

Одобен Объединенной комиссией
по качеству медицинских услуг
Министерства здравоохранения
Республики Казахстан
от «28» июня 2024 года
Протокол №210

**КЛИНИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ МЕДИЦИНСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА
ИНВАЗИВНАЯ ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА В ГРУППАХ
ПОВЫШЕННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА**

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Код(ы) МКБ-10:

МКБ-10	
Код	Название
Q90	Синдром Дауна
Q91	Синдром Эдвардса и синдром Патау
Q92	Другие трисомии и частичные трисомии аутосом, не классифицированные в других рубриках
Q93	Моносомии и утраты части аутосом, не классифицированные в других рубриках
Q95	Сбалансированные перестройки и структурные маркеры, не классифицированные в других рубриках
Q96	Синдром Тернера
Q97	Другие аномалии половых хромосом, женский фенотип, не классифицированные в других рубриках
Q98	Другие аномалии половых хромосом, мужской фенотип, не классифицированные в других рубриках
Q99	Другие аномалии хромосом, не классифицированные в других рубриках
G12.0	Детская спинальная мышечная атрофия, I тип (Верднига-Гоффмана)
G71.0	Мышечная дистрофия Дюшенна или Беккера
E84	Муковисцидоз
E70.0	Фенилкетонурия

1.2 Дата разработки/пересмотра протокола: 2023 год.

1.3 Сокращения, используемые в протоколе:

ИПД	-	Инвазивная пренатальная диагностика
-----	---	-------------------------------------

1.4 Пользователи протокола: медицинские генетики, акушер-гинекологи.

1.5 Категория пациентов: беременные, относящиеся к группе высокого (≥ 150) и промежуточного риска (отсечка 1:100-1:1000) по хромосомной аномалии после прохождения комбинированного теста первого триместра (11 недель – 13 недель 6 дней) и ультразвукового скрининга в сроке 19-21 недель в рамках пренатального скрининга [1]; при известном семейном носительстве патологичных генов некоторых моногенных заболеваний, таких как Спинальная мышечная амиотрофия, миодистрофия Дюшенна-Беккера и др.

1.6 Определение:

Инвазивная пренатальная диагностика (далее – ИПД) – методы диагностики хромосомной и моногенной патологии у плода, осуществляемые путем внутриматочного прокола с забором материала плодового происхождения для цитогенетического, молекулярно-цитогенетического или молекулярно-генетического анализа [1].

Кратность применения: исследование проводится однократно.

Техника проведения: биопсия хориона, плацентоцентез, амниоцентез, кордоцентез.

2. МЕТОДЫ, ПОДХОДЫ И ПРОЦЕДУРЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ [1]:

2.1 Цель проведения процедуры/вмешательства:

Исключение хромосомной или моногенной патологии плода.

2.2 Показания и противопоказания к проведению процедуры/вмешательства:

Показания к проведению процедуры/вмешательства:

- Возраст беременной женщины 37 лет и старше;
- Наличие в анамнезе случаев рождения ребенка с ВПР или хромосомной патологией;
- Семейное носительство хромосомных или генных мутаций;
- Выявление анатомических аномалий развития плода при проведении ультразвукового скрининга;
- Обнаружение ультразвуковых маркеров хромосомной патологии у плода при проведении ультразвукового скрининга;
- Индивидуальный генетический риск после прохождения комбинированного теста первого триместра 1:150 и выше.

Противопоказания к проведению процедуры/вмешательства:

- Угроза прерывания беременности;
- Акушерская патология;
- Отрицательный резус фактор у плода.

2.3 Перечень основных и дополнительных диагностических мероприятий:
не требуется.

2.4 Требования к проведению процедуры и вмешательства:

Условия для проведения (соблюдение мер безопасности, санитарно-противоэпидемический режим):

- Меры безопасности и противоэпидемический режим необходимо соблюдать согласно Санитарным правилам «Санитарно-эпидемиологические требования к объектам здравоохранения», утвержденным постановлением Правительства Республики Казахстан от 11 августа 2020 года № ҚР ДСМ 96/2020.
- Требования к квалификационной категории представлены в Правилах организации скрининга, утвержденных Приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 9 сентября 2010 года № 704.
- Сроки проведения ИПД:
 - с 11 недель 0 дней до 14 недель 0 дней беременности – биопсия ворсин хориона;
 - с 14 недель 0 дней до 18 недель 0 дней беременности – плацентоцентез;
 - с 16 недель 0 дней до 20 недель 0 дней беременности – амниоцентез;
 - с 20 недель 0 дней до 21 недели 0 дней беременности – кордоцентез.

Требования к оснащению:

Требования к минимальному оснащению оборудованием представлен в Стандарте организации оказания медико-генетической помощи в Республике Казахстан, утвержденном Приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 14 сентября 2023 года № 149.

Приготовление растворов и реагентов [2]

Рабочий раствор гепарина – раствор гепарина 5000 МЕ/мл, необходимо развести с дистиллированной водой 1:20 соответственно.

Рабочий раствор колхицина – 0,01 г колхицина на 10 мл дистиллированной воды. Хранить при +4°C в течение года.

Гипотонический раствор – 0,9% натрий лимоннокислый трёхзамещённый (цитрат натрия) – 90 мг соли растворить в 10 мл дистиллированной воды.

В чистые флаконы вносится по 4,0 мл гипотонического раствора и 0,4 мл рабочего раствора колхицина. Флаконы помещаются в термостат при 37°C.

