**«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 и пересмотра протокола:** 2023 год.

**1.3 Сокращения, используемые в протоколе:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ИПД | – | инвазивная пренатальная диагностика |
| МСМ | – | материнских сывороточных маркеров |

**1.4 Пользователи протокола:** врачи по специальностям «Медицинская генетика», «Aкушерство и гинекология взрослая, детская», «Врач участковый и (или) врач общей практики».

**1.5 Категория пациентов:**

Процедура проводится:

* беременным, которые относятся в группу 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.
* беременным 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.
* Кратность применения: исследование проводится однократно.
* Техника проведения: биопсия хориона, плацентоцентез, амниоцентез, кордоцентез.

**2. МЕТОДЫ, ПОДХОДЫ И ПРОЦЕДУРЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ**

**2.1 Цель проведения процедуры/вмешательства:**

ИПД проводится для исключения хромосомной или моногенной патологии плода.

**2.2 Показания и противопоказания к проведению процедуры/вмешательства** отображены в соответствующих приказах и стандартах.

**2.6 Требования к проведению процедуры и вмешательства:**

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

Требования к проведению ИПД[1]:

 1) ИПД проводится в амбулаторных и стационарных условиях второго и (или) третьего этапа пренатального скрининга при наличии манипуляционного кабинета врачом по специальности "Акушерство и гинекология" и врачом по специальности "Ультразвуковая диагностика" (пренатальная ультразвуковая диагностика), прошедшими обучение по пренатальным инвазивным методам.

 2) исследования плодового материала проводятся врачами по специальности "Медицинская генетика" и (или) специалистами, владеющими цитогенетическими и (или) молекулярно-цитогенетическими методами, прошедшими обучение по проведению анализа плодового материала;

**Требование к оснащению, расходным материалам, медикаментам**:

**Оборудование:**

1. Микроскоп экспертного класса, проходящего и отраженного света, оснащенный камерой и персональным компьютером с программным модулем, включающий в себя Модуль базы данных пациентов и случаев, модуль захвата изображения и модуль проведения кариотипирования в светлом поле и модуль для проведения FISH анализа с набором светофильтров для визуализация хромосом 13,18,21, Х, У, с автоматическим составлением клинических случаев и отчетов;[2]
2. Микроскоп биологический инвертированный;
3. Ламинарный шкаф с вертикальной подачей воздуха;
4. Вытяжной шкаф;
5. Термостат инкубатор с цифровым контролем температуры не менее +60°С;
6. CO2 Инкубатор (2 шт);
7. Центрифуга 3000 об/мин для пробирок объем не менее и не более 15 мл;
8. Центрифуга настольная для пробирок типа Эппендорф объем 1,5-2,0 мм;
9. Миницентрифуга - вортекс со сменными блоками;
10. Камера для гибридизации и денатурации;
11. Сушильный столик для стекол;
12. Водяная баня с цифровым контролем температуры, объем от 2 л;
13. Фармацевтический холодильник +2/+8°С;
14. Морозильная камера до -20°С;
15. Вортекс;
16. pH- метр с набором ;
17. Набор ванночек для ручного окрашивания стекол сосуды Коплина;
18. Набор дозаторов одноканальные 1-10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
19. Аналитические весы;
20. Спиртовка горелка
21. Пинцет глазной
22. Пробирки типа Фалкон стерильные с закручивающейся крышкой
23. Пробирки типа Фалкон со скошенным дном стерильные с закручивающейся крышкой
24. Вакутейнеры с литием гепарина
25. Чашки Петри 100 мм
26. Пробирки Пастера 2/3 мм
27. Игла для забора биологического материала 18 мм, 20мм, 22 мм
28. Культуральные с вентилируемой крышкой
29. культуральный слайд-флаконы флакон SPL (объем 25 см2, вентилируемая крышка с фильтром
30. культуральный слайд-флаконы SPL (объем 25 см2, с невентилируемой крышкой)
31. Скребок для сбора клеток
32. Пипетки одноразовые стерильные на полный слив 1 мл, 2 мл, 5 мл 10 мл

