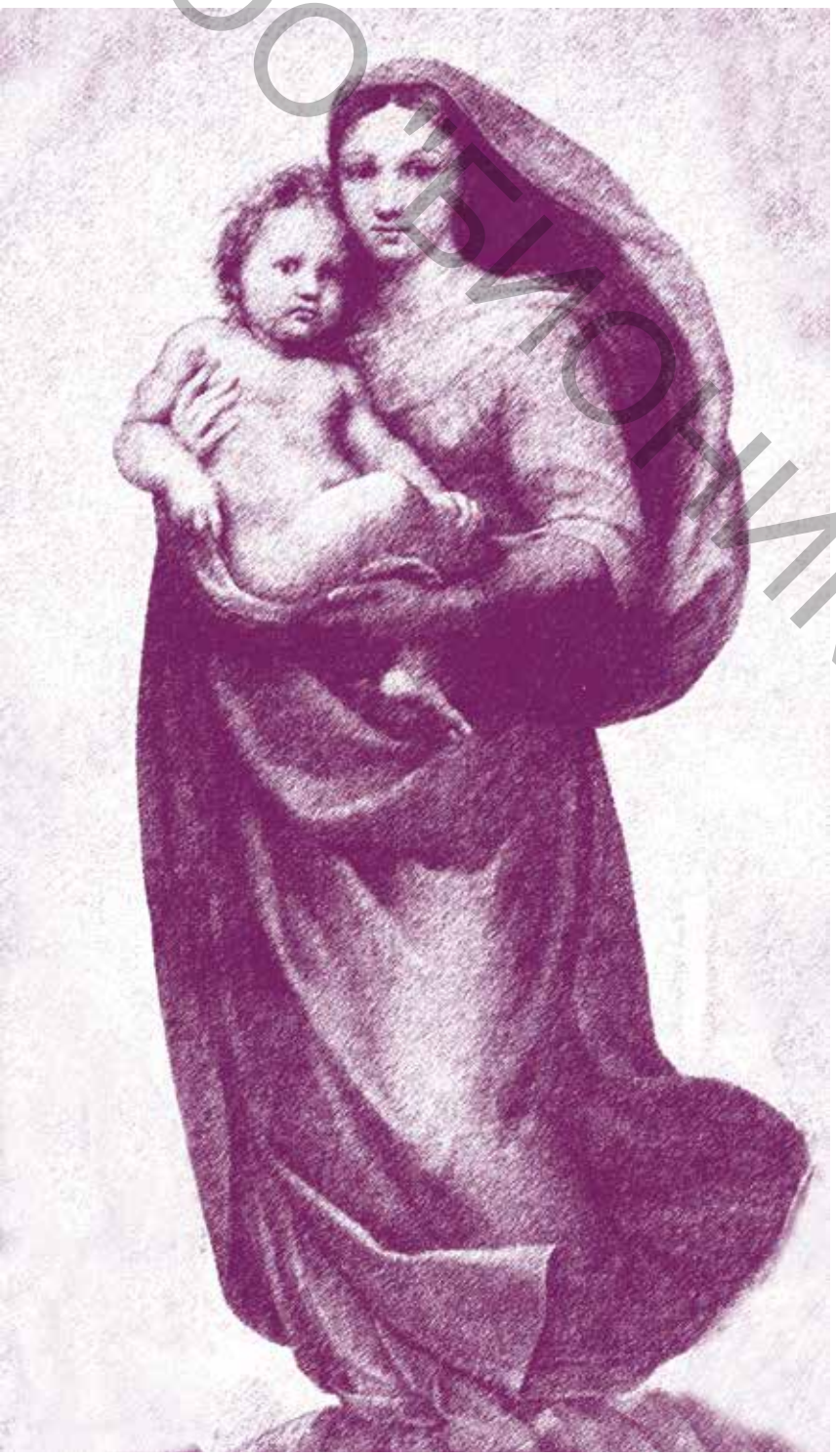
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

акушерство и гинекология

ООО "ПОНИКА МЕДИА"



№ 6 / 2016

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования

НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ
И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМ. АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА МИНЗДРАВА РФ
РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО АКУШЕРОВ-ГИНЕКОЛОГОВ

акушерство и гинекология

Научно-практический журнал 6 /2016 Основан в 1922 г.