Фиксатор – смесь этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1, соответственно. Фиксатор охлаждается в морозильной камере.

60% раствор уксусной кислоты – 3,0 мл ледяной уксусной кислоты + 2 мл дистиллированной воды.

Примечание: фиксатор, гипотонический раствор, 60% раствор уксусной кислоты следует готовить в день использования.

Раствор трипсина: 25 мг порошка трипсина растворить в 100 мл буфера для трипсина (pH 7,2-7,3).

Буфер для трипсина (pH 7,2-7,3): растворить в 1000 мл дистиллированной воды:

8 г NaCl;

0,4 г KCl;

0,725 г Na₂HPO₄;

0,12 г KH₂PO₄.

проверить значение pH. Раствор хранится при комнатной температуре до 1 месяца.

Буфер для краски (pH 6,8): растворить в 1000 мл дистиллированной воды 8 г NaCl;

0,2 г KCl; 1,15 г Na₂HPO₄;

0,2 г KH₂PO₄

проверить значение pH. Раствор хранится при комнатной температуре до 1 месяца.

Методы приготовления препаратов хромосом:

- Приготовление препаратов хромосом из лимфоцитов пуповинной крови плода представлено в приложении 1.
- Приготовление препаратов хромосом из ворсин хориона/плаценты представлено в приложении 2.
- Протокол культивирования амниотической жидкости в CO₂ инкубаторе представлен в приложении 3.
- Протокол культивирования амниотической жидкости без инкубатора CO₂ представлен в приложении 4.
- Приготовление препаратов хромосом и интерфазных клеток для гибридизации представлено в приложении 5.
- Правила забора ворсин хориона и плаценты для проведения молекулярно-генетических исследований представлены в приложении 6.

2.5 Индикаторы эффективности процедуры/вмешательства [5]:

Рекомендации по минимальному уровню разрешения дифференциальной окраски в зависимости от показаний для исследования

Показания для исследования	Требования к минимальному уровню разрешения дифференциальной окраски GTG (или другой эквивалентной окраски) в зависимости от показания для исследования (число бэндов на гаплоидный набор)
Подтверждение анеуплоидий на препаратах из клеточных культур (лимфоцитов крови, клеток амниотической жидкости), а также на препаратах, приготовленных прямым методом из нативных образцов и/или краткосрочных органных культур ворсин хориона/плаценты	<300 бэндов

Исключение крупных структурных хромосомных перестроек на препаратах из клеточных культур (лимфоцитов крови, клеток амниотической жидкости), а также на препаратах, приготовленных прямым методом из нативных образцов и/или краткосрочных органных культур ворсин хориона/плаценты	300 бэндов
Идентификация и исключение мелких структурных перестроек на препаратах из клеточных культур (лимфоцитов крови, клеток амниотической жидкости), а также на препаратах, приготовленных прямым методом из нативных образцов и/или краткосрочных органных культур ворсин хориона/плаценты	400 бэндов
Идентификация и исключение мелких структурных перестроек на препаратах из культуры лимфоцитов при обследовании пациентов с задержкой психомоторного развития, врожденными пороками и/или микроаномалиями развития, а также супружеских пар с привычным невынашиванием беременности	500 бэндов*
Подозрение на синдромы микроструктурных хромосомных перестроек (когда нет возможности использовать FISH-зонды)	700 бэндов

*При обнаружении нормального кариотипа в случае выраженной клинической картины (множественные врожденные пороки и/или аномалии развития, умственная отсталость) для уточнения диагноза желательно использование молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических технологий

* Система оценки качества G-окраски, рекомендации по минимальному количеству метафазных пластинок/интерфазных ядер, необходимых для проведения цитогенетического/молекулярно-цитогенетического исследования и минимальное число метафазных пластинок/интерфазных ядер, необходимых для исследования, в зависимости от ДНК-зонда представлены в приложениях 7, 8 и 9.

3. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОТОКОЛА:

3.1 Список разработчиков:

- 1) Абильдинова Гульшара Жусуповна – доктор медицинских наук, профессор, врач-генетик высшей категории, руководитель персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 2) Боровикова Анна Викторовна – врач-генетик первой категории персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 3) Жабаква Жанна Маратовна – врач-генетик второй категории персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 4) Нурпеисова Алтын Алданышова – заведующая клинико-фармакологическим отделом РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 5) Хамидуллина Зайтуна Гадиловна – кандидат медицинских наук, доктор философии (PhD), заведующая кафедрой Акушерства и гинекологии №1 НАО «Медицинский университет Астана»;

- 6) Байысбекова Альфия Гильматовна – кандидат медицинских наук, врач-генетик высшей категории, управляющий директор Международного клинического центра репродуктологии PERSONA;
- 7) Жумажанова Меруерт Абильхановна – врач-генетик высшей категории, заведующая отделением медико-генетической консультации Центра охраны плода ГКП на ПХВ «Городская многопрофильная больница №2»;
- 8) Кошкарлова Калжан Абишевна – врач-цитогенетик высшей категории отделения медицинской генетики ГКП на ПХВ «Городской центр репродукции человека»;
- 9) Мирзахметова Динара Досалыевна – PhD, МРН, врач акушер-гинеколог высшей категории, медицинский директор клиники «Экомед».
- 10) Авдеев Андрей Владиславович – доктор философии (PhD), руководитель отдела оценки технологий здравоохранения и стратегического развития РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
- 11) Бариева Гульзада Жумабаевна – магистр общественного здравоохранения (МРН), ведущий специалист отдела оценки технологий здравоохранения и стратегического развития РГП «Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ.