**Реагенты:**

1. Питательная среда RPMI – 1640 питательная среда\*
2. Сыворотка крупного рогатого скота (КРС)
3. Телячья эмбриональная сыворотка
4. ФГА - фитогемагглютинин
5. Антибиотик
6. L-глутамин\*
7. 0,25% раствор Трипсина
8. Среда для культивирования клеток амниотической жидкости
9. NaOH
10. NaH2PO4
11. KH2PO4
12. Спирт этиловый 96%
13. Ледяная уксусная кислота
14. Колхицин
15. Трипсин
16. Иммерсионное масло
17. Дистиллированная вода
18. Раствор Хенкса
19. Стандртные наборы для pH- метрии

**Приготовление растворов и реагентов**

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

**Рабочий раствор колхицина — 0,01 г** колхицина на 10мл дистиллированной воды. Хранить при +4 оС в течение года.

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

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

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

**60% раствор уксусной кислоты** – З,0 мл ледяной уксусной кислоты + 2мл 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 (pН 7,2-7,3)

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

8 г NaCl;

0,4 г КС1;

0,725 г Na2HP04;

0,12 г КН2Р04

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 гКС1; l,15rNa2HP04;

0,2 г КН2Р04

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

**Методы приготовления препаратов хромосом**

**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.[3]

**Тест для оценки контаминации пуповинной крови плода кровью матери (Apt-test) [4]**

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 рогато скота - 1,5 мл.
1. Пробирки поместить в термостат для культивирования, стандартное время культивирования – 72 часа при температуре +37⁰С в закрытой системе;
2. За 1 час до окончания культивирования во флакон добавьте 0,3 мл 10 γ колхицина на 1 -3 часа\*;
3. 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 +37⁰С \*;
* 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,1000об/мин);
* удалите супернатант, разбите 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, разбите 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°С на 12 час, затем переключите на 60°С 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 [5]:

* все хромосомы должны быть хорошо прокрашенными 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:** Оформите результаты цитогенетического исследования с использованием правил оформления хромосомных нарушений [6].

**Приготовление препаратов хромосом из ворсин хориона/плаценты**

**Получение, хранение и транспортировка материала.**

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°С) 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.[7]

*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°С 35-45 минут\*.

*2-этап. Предфиксация*

* проведите предфиксацию при комнатной температуре.
* перенесите пеницилиновые 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 (+4⁰С) фиксатора. Время фиксации 10 минут при температуре – 10-15⁰С\*;
* Удалите весь префиксирующий раствор через 10 минут;
* Добавьте 4,0 мл (+4°С) фиксатора. Время фиксации - 20 минут при -10-15°С\*.
* Удалите фиксирующий раствор и снова добавьте фиксатор. Время фиксации - 20 минут при -10-15°С.
* 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 Н2О);
* *Способ 1.* Соберите пипеткой Пастера клеточную взвесь, нанесите взвесь на чистые сухие подогретые, в термостате или над пламенем горелки до +45-50°С 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:

1. 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 SPL вентилируемая крышка 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 стеклахиз 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°С 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°С;
* 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°С на 16 часов.

*Фиксация культуры амниотической жидкости*

Процедура проводится в вытяжном шкафу

* проводится через 16 часов после финальный 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°С;
* 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°С 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 стеклахиз 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 термостолик, где полностью высушиваются в течение 1 часа при температуре 90°С;
* после сушки предметные стекла помещаются в термостат при температуре 37°С 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.

**Правила забора ворсин хориона и плаценты для проведения молекулярно-генетичпеских 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°С. 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.

**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 1000-1500об/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°С;

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 +37⁰С;
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 +4⁰С, 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 +4⁰С 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, пипетируте и инкубируйте в течение 10 мин при температуре +4⁰С;
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 +4⁰С;
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.