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Л.В. АДАМЯН, акад. РАН, проф., д.м.н. (Москва)
Э.К. АЙЛАМАЗЯН, акад. РАН, проф., д.м.н. (Санкт-Петербург)
И.А. АПОЛИХИНА, проф., д.м.н. (Москва)
Л.А. АШРАФЯН, проф., д.м.н. (Москва)
О.Р. БАЕВ, проф., д.м.н. (Москва)
Е.Н. БАЙБАРИНА, проф., д.м.н. (Москва)
В.С. БАРАНОВ, чл.-корр. РАН, проф., д.б.н. (Санкт-Петербург)
И.И. БАРАНОВ, проф., д.м.н. (Москва)
Е.М. ВИХЛЯЕВА, чл.-корр. РАН, проф., д.м.н. (Москва)
С.М. ВОЕВОДИН, д.м.н. (Москва)
М.Ю. ВЫСОКИХ, к.б.н. (Москва)
А.И. ГУС, проф., д.м.н. (Москва)
Д.Н. ДЕГТЯРЕВ, проф., д.м.н. (Москва)
Ю.Э. ДОБРОХОТОВА, проф., д.м.н. (Москва)
Н.В. ДОЛГУШИНА, д.м.н. (Москва)
Э.Р. ДУРИНЯН, доц., к.м.н. (Москва)
Н.Е. КАН, д.м.н. (Москва)
Е.Ф. КИРА, проф., д.м.н. (Москва)
Е.А. КОГАН, проф., д.м.н. (Москва)
И.Н. КОСТИН, проф., д.м.н. (Москва)
В.И. КРАСНОПОЛЬСКИЙ, акад. РАН, проф., д.м.н. (Москва)
С.А. ЛЕВАКОВ, проф., д.м.н. (Москва)
Л.С. ЛОГУТОВА, проф., д.м.н. (Москва)
О.В. МАКАРОВ, проф., д.м.н. (Москва)
А.Д. МАКАЦАРИЯ, чл.-корр. РАН, проф., д.м.н. (Москва)
И.Б. МАНУХИН, проф., д.м.н. (Москва)
В.Н. ПРИЛЕПСКАЯ, проф., д.м.н. (Москва)
В.Е. РАДЗИНСКИЙ, проф., д.м.н. (Москва)
Г.М. САВЕЛЬЕВА, акад. РАН, проф., д.м.н. (Москва)
И.С. СИДОРОВА, чл.-корр. РАН, проф. д.м.н. (Москва)
А.И. СТРИЖАКОВ, акад. РАН, проф., д.м.н. (Москва)
С.А. СЕЛЬКОВ, проф., д.м.н. (Санкт-Петербург)
Н.К. ТЕТРУАШВИЛИ, д.м.н. (Москва)
Д.Ю. ТРОФИМОВ, проф., д.б.н. (Москва)
В.Л. ТЮТЮННИК, д.м.н. (Москва)
А.З. ХАШУКОЕВА, проф., д.м.н. (Москва)
Р.Г. ШМАКОВ, д.м.н. (Москва)
М.П. ШУВАЛОВА, к.м.н. (Москва)

Главный редактор
Г.Т. Сухих
акад. РАН, проф., д.м.н., Москва

Зам. главного редактора
В.Н. СЕРОВ
акад. РАН, проф., д.м.н., Москва

Зам. главного редактора
Е.Г. ХИЛЬКЕВИЧ
д.м.н., чл. EASE, Москва

Ответственный секретарь
А.И. ЩЕГОЛЕВ
проф., д.м.н., Москва

Научный редактор
Э.Р. ДУРИНЯН
доц., к.м.н., Москва

Зав. редакцией
М.А. БАШИРОВА

АДРЕС РЕДАКЦИИ:
117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4
Телефон: (495) 438-69-46
E-mail: m_bashirova@oparina4.ru

Зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
ПИ № ФС77-36074 от 23 апреля 2009 г.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Н.В. БАШМАКОВА, проф., д.м.н. (Екатеринбург)
А.В. ДЕГТЯРЕВА, проф., д.м.н. (Москва)
С.Н. ЗАНЬКО, проф., д.м.н. (Витебск)
Т.С. КАЧАЛИНА, проф., д.м.н. (Н. Новгород)
В.В. КОВАЛЕВ, проф., д.м.н. (Екатеринбург)
Ш.М. КУРБАНОВ, проф., д.м.н. (Душанбе)
В.А. ЛИНДЕ, проф., д.м.н. (Москва)
В.Н. ЛОКШИН, проф., д.м.н. (Астана)
А.И. МАЛЫШКИНА, проф., д.м.н. (Иваново)
Б.И. МЕДВЕДЕВ, проф., д.м.н. (Челябинск)
С.М-О. ОМАРОВ, проф., д.м.н. (Махачкала)
С.В. ПАВЛОВИЧ, к.м.н. (Москва)
О.Г. ПЕКАРЕВ, проф., д.м.н. (Москва)
Г.А. ПЕНЖОЯН, проф., д.м.н. (Краснодар)
Л.В. ПОСИСЕЕВА, проф., д.м.н. (Иваново)
М.А. РЕПИНА, проф., д.м.н. (Санкт-Петербург)
И.И. РЮМИНА, проф., д.м.н. (Москва)
И.А. САЛОВ, проф., д.м.н. (Саратов)
Е.В. УВАРОВА, проф., д.м.н. (Москва)
И.Ф. ФАТКУЛЛИН, проф., д.м.н. (Казань)
З.С. ХОДЖАЕВА, проф., д.м.н. (Москва)
Г.Е. ЧЕРНУХА, проф., д.м.н. (Москва)
Е.Л. ЯРОЦКАЯ, проф., д.м.н. (Москва)
А. ГРАЦИОТТИН, проф. (Милан, Италия)
Х. ВИЛЛАР, проф. (Оксфорд, Великобритания)
С. КЕННЕДИ, проф. (Оксфорд, Великобритания)
Т. МАХМУД, проф. (Керколди, Великобритания)
ДЖ.К. ДИ РЕНЦО, проф. (Перуджа, Италия)
В. СЕНИКАС, проф. (Оттава, Канада)
ДЖ. ШЬЯРРА, проф. (Чикаго, США)

Журнал входит в Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук. Импакт-фактор РИНЦ: 5-летний – 0,590, 2-летний – 0,617.
Журнал «Акушерство и гинекология» представлен в следующих международных информационных изданиях:
Abstracts of Bulgarian Scientific Medical Literature; Experta Medica; Ulrich's International Periodicals Directory;
включен в продукты EBSCO; представлен в Russian Science Citation Index.

УЧРЕДИТЕЛИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (член Ассоциации научных редакторов и издателей – АНРИ)

Общероссийская общественная организация «Российское общество акушеров-гинекологов»

Дата выхода 29.04.2016

bionika media

ИЗДАТЕЛЬ ООО «Бионика Медиа»
Адрес для корреспонденции:
117420, Москва, ул. Профсоюзная, д. 57, 3-й подъезд
www.bionika-media.ru
Председатель Совета директоров: И.Г. Красивская
Генеральный директор: Д.А. Огурцов
Заместитель генерального директора: А.В. Власова

Размещение рекламы:
ООО «Бионика Медиа»
Руководитель департамента по рекламе в медицинской прессе: А.С. Корнеев
Директор по продажам: В.В. Милоянина