3.2 Конфликт интересов: нет.

3.3 Данные рецензента:

- 1) Бапаева Гаури Биллахановна – д.м.н., врач высшей категории по специальности «акушерство и гинекология», директор клинического академического департамента женского здоровья корпоративного фонда «УМС»;
- 2) Ракишева Зере Баяновна – к.м.н., врач-генетик высшей категории генетической лаборатории «TreeGene».

3.4 Условия пересмотра протокола:

пересмотр протокола через 5 лет после его опубликования и с даты его вступления в действие или при наличии новых методов с уровнем доказательности.

3.5 Список использованной литературы:

1. Об утверждении Правил организации скрининга. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 9 сентября 2010 года № 704. зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 15 сентября 2010 года № 6490.
2. Patricia Minehart Miron, Preparation, Culture, and Analysis of Amniotic Fluid Samples, UMass Memorial Medical Center, Worcester, Massachusetts, Corresponding author: patricia.miron@umassmemorial.org.

3. Giovannopoulou E, Tsakiridis I, Mamopoulos A, Kalogiannidis I, Papoulidis I, Athanasiadis A, Dagklis T. Invasive Prenatal Diagnostic Testing for Aneuploidies in Singleton Pregnancies: A Comparative Review of Major Guidelines. *Medicina* (Kaunas). 2022 Oct 17;58(10):1472. doi: 10.3390/medicina58101472. PMID: 36295632; PMCID: PMC9609299.
4. Batra, M., Sharma, K., Singh, Ch., Devadasan, Sh., Vikraman, S. (2021) SFM Clinical Practice Recommendations for Prenatal Invasive Diagnostic Procedures *J. Fetal Med.* 8:85–96. <https://doi.org/10.1007/s40556-021-00311-9>.
5. Кузнецова Т.В., Шилова Н.В., Творогова М.Г., Харченко Т.В., Лебедев И.Н., Антоненко В.Г. Практические рекомендации по обеспечению качества и надежности цитогенетических исследований. *Медицинская генетика* 2019; 18(5): 3-27.
6. R. J. McKinlay Gardner, David J. Amor. Chromosome abnormalities and genetic counseling | Oxford monographs on medical genetics; no. 70. Fifth edition. | Oxford; New York : Oxford University Press, [2018]
7. Ghi T, Sotiriadis A, Calda P, Da Silva Costa F, Raine-Fenning N, Alfirevic Z, McGillivray G, on behalf of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis in obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 48: 256–268.
8. Thomas Liehr, Anja Weise, Luisa Person, Niklas Padutsch, Stefanie Kankel. How to Obtain High-Quality Metaphase Spreads for Molecular Cytogenetics. *Current Protocols*, 2022.
9. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020), ISBN print: 978-3-318-06706-4, 2020, 163срp.

Приложение 1

Приготовление препаратов хромосом из лимфоцитов пуповинной крови плода

Особенностью пренатальной диагностики с использованием крови плода, полученной путем кордоцентеза из пуповинной вены, является ограниченное количество (не более 1мл) получаемого материала и необходимость исключения контаминации клетками крови материнского происхождения. Получение крови из пуповины плода осуществляют в операционной путем трансабдоминального кордоцентеза [7].

Тест для оценки контаминации пуповинной крови плода кровью матери (Apt-test) [8]

1. В пробирку, содержащую 5,0 мл дистиллированной воды, добавить 1,0 мл 0,25 N NaOH (смешивать непосредственно перед применением);
2. Добавить 0,05 мл крови (1-2 капли), перемешивать покачиванием пробирки в течение 1 мин.

Интерпретация: переход цвета смеси от розового до темного зелено-коричневого указывает на присутствие в образце крови матери. Ярко-розовый цвет свидетельствует об отсутствии контаминации.

Протокол культивирования клеток пуповинной крови

1-этап: Приготовление культуральной среды и посадка материала

Способ 1.

1. В 2 (две) пробирки культуральные со скошенным дном или пробирки типа Фалкон конические стерильные объемом 15 мл добавить:
 - фетогемагглютинин (ФГА) в концентрациях, рекомендуемых фирмой-производителем;
 - гепаринизированную пуповинную кровь 0,5 мл;
 - среды для культивирования RPMI-1640 – 6,0 мл;
 - сыворотка крупного рогатого скота - 1,5 мл.
2. Пробирки поместить в термостат для культивирования, стандартное время культивирования – 72 часа при температуре +37°C в закрытой системе.
3. За 1 час до окончания культивирования во флакон добавьте 0,3 мл 10 γ колхицина на 1-3 часа*.
4. По окончании инкубации с колхицином культуральную смесь центрифугируйте 10 мин при 1000 об/мин.

Способ 2.

В 2 (две) пробирки культуральные с дном платформой или пробирки типа Фалкон конические стерильные объемом 15 мл добавить:

- готовую заводскую культуральную среду - 5,0 мл;

- гепаринизированную пуповинную кровь - 0,5 мл.