* 1. **Индикаторы эффективности процедуры/вмешательства[8]:**

**Рекомендации по минимальному уровню разрешения дифференциальной окраски 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 (когданет 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**

|  |  |
| --- | --- |
| **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 8р и 9р и три темных сегмента в середине 5q (5q14, 5q21, 5q23) |
| Около 550 сегментов | Видны четыре четких темных сегмента на 18q итри на 11р, 7q33 и 7q35,может быть, виден 22q13.2 |
| Около 850 сегментов | Проявляются сегменты 6q16, 6q24, 6q25.2 и 6q26.Отчетливо видны 11р14.1, 11р14.3 и 15q12.На 20р 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 (a) | 11 метафазных пластинок |
| Пост/пренатальный  | Исключение мозаицизма илианомалии, обнаруженной в одной клетке | 11 метафазных пластинок | 27 (50) метафазных пластинок |
| Пренатальный конститутивный | Стандартный | по 5 метафазных пластинок из двухнезависимых 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 (e) | 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 подтвердитьаномалию |
| Анализ с несколькими ДНК-зондами одновременно | 3 метафазные пластинки | Для каждого зонда. Подсчитывают число сигналов, чтобы подтвердить нормальный результат. При выявлении аномалии рекомендуютподтверждение 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.

# **3. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОТОКОЛА:**

**3.1 Список разработчиков протокола:**

1. Абильдинова Гульшара Жусуповна – д.м.н., 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. Жабакова Жанна Маратовна – врач-генетик второй категории персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
4. Хамидуллина Зайтуна Гадиловна – к.м.н., доктор философии (PhD), заведующая кафедры Акушерства и гинекологии №1 НАО «Медицинский университет Астана»;
5. Байысбекова Альфия Гильматовна – к.м.н., врач-генетик высшей категории, управляющий директор Международного клинического центра репродуктологии PERSONA;
6. Жумажанова Меруерт Абильхановна – врач-генетик первой категории, заведующая отделением медико-генетической консультации ГКП на ПХВ «Городская многопрофильная больница №2»;
7. Кошкарова Калжан Абишевна – врач-цитогенетик высшей категории отделения медицинской генетики ГКП на ПХВ «Городской центр репродукции человека»;
8. Мирзахметова Динара Досалыевна – PhD, MPH, врач акушер-гинеколог высшей категории, медицинский директор клиники «Экомед».
9. 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;
10. Бариева Гульзада Жумабаевна – магистр общественного здравоохранения (MPH), 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 – доктор медицинских наук, врач высшей категории по специальности «акушерство и гинекология» (специалист UMC)

2. Ракишева Зере Баяновна – к.м.н., врач-генетик высшей категории генетической лаборатории «TreeGene» \ медицина ғылымдарының кандидаты, «TreeGene» генетикалық зертханасының жоғары санатты генетик-дәрігері;

**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. регистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 15 сентября 2010 года № 6490.
2. 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]
3. Preparation, Culture, and Analysis of Amniotic Fluid Samples, Patricia Minehart Miron, UMass Memorial Medical Center, Worcester, Massachusetts, Corresponding author: patricia.miron@umassmemorial.org
4. Application of «APT-TEST» in prenatal diagnosis to evaluate the fetal of blood obtained by «chordocentesi». Results of 30 pregnancies /Odur G.[et al.]//Eur.J.Hum. Genet.-1996.-Vol.4,№1.-P.155
5. Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней: методические рекомендации. В. С. Баранов, Э. К. Айламазян, ISBN:978-5-94869-073-5, Эко-Вектор, 2009, 116 стр.
6. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020), ISBN print: 978-3-318-06706-4, 2020, 163стр.
7. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты. Т.В. Кузнецова, В. С. Баранов, ISBN:5-94869-034-2, Эко-Вектор, 2012, 654 стр.
8. 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.