Департамент по рекламе в медицинской прессе:
Н.В. Семенова, И.Л. Кочеткова, О.В. Вахромеева, А.В. Титова, Н.И. Дивлекеева, А.В. Донских, Ю.В. Соболева, И.В. Климова, О.И. Щербакова

Арт-директор: М.А. Лындина
Отдел дизайна и верстки:
М.Н. Григорьева, И.А. Панова, М.И. Полякова, А.И. Смирнов
Корректор — М.А. Баширова

Подписка и распространение:
Тел.: (495) 332-02-63
E-mail: subscription@bionika-media.ru
Свободная цена
Индексы по каталогу «Роспечать»
71400 — для индивидуальных подписчиков
71401 — для предприятий и организаций

Формат 60×90 1/8. Печ. л. 16. Отпечатано в ООО «Борус-Пресс». Тираж 5000 экз. Адрес: 300041, г. Тула, ул. Сойфера, д. 6.
Перепечатка и любое воспроизведение материалов и иллюстраций в печатном или электронном виде из журнала «Акушерство и гинекология» допускается только с письменного разрешения Издателя ООО «Бионика Медиа»

ISSN 0300-9092 (печ. вер.) ISSN 2412-5679 (эл. вер.) Акуш. и гин. 2016. № 6
© ООО «Бионика Медиа»

Организации-разработчики:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

НЕИНВАЗИВНЫЙ ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ДНК-СКРИНИНГ АНЕУПЛОИДИЙ ПЛОДА ПО КРОВИ МАТЕРИ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Клинические рекомендации

Одобрено Российским обществом акушеров-гинекологов

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

Содержание

Аннотация ... 3
Введение ... 3
Преимущества ДНК-скрининга ... 4
Проведение ДНК-скрининга ... 4
Общие принципы ... 4
Показания к проведению ДНК-скрининга ... 4
Противопоказания к проведению ДНК-скрининга ... 4
Клинические ситуации, при которых проведение ДНК-скрининга невозможно ... 4
Клинические ситуации, при которых проведение ДНК-скрининга ограничено ... 4
Особенности проведения ДНК-скрининга ... 5
Последовательность процедуры ДНК-скрининга ... 6
Меры предосторожности при проведении анализа ... 7
Эффективность ДНК-скрининга ... 7
Возможные проблемы и способы их устранения ... 8
Безопасность технологии ... 9
Социальные, правовые и этические вопросы проведения ДНК-скрининга ... 9
Валидация ДНК-скрининга ... 9
Первая выборка ... 9
Дизайн исследования ... 9
Характеристика выборки ... 9
Результаты ... 10
Вторая выборка ... 11
Дизайн исследования ... 11
Характеристика выборки ... 12
Результаты ... 13
Результаты валидации ДНК-скрининга ... 14
Заключение ... 14
Материально-техническое обеспечение ДНК-скрининга ... 15
Оборудование ... 15
Реактивы и расходные материалы ... 15
Список литературы ... 16

Приложения
Приложение 1. Образец информированного согласия ... 19
Приложение 2. Образец сопроводительного документа-направления на исследование ... 20
Приложение 3a. Образец лабораторного заключения (пример 1) ... 21
Приложение 3b. Образец лабораторного заключения (пример 2) ... 22

Электронная версия

Аннотация

Хромосомные анеуплоидии – генетическая патология, при которой число хромосом в клетках не кратно основному набору. Они являются одной из ведущих причин перинатальной смертности и детской инвалидности и приводят к проявлению у новорожденных синдрома Дауна (трисомия по 21-й хромосоме), синдрома Эдвардса (трисомия по 18-й хромосоме), синдрома Патау (трисомия по 13-й хромосоме) и других патологий. При стандартном неинвазивном скрининге беременных с целью выявления хромосомных аномалий, основанном на данных УЗИ и биохимических показателях (комбинированнный скрининг), оцениваются только косвенные маркеры хромосомных аномалий. Новый неинвазивный пренатальный скрининговый метод основан на прямом анализе внеклеточной ДНК плода в крови матери и обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Данные клинические рекомендации описывают технологию проведения неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери с помощью метода высокопроизводительного секвенирования и адресованы врачам акушерам-гинекологам, сотрудникам клинико-диагностических лабораторий, врачам-генетикам, врачам лабораторным генетикам и другим специалистам в области репродуктивного здоровья.