2-этап: Гипотонизация и фиксация препаратов

1. Гипотонизация

- удалите пипеткой супернатант (надосадочная жидкость), оставьте 0,3-0,5 мл над осадком. Разбейте осадок энергичным встряхиванием и добавьте 8 - 10 мл гипотонического раствора (0,55%-1 раствор KCl, 1:1), перемешайте пипетированием и инкубируйте в термостате 15-20 минут при +37°C*;
- центрифугируйте 10 мин при 1000 об/мин;
- удалите пипеткой супернатант (надосадочная жидкость), оставьте 0,3-0,5 мл над осадком.

2. Фиксация

2.1 Вариант 1.

- разбейте тщательно осадок на вортексе. Влейте струйно 8-10 мл холодного свежеприготовленного фиксатора (этанол + ледяная уксусная кислота, 3:1) и перемешайте пипетированием;
- центрифугируйте 10 мин при 1000 об/мин;
- удалите пипеткой супернатант (надосадочная жидкость), оставьте 0,3-0,5 мл над осадком. Фиксацию культуры проводят три раза.

2.2 Вариант 2 (с предфиксацией)

- по окончании времени гипотонической обработки в каждую пробу добавь по 0,5-1,0 мл холодного свежеприготовленного фиксатора (этантеол + ледяная уксусная кислота, 3:1), перемешайте пипетированием и осадите центрифугированием (10 мин, 1000 об/мин);
- удалите супернатант, разбейте осадок встряхиванием и проведите фиксацию как описано в варианте 1.

2.3 Вариант 3 (с предфиксацией)

- по окончании времени гипотонической обработки в каждую пробу добавьте по 2 мл холодного свежеприготовленного фиксатора (этанол + ледяная уксусная кислота, 3:1), перемешайте пипетированием и осадите центрифугированием (8 мин, 1500 об/мин);
- удалите супернатант, разбейте осадок встряхиванием и проведите фиксацию как описано в варианте 1.

3-этап: Приготовление стеклопрепаратов

После завершения фиксации суспензию клеток (0,5-1,0 мл) ресуспендируют пипеткой Пастера, чтобы суспензия клеток в фиксаторе имела опалесцирующий вид (слегка мутноватая). Из полученной суспензии клеток готовят препараты путем раскапывания ее на холодные обезжиренные влажные предметные стекла. Храните предметные стекла в холодильнике в дистиллированной воде:

1. Нанесите клеточную суспензию на влажное стекло пипеткой Пастера с высоты около 30 см под углом 45° (по 3 - 4 капли) на стекло*.

2. Поместите стеклопрепараты в термостат при 37°C на 12 час, затем переключите на 60°C в течение 2 - 3 часа*.

3. Покрасьте стеклопрепарат:

- поместите стеклопрепарат в 1 сосуд Коплина с 0,25% раствор Трипсина на 2 минуты;
- перенесите стеклопрепарат на покрасочную поверхность и добавьте раствор краски.

Расчет объема краски на 1 стеклопрепарат:

- 100 мкл краситель Гимза;
- 5 мл PBS – буфер.

*– адаптируйте к условиям цитогенетической лаборатории

4-этап: Анализ стеклопрепарата

Критерии выбора метафазной пластины [8]:

- все хромосомы должны быть хорошо покрашенными и равномерно разбросаны. Густота их расположения в различных участках не должна отличаться более чем в два раза;
- не допускается наличия нескольких случайных хромосом в поле зрения;
- форма метафазной пластинки по периферии должна быть округлой или овальной, но в последнем случае ее большой диаметр должен быть не более двух малых акроцентрических хромосом;
- уровень конденсации хромосом должен находиться в следующих пределах: максимум – малые ацентрические хромосомы видны в виде четко выраженных структур, а не виде точек, минимум – хромосомы разделены на две хроматиды и лежат отдельно друг от друга;
- не допускается наличия в метафазной пластине хромосом, которые уже вступили в колхициновую анафазу;
- не допустим анализ метафазных пластин с продольным наложением больших и средних хромосом, а также любое наложение малых. Допускается только поперечное положение длинных плеч.

5-этап: Оформление результатов цитогенетического исследования с использованием правил оформления хромосомных нарушений [9].

Приготовление препаратов хромосом из ворсин хориона/плаценты

Получение, хранение и транспортировка материала [8].

Забор плодного материала проводится под контролем ультразвукового исследования в амбулаторных условиях, не требует премедикации и анестезии. Непосредственно в операционной биоптат из шприца переносится в чашку Петри со средой (+30-37°C) и гепарином. Отбор ворсин проводится глазным пинцетом, визуально оценивается количество полученного материала со стандартом. В лаборатории имеется заранее приготовленный стандарт, несколько пробирок с различным объемом ворсин хориона/плаценты: 2 мг, 5 мг, 10 мг.

Получение материала

1. Присвойте каждому образцу соответствующий номер, отражающий порядковый номер поступления и дату получения на всех этапах обработки и анализа материала.
2. Перенесите биоптат из шприца в чашку Петри (диаметром 100 мм) со средой (4,0 мл 0,9% физраствора и несколько капель гепарина (25 000 единиц).
3. Оцените визуально количество и качество материала, сравните со стандартом.

Ускоренный «прямой» метод

1-этап. Гипотонизация

- Перенесит отмытый от крови материал ворсина хориона/плаценты (по 5-10 мг) в пенициллиновые флаконы с раствором для гипотонизации: 4 мл 0,9 % трехзамещенного цитрата натрия и колхицина в конечной концентрации 2,5 мкг/мл 0,4 мл 100γ (stock solution – маточный раствор);
- Провидите гипотоническую обработку при комнатной температуре 40-50 минут или при температуре +37°C 35-45 минут*.

