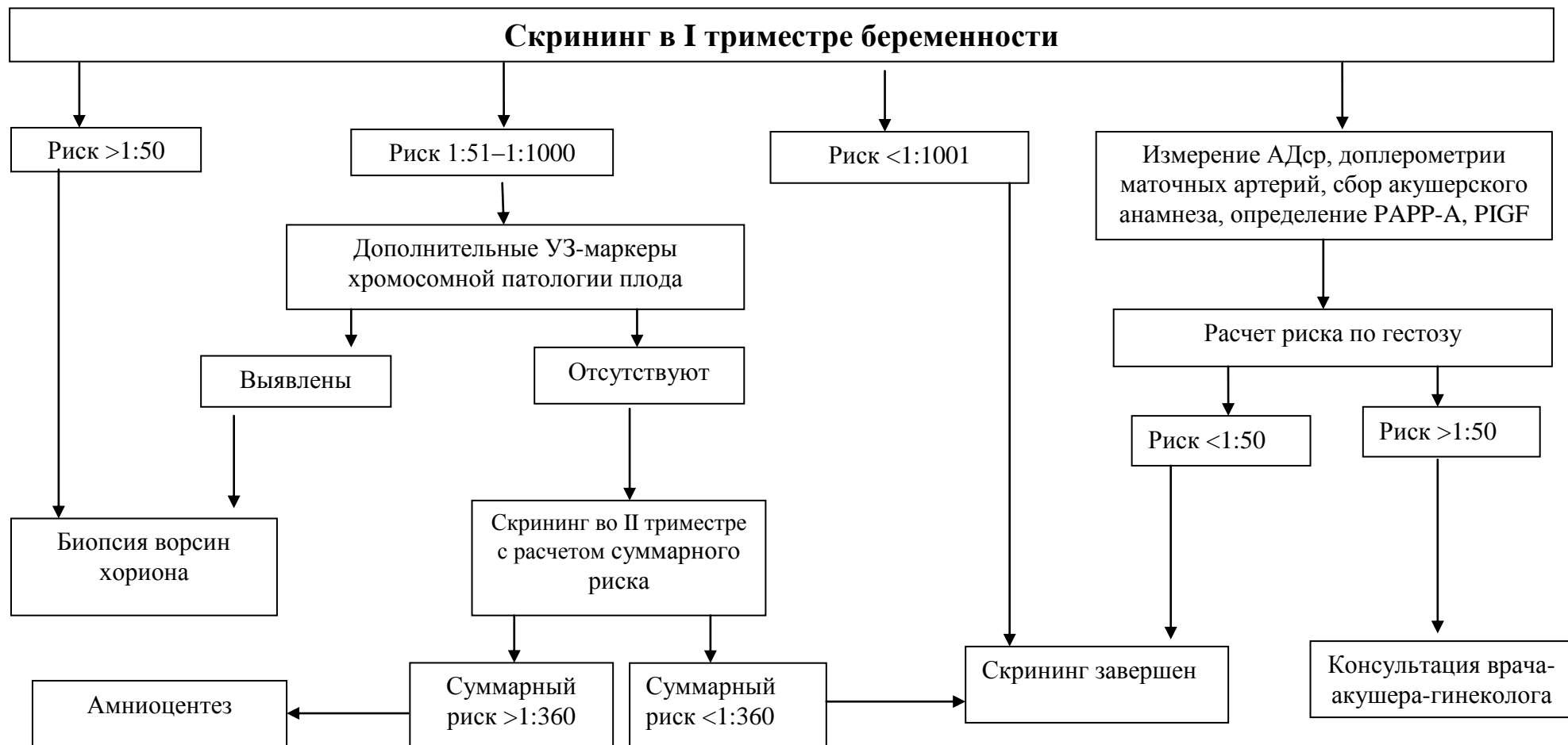


Рисунок — Алгоритм пренатального скрининга в I и II триместрах беременности на врожденные пороки развития и прогнозирование поздних метаболических и сосудистых осложнений

Алгоритм выполнения УЗИ в I триместре беременности

1. УЗИ матки и придатков, при котором устанавливаются особенности их строения.