2-этап. Предфиксация

- проведите предфиксацию при комнатной температуре.
- перенесите пенициллиновые флаконы с биоматериалом из термостата на стол и добавить 2 мл фиксатора (этанол + ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1);
- инкубируйте при комнатной температуре в течение 20 мин.

3-этап. Фиксация

- удалите пипеткой Пастера из флакона ½ префиксирующего раствора, добавьте 4,0 мл холодного (+4°C) фиксатора. Время фиксации 10 минут при температуре – 10-15°C*;
- удалите весь префиксирующий раствор через 10 минут;
- добавьте 4,0 мл (+4°C) фиксатора. Время фиксации - 20 минут при -10-15°C*;
- удалите фиксирующий раствор и снова добавьте фиксатор. Время фиксации - 20 минут при -10-15°C;

- налейте в чистый пенициллиновый флакон 4,0 мл свежего фиксатора, поместите в него ворсины хориона/плаценты и добавьте равный объем дистиллированной воды (4,0 мл). Время постфиксации: 2-5 минут, контроль процесса: ворсины опустятся на дно (от этого зависит разброс хромосом);
- удалите пипеткой Пастера всю жидкость;
- переверните флаконы вверх дном на фильтровальную бумагу для удаления остатков фиксатора, ворсины должны остаться на стенках флакона;
- добавьте во флаконы с ворсинами хориона/плаценты 4-5 капель 60% ЛУК (6,0 мл ЛУК+ 4,0 мл H₂O);
- *Способ 1.* Соберите пипеткой Пастера клеточную взвесь, нанесите взвесь на чистые сухие подогретые, в термостате или над пламенем горелки до +45-50°C предметные стекла. Держите предметные стекла под наклоном. Избыток суспензии перенести на следующий препарат.
- *Способ 2.* Перенесите ворсину хориона на предметное стекло, добавьте несколько 4-5 капель 60% ЛУК. Через 2-3 мин ворсину перенести на следующее предметное стекло в каплю уксусной кислоты, распределите суспензию клеток на первом стекле покачиванием по поверхности стекла.

1-этап. Постфиксация:

- Нанесите 1-2 капли фиксатора на предметное стекло;
- Высушите над пламенем спиртовки или подожгите фиксатор;
- Перенесите стекло препараты в термостат на ночь*.

2-этап. Окраска стеклопрепаратов

Окрашивание предметных стекол проводится по стандартной методике с помощью раствора красителя Гимза с предварительной обработкой стекол 0,25% раствором трипсина для получения дифференциальной GTG-окраски.

1. Расчет раствора краски*:
Перенесите стеклопрепарат на покрасочную поверхность и добавьте раствор краски. Пример:
2. Расчет объема раствора краски на 1 стеклопрепарат:
 - 100 мкл краситель Гимза;
 - 10 мкл 0,25% раствора Трипсина;
 - PBS – буфер, рассчитывается в зависимости от количества стекол: 3мл на 1 стекло;
 - время окраски 20 мин.

*— адаптируйте к условиям цитогенетической лаборатории

Примечания

- Митотический индекс не зависит от морфологии ворсины, поэтому не следует пренебрегать ворсинами, не имеющими выраженной васкуляризации;

- Качество метафазных хромосом существенно зависит от гипотонической обработки, поэтому необходимо заблаговременно апробировать каждую новую партию цитрата натрия;
 - Гипотонический раствор, как и 60%-й раствор уксусной кислоты следует готовить в день использования;
 - Препараты следует готовить непосредственно в день забора материала, при увеличении срока хранения фиксированного материала значительно ухудшается их качество;
 - Из образца весом до 5 мг делать не более двух препаратов.
- Критерии выбора метафазной пластины см в разделе «Приготовление препаратов хромосом из лимфоцитов пуповинной крови».

Протокол культивирования амниотической жидкости в CO₂ инкубаторе

Культура амниотической жидкости:

- стерильные условия (ламинарный бокс);
- амниотическую жидкость отбирают в количестве 21 мл в операционной, помещают в стерильный пластиковый культуральный флакон SPL (объем 25 см², вентилируемая крышка с фильтром), транспортируют в лабораторию.

Посадка культуры:

- разлейте амниотическую жидкость по 7 мл в стерильные пластиковые конические пробирки объемом 15 мл (по 3 флакона на каждый образец амниотической жидкости);
- центрифугируйте пробирки 7 мин при 1500 об/мин;
- удалите супернатант;
- оставьте в пробирке 2 мл амниотической жидкости с осадком клеток;
- осадок ресуспензировать;
- добавьте 5 мл питательной среды для культивирования амниотической жидкости (в соотношении исходная проба: среда, равном 1,4:1);
- перенести суспензию клеток со средой в культуральные флаконы с вентилируемой крышкой с фильтром (V 25см²);
- инкубировать в культуральных флаконах 5 дней при 37°C (5% CO₂).

Промежуточная смена питательной среды

Проводится через 5 дней в стерильных условиях с предварительной обработкой клеток раствором Хенкса в соотношении 2,3:1, последующие смены среды осуществляют через каждые 2 дня.

- удалите среду из флаконов, клетки промыть с 3 мл раствора Хенкса;
- обработку проведите дважды;
- добавьте 5 мл среды в каждый флакон;
- инкубируйте флаконы при 37°C (5% CO₂).

Трипсинизация

Для получения синхронизированной культуры клеток в флакон добавьте 0,05% раствора трипсин-ЭДТА: в первый флакон через 6 дней от начала культивирования, во втором - через 7 дней, в третий - через 8 дней:

- слейте питательную среду;
- добавьте во флакон теплый (37°C) раствор трипсин-ЭДТА (3 мл) на 20 с;
- слейте раствор трипсин-ЭДТА;
- обработку проведите дважды;
- подождите 30 секунд, энергично встряхните флакон. Отделение клеток от дна флакона контролируйте под инвертированным микроскопом. Общее время обработки клеток трипсином-ЭДТА составляет 2-3 мин;

- после отделения клеток во флакон добавьте питательную среду (5 мл). Смену среды проводят во всех флаконах через сутки после трипсинизации.

Фиксация

- проводится через 19 часов после финальной замены питательной среды;
- добавьте в культуру клеток раствор колхицина (конечная концентрация 1 мкг/мл) в течение 2,5 часов при 37°C, 5% CO₂;
- слейте среду из флакона в центрифужную пробирку;
- обработайте культуральный флакон теплым (37°C) 0,05% раствором трипсин-ЭДТА (3 мл);
- встряхните флакон, контролируйте отделение клеток от дна флакона под микроскопом;
- слейте раствор трипсин-ЭДТА с отделившимися клетками в ту же центрифужную пробирку;
- обработку культурального флакона провести дважды;
- центрифугируйте пробирку 7 мин при 1500 об/мин;
- удалите супернатант.

Общее время обработки клеток 0,05% раствором трипсин-ЭДТА составляет 2-3 мин.

Гипотонизация

- добавьте в пробирку 10 мл теплого (37°C) гипотонического раствора (вода, эмбриональная телячья сыворотка 2:1) для наполнения клеток водой и лучшего распластывания хромосом при приготовлении препаратов;
- пипетируйте;
- флаконы поместите в термостат на 20 мин при 37°C;
- добавьте 5 капель фиксатора, пипетируйте;
- центрифугируйте пробирку 7 мин при 1500 об/мин;
- удалите супернатант;
- добавьте 7 мл фиксатора (этанол, уксусная кислота 3:1) для фиксации;
- поместите флакон в холодильник на 40 мин при 4°C.

Приготовление препаратов хромосом

Готовятся методом *in situ* на стеклах из клеток, культивированных в слайд-флаконах:

- центрифугируйте пробирку 7 мин при 1500 об/мин;
- удалите супернатант, оставив 1 мл с осадком;
- добавьте фиксатор до 2-2,5 мл (в зависимости от осадка), пипетируйте;
- раскапайте суспензию на обезжиренные, холодные, влажные предметные стекла;
- высушите полученные препараты в течение 20 мин под струей теплого воздуха;

- окрашивание предметных стекол проводится по стандартной методике с помощью раствора красителя Гимза с предварительной обработкой стекол 0,25% раствором трипсина для получения дифференциальной GTG-окраски;
- цитогенетический анализ кариотипа для каждого пациента должен быть сделан не менее, чем в 20 метафазных пластинках хромосом, полученных из трех отдельных культуральных слайд-флаконов.

Показатель митотического индекса определяется как отношение количества метафазных пластинок, приходящееся на общее количество в 1000 ядер, выраженное в процентах. Высоким митотическим индексом считается 4-6,9% (от 40 до 69 метафаз на 1000 ядер).

Протокол культивирования амниотической жидкости без инкубатора CO₂

Культура амниотической жидкости:

- стерильные условия (ламинарный бокс)

Посадка культуры:

- проводится в культуральные слайд флаконы с невентилируемой крышкой (по 2 флакона на каждый образец амниотической жидкости);
- в каждый слайд-флакон разливается 10 мл амниотической жидкости и добавляется по 5 мл питательной среды AmnioMAX-II;
- слайд-флаконы помещаются в термостат при температуре 37°C на 4-5 дней.

Промежуточная смена питательной среды:

- проводится через 4-5 дней в стерильных условиях;
- из слайд-флакона сливается вся жидкость и добавляется по 5 мл новой питательной среды AmnioMAX-II;
- слайд-флаконы помещаются в термостат при температуре 37°C;
- через 3-4 дня после смены питательной среды оценивается рост культуры под стереомикроскопом.

Финальная замена питательной среды:

- проводится на 4-й день после промежуточной замены питательной среды при условии, что размер колоний клеток достигает 2-4 мм;
- из слайд-флакона сливается вся жидкость и добавляется по 3 мл новой питательной среды AmnioMAX-II;
- слайд-флаконы помещаются в термостат при температуре 37°C на 16 часов.