2. УЗИ плода, при котором устанавливается:

- количество плодов, амниотических полостей и хорионов;
 - жизнедеятельность эмбриона с регистрацией сердечной деятельности;
 - расположение хориона и его особенности;
 - копчико-теменной размер (КТР) плода в мм;
- толщина воротникового пространства (ТВП, NT) с соблюдением следующих обязательных условий: КТР не менее 38 мм и не более 80 мм, строгая сагиттальная проекция плода, изображение должно занимать не менее 2/3 экрана, измерение проводят в момент движения плода от амниотической мембраны, выполняют не менее 3 измерений, каллипер располагают по внутреннему краю ТВП, выполнение измерений при чрезмерном сгибании или разгибании головы плода недопустимо;

- анатомия плода: контур головы, структуры головного мозга, позвоночный столб, целостность передней брюшной стенки, сердце, желудок, мочевого пузыря, конечности, движения плода (сгибание/разгибание конечностей).

3. Поиск дополнительных УЗ-маркеров хромосомной патологии плода:

- наличие или отсутствие носовой кости (НК);
- особенности кровотока в венозном протоке;
- наличие трикуспидальной регургитации.

4. Доплерометрия маточных артерий в I триместре. Исследование проводится трансабдоминально в следующем порядке:

- вывести матку, шейку матки и цервикальный канал в сагиттальной плоскости;

- с использованием цветового доплеровского картирования определить маточные артерии при медленном смещении датчика латеральнее цервикального канала до визуализации парацервикальной сосудистой сети. Правильность расположения точки измерения контролировать путем получения характерной кривой скорости кровотока (КСК) маточной артерии и характерного для данного сосуда аудиосигнала;

- использовать импульсный доплеровский режим с контрольным объемом 2 мм, высокочастотный фильтр установить на минимум (частота — 2,5 кГц);

- измерение скоростей кровотока в маточных артериях выполнять в точке, находящейся на уровне внутреннего зева шейки матки до отхождения аркуатных артерий с левой и правой сторон при угле инсонации менее 30°, скорости кровотока более 60 см/с. Для измерения необходимо получить КСК, состоящую не менее чем из четырех циклов.

Алгоритм измерения среднего АД

Измерение АД проводится следующим образом:

- для измерения АД пациентка должна быть расслаблена (отдых не менее 5 мин);

- измерять АД в положении сидя с упором спины и поддержкой обеих рук, манжеты располагать на уровне сердца;

- размеры манжеты должны соответствовать окружности плеча пациентки (не менее чем в 1,5 раза длиннее окружности плеча);

- измерение АД выполнять одновременно на обеих руках путем серии последовательных измерений с одномоментными интервалами пока разница между двумя последовательными измерениями на обеих руках не снизится до 10 мм рт. ст. для систолического и 6 мм рт. ст. для диастолического давления. Показатели фиксировать с точностью до 2 мм рт. ст.;

- для расчета риска использовать среднее АД (АДср), определяемое по формуле:

$$\text{АДср} = (\text{АДс} + \text{АДд}) / 3,$$

где АДс — систолическое АД;

АДд — диастолическое АД.

Алгоритм измерения концентрации сывороточных маркеров хромосомной патологии плода и поздних метаболических и сосудистых осложнений беременности

Правила забора и подготовки материала для исследования

Для определения концентрации hAFP, free hCGb, PAPP-A, ингибина А, uE30, PIGF необходима венозная кровь в количестве 5 мл, взятая в сухую чистую пробирку. Забор крови необходимо проводить в день выполнения УЗИ. На пробирке указывается фамилия и инициалы пациентки, дата забора материала. После забора крови пробирку следует оставить при комнатной температуре для образования сгустка, затем центрифугированием отделить сыворотку. Образцы сыворотки могут храниться при температуре +2—+8°C в течение 2 сут. При необходимости хранения в течение более длительного времени образцы требуется заморозить при температуре -20°C.

Определение концентрации сывороточных маркеров хромосомной патологии плода и поздних метаболических и сосудистых осложнений беременности

Определение концентрации hAFP, free hCGb, PAPP-A проводится в соответствии с рекомендациями производителя реагентов.