Фиксация культуры амниотической жидкости

Процедура проводится в вытяжном шкафу

- проводится через 16 часов после финальной замены питательной среды;
- в слайд-флакон добавляется по 1 капле (0,3 мкл) раствора колхицина для остановки клеточного деления. Флаконы помещаются на 2 часа в термостат при температуре 37°C;
- из слайд-флакона сливается вся жидкость и добавляется по 1 мл теплого раствора трипсин-версена, который должен покрыть все дно флакона, оставить на 1 минуту;
- в слайд-флакон с раствором трипсин-версена добавляется 8 мл гипотонического раствора, жидкость перемешивается и помещается в термостат при температуре 37°C на 8 минут;
- в слайд-флакон добавляется 2 мл раствора фиксатора, жидкость перемешивается и оставляется при комнатной температуре на 3 минуты;
- в слайд-флакон добавляется еще 3 мл раствора фиксатора, жидкость перемешивается и оставляется при комнатной температуре на 4 минуты;

- для каждого слайд-флакона готовится отдельная центрифужная пробирка объемом 15 мл и скребок;
- с помощью скребка со стенок слайд-флакона отделяются все колонии клеток;
- суспензия раствора и клеточных колоний переливается из флакона в центрифужную пробирку (общий объем жидкости около 14 мл);
- пробирка центрифугируется 4 минуты при скорости 2000 об/мин;
- параллельно с центрифугированием пробирки, в слайд-флакон добавляется 3 мл раствора фиксатора, жидкость перемешивается;
- из центрифужной пробирки с помощью пипетки удаляется супернатант до остаточного объема 1,5 мл; осадок бережно взбалтывается и в него из слайд-флакона переливается фиксатор с остатками клеток;
- в слайд-флакон еще раз добавляется 3 мл раствора фиксатора, отмываются все остатки клеток, раствор сливается в центрифужную пробирку (общий объем жидкости около 7,5 мл);
- пробирка помещается в холодильник на 20 минут;
- пробирка центрифугируется 4 минуты при 2000 об/мин;
- из центрифужной пробирки с помощью пипетки удаляется супернатант до остаточного объема 1,5 мл, осадок бережно перемешивается;
- в пробирку добавляется 5 мл раствора фиксатора, пробирка помещается в холодильник на 1 час;
- пробирка центрифугируется 4 минуты при 2000 об/мин;
- из центрифужной пробирки с помощью пипетки удаляется супернатант до остаточного объема 1,5 мл, осадок перемешивается;
- в пробирку добавляется 8 мл раствора фиксатора, пробирка помещается в холодильник на 18-22 часа.

Приготовление хромосомных препаратов

Готовятся методом *in situ* на покровных стеклах из клеток, культивированных в слайд-флаконах:

- пробирка центрифугируется 4 минуты при 2000 об/мин;
- из центрифужной пробирки с помощью пипетки удаляется супернатант до остаточного объема 1,0 мл;
- супернатант раскапывается на охлажденные мокрые предметные стекла под наклоном;
- стекла подсушиваются при комнатной температуре и помещаются на термостол, где полностью высушиваются в течение 1 часа при температуре 90°C;
- после сушки предметные стекла помещаются в термостат при температуре 37°C на 1-2 часа. После этого стекла готовы к покраске;
- окрашивание предметных стекол проводится по стандартной методике с помощью раствора красителя Гимза с предварительной обработкой стекол 0,25% раствором трипсина для получения дифференциальной GTG-окраски;

- цитогенетический анализ кариотипа для каждого пациента должен быть сделан не менее, чем в 20 метафазных пластинках хромосом, полученных из двух отдельных культуральных слайд-флаконов.

Приготовление препаратов хромосом и интерфазных клеток для гибридизации

Для приготовления гибридизации *in situ* пригодны цитологические или гистологические препараты клеток любых тканей или органов, приготовленные по стандартным методикам. В условиях клинической цитогенетической лаборатории используют препараты культивированных лимфоцитов периферической крови, клеток цитотрофобласта хорионального эпителия, культивированных и некультивированных клеток амниотической жидкости, различных тканей из абортного материала.

Способ 1

1. Образец амниотической жидкости разлейте в пробирки типа Фалкон с закручивающейся крышкой;
2. Центрифугируйте пробирку при 1000-1500 об/мин в течении 5 минут;
3. Удалите супернатант;
4. Добавьте 3 мл раствора трипсина 0,05% с ЭДТА (2:8+1 вакутейнер 2 мл с ЭДТА);
5. Инкубируйте на водяной бане 5 минут при 37°C;
6. Центрифугируйте 5 минут при 1000-1500 об/мин;
7. Удалите супернатант;
8. Осторожно по стенке пробирки внесите 1 мл PBS-буфер и 1 мл холодного фиксатора Карнуа (предпочтительнее приготовить его *de novo* из 96% спирта и ледяной уксусной кислоты), тщательно пипетируйте;
9. Центрифугируйте 5 минут при 1000-1500 об/мин;
10. Удалите супернатант;
11. Добавьте 3 мл холодного фиксатора, пипетируйте осторожно до 10 раз;
12. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре;
13. Центрифугируйте 5 минут при 1000-1500 об/мин;
14. Удалите супернатант;
15. Наносите по 5 мк ресуспендированного осадка на охлаждённые предметные стекла.

Способ 2

Приготовление препаратов некультивированных клеток амниотической жидкости

1. Образец амниотической жидкости по 6-8 мл перенести в центрифужные пробирки и центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин;
2. Удалите пипеткой осторожно надосадочную жидкость, добавьте к осадку 8 мл гипотонического раствора и пипетируйте;
3. Инкубируйте смесь 1,5 часа в термостате при +37°C;
4. Центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 10 мин;
5. Удалите пипеткой осторожно надосадочную жидкость;

6. Фиксируйте материал дважды свежеприготовленным фиксатором (этанол + ледяная уксусная кислота, 3:1). Проводите фиксацию при +4°C, первую в течение 10 мин, вторую – 20 мин;
 7. Осадите клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин;
 8. Удалите пипеткой осторожно надосадочную жидкость;
 9. К осадку добавьте ледяную уксусную кислоту, объем 8 мл на пробирку, перемешайте и выдержите пробирки при +4°C в течение 1,5 часов;
 10. Осадите клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1 мин, и осторожно удалите надосадочную жидкость;
 11. Добавьте к осадку 10 мл свежеприготовленного фиксатора, пипетируйте и инкубируйте в течение 10 мин при температуре +4°C;
 12. Осадите клетки центрифугированием – 10 мин при 1000 об/мин, и осторожно удалите надосадочную жидкость;
 13. Добавьте к осадку 6 мл охлажденного этанола, перемешайте и инкубируйте при температуре +4°C;
 14. Осадите клетки центрифугированием – 10 мин при 1000 об/мин, и осторожно удалите надосадочную жидкость;
 15. Добавьте к осадку 1,5-2 мл охлажденного этанола и пипетеруйте;
 16. Суспензию клеток по 50-100 мкл раскапайте на охлажденные чистые и обезжиренные стекла и высушите поджиганием фиксатора.
- Добавление FISH зондов согласно протоколу производителя.

Правила забора ворсин хориона и плаценты для проведения молекулярно-генетических исследований

Для того, чтобы использовать ворсины хориона или плаценты для выделения ДНК для молекулярно-генетических исследований, они не должны подвергаться какой-либо предварительной обработке. Сразу после экстракции материал в количестве 5-20 мг должен быть помещен в пробирку с изотоническим раствором (физраствором) и в таком виде доставлен в лабораторию при температуре 4°C. Не следует замораживать пробирку с материалом. Направьте ворсинки в лабораторию в тот же день. Если нет возможности доставить ворсинки в тот же день, храните на ночь в физрастворе в холодильнике.

Материал должен быть доставлен в лабораторию в течении 24 часов.

Система оценки качества G-окраски

Качество G-окраски	Идентификация сегментов
Отсутствует	Идентифицировать хромосомы нет возможности
Около 150 сегментов	Каждая хромосома может быть идентифицирована по сигнальным сегментам
Около 400 сегментов	Видны 2 четких темных блока на 8p и 9p и три темных сегмента в середине 5q (5q14, 5q21, 5q23)
Около 550 сегментов	Видны четыре четких темных сегмента на 18q и три на 11p, 7q33 и 7q35, может быть, виден 22q13.2
Около 850 сегментов	Проявляются сегменты 6q16, 6q24, 6q25.2 и 6q26. Отчетливо видны 11p14.1, 11p14.3 и 15q12. На 20p не менее двух темных сегментов

Рекомендации по минимальному количеству метафазных пластинок/интерфазных ядер, необходимых для проведения цитогенетического/молекулярно-цитогенетического исследования

Анализ	Показания/вид исследования/результат	Число метафазных пластинок/интерфазных ядер для анализа	Общее число метафазных пластинок/интерфазных ядер для анализа
Постнатальный	Стандартный	11 метафазных пластинок (а)	11 метафазных пластинок
Пост/пренатальный	Исключение мозаицизма или аномалии, обнаруженной в одной клетке	11 метафазных пластинок	27 (50) метафазных пластинок
Пренатальный конститутивный	Стандартный	по 5 метафазных пластинок из двух независимых культур (b) или нескольких разных ворсин, если используют «прямые» и «полупрямые» препараты	11 метафазных пластинок (с)
Пост/пренатальный	FISH на метафазных пластинках	5 метафазных пластинок	-
Пост/пренатальный	FISH на интерфазных ядрах	100 интерфазных ядер (d)	-
Пренатальный скрининг	FISH на интерфазных ядрах	30 интерфазных ядер (е)	До 50 интерфазных ядер

Примечание: а – в том числе полностью проанализированных метафазных пластинок (посегментное сравнение гомологов на уровне 550 бэндов) не менее 3-х.

b – одна культура, если применяются другие методы детекции анеуплоидии (FISH или молекулярно-генетические)

с – может потребоваться подсчет дополнительных клеток, чтобы исключить мозаицизм или аномалию, обнаруженную в одной клетке.

d – для исключения мозаицизма или аномалии в одной клетке

е – для каждого зонда из набора для скрининга анеуплоидий.

Расширение анализа или увеличение числа проанализированных клеток обосновано, если есть клинические указания или подозрение на мозаицизм.

Минимальное число метафазных пластинок/интерфазных ядер, необходимых для исследования, в зависимости от ДНК-зонда

Тип зонда	Анализ	Комментарии
Локус-специфичные зонды	5 метафазных пластинок	Подсчитывают число сигналов, чтобы исключить или подтвердить аномалию
Анализ с несколькими ДНК-зондами одновременно	3 метафазные пластинки	Для каждого зонда. Подсчитывают число сигналов, чтобы подтвердить нормальный результат. При выявлении аномалии рекомендуют подтверждение другими методами.
Пренатальный скрининг анеуплоидий на интерфазных ядрах	> 50 интерфазных ядер	Для каждого зонда
Скрининг для выявления мозаицизма на интерфазных ядрах	>100 интерфазных ядер	Для каждого зонда

Одним из подходов к анализу пролиферации клеток является определение митотического индекса (МИ), величина которого характеризует долю клеток, находящихся в митозе. Митотический индекс определяется как отношение количества клеток популяции, подвергающихся митозу, к общему количеству клеток. Митотический индекс — это количество клеток, подвергшихся митозу, деленное на общее количество клеток.