Методика определения концентрации PIGF

Извлечь необходимое количество стрипов из упаковки. В ячейки микропланшета внести по 25 мкл калибровочных растворов, исследуемых и контрольных образцов сыворотки, добавить по 250 мкл буфера для анализа (assay buffer), инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре. После окончания инкубации ячейки промыть трижды промывающим буфером (400 мкл). Добавить по 100 мкл ферментного конъюгата и инкубировать 60 мин при комнатной температуре. После окончания инкубации ячейки промыть трижды промывающим буфером (400 мкл). Добавить по 100 мкл ферментного комплекса и инкубировать 30 мин при комнатной температуре. После окончания инкубации ячейки промыть трижды промывающим буфером (400 мкл). Добавить по 100 мкл раствора субстрата и инкубировать 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации добавить по 100 мкл останавливающего раствора. Измерить

оптическую плотность образцов при длине волны 450 ± 10 нм с помощью флуориметра или микропланшетного ридера. Расчет концентрации PIGF в образцах провести с помощью программного обеспечения MultiCalc.

Методика определения uE30

Реагенты для определения уровня uE30 выдержать при комнатной температуре не менее 2 ч. Лиофилизированные калибраторы развести в 1,1 мл деионизированной воды, перемешать. Растворы калибраторов оставить при комнатной температуре на 30–60 мин. Лиофилизированный метчик развести 0,75 мл деионизированной воды, перемешать. Раствор метчика оставить при комнатной температуре на 30–60 мин. Промывающий раствор развести в 25 раз деионизированной водой. Приготовить разведение антител к uE30, смешивая 45 мкл стокового раствора антител с 1,5 мл буфера (на один стрип). Приготовить разведение метчика: смешивать 15 мкл стокового раствора метчика с 1,5 мл буфера (на 1 стрип). В ячейки микропланшета внести по 100 мкл раствора антител к uE30, инкубировать в течение 15 мин при комнатной температуре и медленном помешивании. Добавить по 50 мкл калибровочных растворов, исследуемых и контрольных образцов сыворотки, добавить по 100 мкл разведения метчика, инкубировать в течение 1 ч (+10 мин) при комнатной температуре при медленном помешивании. После окончания инкубации ячейки промыть промывающим буфером. Добавить по 200 мкл усиливающего раствора, инкубировать 5 мин при комнатной температуре при медленном помешивании. Измерить флуоресценцию с помощью флуориметра. Расчет концентрации uE30 в образцах провести с помощью программного обеспечения MultiCalc.

Методика определения концентрации ингибина А

Исследуемые образцы и реагенты выдержать при комнатной температуре в течение 2 ч. Извлечь необходимое количество стрипов из упаковки. В ячейки микропланшета внести по 50 мкл калибровочных растворов, исследуемых и контрольных образцов сыворотки, добавить по 50 мкл буферного раствора А и по 50 мкл буферного раствора Б. Инкубировать в течение 3 ч при комнатной температуре и при постоянном помешивании (500–600 об./мин). После окончания инкубации промыть ячейки микропланшета 5 раз однократным промывающим буфером (350 мкл). Развести энзимный конъюгат в 50 раз. Добавить по 100 мкл разведенного энзимного конъюгата, инкубировать в течение 60 мин при постоянном помешивании (500–600 об./мин) при комнатной температуре. После окончания инкубации ячейки промыть 6 раз однократным промывающим буфером (350 мкл). Добавить по 100 мкл раствора субстрата и инкубировать 15 мин при комнатной температуре и постоянном помешивании (500–600 об./мин). По окончании инкубации добавить по 100 мкл останавливающего раствора. Измерить оптическую плотность образцов при длине волны 450 ± 10 нм с помощью микропланшетного ридера. Расчет концентрации ингибина А в образцах провести с помощью программного обеспечения MultiCalc.

Алгоритм расчета риска хромосомной патологии плода

Расчет риска наличия хромосомной патологии у плода по результатам биохимических исследований проводить с помощью специальных компьютерных программ (LifeSyckl, Astria) и/или бесплатных электронных калькуляторов

(<http://www.fetalmedicine.com/fmf/online-education/08-pyramid-of-care/>), в ячейки которых необходимо ввести следующие данные:

1. Возраст беременной.
2. Масса тела беременной, кг.
3. Анамнестические данные — синдром Дауна у ребенка, курение во время беременности, перенесенный гепатит.
4. Метод зачатия — самостоятельный; с использованием ЭКО.
5. КТР плода, мм.
6. NT плода, мм.
7. Значение белка сыворотки крови hAFP, МоМ.
8. Значение белка сыворотки крови PAPP-A, МоМ.
9. Значение белка сыворотки крови free hCGb, МоМ.
10. Бипариетальный диаметр плода (БПД), мм
11. Значение белка сыворотки крови uE30, МоМ.
12. Значение белка сыворотки крови ингибина А, МоМ.

Оценку суммарного риска наличия хромосомной патологии у плода по результатам скрининга I и II триместров беременности выполнить следующим образом: индивидуальный риск I триместра умножить на риск, полученный во II триместре, и разделить на возрастной риск беременной.

Пример: пациентка П., 32 года. Беременность первая, наступила спонтанно. Возрастной риск по синдрому Дауна 1:660. Риск по синдрому Дауна по результатам скрининга I триместра 1:355 — промежуточный. При УЗИ в I триместре косвенных маркеров хромосомной патологии не выявлено. Риск наличия хромосомной патологии у плода в 15–19 недель с использованием quadro-теста (hAFP, free hCGb, ингибин А, uE30) составляет 1:245. Суммарный риск наличия хромосомной патологии у плода — 1:125 и беременной рекомендовано проведение амниоцентеза.

Алгоритм расчета риска развития метаболических и сосудистых осложнений

Риск развития поздних метаболических и сосудистых осложнений зависит от конституции и этнической принадлежности беременной, повышается при сопутствующих экстрагенитальных заболеваниях, семейном анамнезе гестоза, применении препаратов-индукторов овуляции или ЭКО, курении во время беременности и др. Риск выше у рожавших женщин, которые перенесли гестоз в предыдущую беременность.

Расчет пациент-специфического риска развития гестоза проводится с помощью специальных компьютерных программ и/или бесплатных электронных калькуляторов (<https://courses.fetalmedicine.com/calculator/pe?locale=en>), в ячейки которых необходимо ввести следующие данные:

1. Возраст беременной.
2. Масса тела беременной, кг.
3. Рост беременной, см.
4. Расовое происхождение беременной.

5. Анамнестические данные — ранее диагностированные сахарный диабет I типа, хроническая гипертензия, системная красная волчанка; курение во время беременности, отягощенный семейный анамнез гестоза.

6. Метод зачатия — самостоятельный, с использованием препаратов индукторов овуляции; с использованием ЭКО.

7. Акушерский анамнез — нерожавшие (отсутствие беременности после 22 недель); рожавшие без гестоза в предыдущие беременности; рожавшие с развитием гестоза в предыдущую беременность.

8. КТР плода, мм.

9. IP маточных артерий, МоМ.

10. Значение АДср, МоМ.

11. Значение белка сыворотки крови PAPP_A, МоМ.

12. Значение белка сыворотки крови PIGF, МоМ.

Пример: пациентка К., 33 года, европеоидной расы, рост 156 см и масса тела 86 кг. Страдает сахарным диабетом I типа в течение 15 лет.

Беременность первая, наступила спонтанно. Прошла комбинированный пренатальный скрининг I триместра беременности в сроке гестации 12 недель и 1 день при значении КТР плода 56,1 мм. Установлена одноплодная беременность. Патологии со стороны плода не выявлено. Значения АДср — 1,083 МоМ (81,5 centile), IP — 0,767 МоМ (17,7 centile), PAPP-A — 0,81 МоМ, PIGF — 1,922 МоМ (centile). Риск развития раннего гестоза (до 34 недель) составил 1:972, риск развития гестоза до родов — 1:13. Беременная относится к группе высокого риска по развитию гестоза с поздним началом и низкого риск по развитию тяжелого гестоза с ранним началом.

При таких же исходных данных в случае, если пациентка перенесла гестоз в предыдущей беременности, а также имеет отягощенный семейный анамнез по данному акушерскому осложнению, риск развития раннего гестоза составит 1:92, позднего — 1:3. Таким образом, беременная относится к группе высокого риска по развитию гестоза как с ранним, так и с поздним началом и нуждается в проведении превентивных мероприятий по снижению или нивелированию данного риска.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Ошибки, связанные с нарушением алгоритма выполнения УЗИ. Для предупреждения возникновения ошибок этой группы необходимо строго соблюдать порядок проведения УЗИ согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 30.01.2012 № 83 «О совершенствовании организации проведения пренатальных ультразвуковых исследований по выявлению пороков развития и хромосомной патологии у плода в Республике Беларусь».

2. Ошибки, связанные с нарушением правил забора, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований. Для предупреждения возникновения ошибок такого рода необходимо строго

соблюдать правила работы с биологическим материалом и проведения лабораторных исследований.