Введение

В структуре причин репродуктивных потерь, неонатальной смертности и детской инвалидности одно из ведущих мест занимают хромосомные анеуплоидии. Анеуплоидии обуславливают не менее 30% спорадических неразвивающихся беременностей и выкидышей, а у новорожденных встречаются с частотой до 1:300 [1]. Одними из самых частых анеуплоидий, приводящих к рождению ребенка с пороками и задержкой развития, являются трисомии по 21, 18 и 13-й хромосомам. Они встречаются в одном случае на 650–1000, 6000–8000 и 10000–16000 новорожденных соответственно [2–4]. Риск данных хромосомных нарушений у плода существенно возрастает с возрастом матери. Причиной синдромов Дауна, Эдвардса или Патау у детей также могут являться частичные анеуплоидии, при наличии у клинически здоровых родителей сбалансированных перестроек (транслокаций), в которые вовлечены хромосомы 21, 18 и 13.

В настоящее время при массовом биохимическом скрининге с целью выявления хромосомных нарушений во II триместре беременности, который осуществляется в соответствии с Приказом Минздрава России от 28.12.2000 №457 «О совершенствовании пренатальной диагностики в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей», в группу риска попадает много женщин, вынашивающих здоровый плод. Так, после проведения скрининга маркеров сывороточных белков на сроке беременности 15–17 недель трисомия по 21-й хромосоме с помощью инвазивных методов подтверждается лишь примерно у 1 из 80 беременных. Это приводит к снижению доверия к результатам скрининга и, как следствие, к значительному количеству отказов от подтверждающей инвазивной диагностики, в том числе среди пациентов, беременность которых заканчивается рождением больного ребенка. В частности, от инвазивной пренатальной диагностики отказываются около половины женщин, вынашивающих плод с трисомией по 21-й хромосоме, которые по результатам исследования сывороточных белков во II триместре были отнесены к группе высокого риска анеуплоидий [5].

В последние несколько лет в России все шире внедряется новый порядок пренатального обследования, впервые регламентированный Постановлением Правительства Российской Федерации от 31.12.2009 №1159. Он базируется на результатах УЗИ и биохимических показателях в I триместре и на данных УЗИ для исключения поздно манифестирующих пороков развития во II триместре. Этот скрининг также основан на косвенных маркерах и имеет ограничение по чувствительности и специфичности, колебания биохимических показателей зависят как от хромосомного статуса плода, так и от гормонального статуса беременной женщины. В результате комбинированный скрининг I триместра (сочетание биохимических

Коллектив авторов:
ФГБУ НЦАГиП им. В.И. Кулакова Минздрава России:
Сухих Геннадий Тихонович, директор, академик РАН
Трофимов Дмитрий Юрьевич, заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов, д.б.н., профессор РАН
Барков Илья Юрьевич, врач лабораторный генетик лаборатории молекулярно-генетических методов
Донников Андрей Евгеньевич, к.м.н., с.н.с. лаборатории молекулярно-генетических методов
Шубина Екатерина Сергеевна, м.н.с. лаборатории молекулярно-генетических методов
Коростин Дмитрий Олегович, м.н.с. лаборатории молекулярно-генетических методов
Екимов Алексей Николаевич, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории молекулярно-генетических методов
Гольцов Андрей Юрьевич, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов
Бахарев Владимир Анатольевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией репродуктивной генетики
Каретникова Наталья Александровна, д.м.н., в.н.с. лаборатории репродуктивной генетики
Боровиков Павел Игоревич, заведующий лабораторией биоинформатики
Тетруашвили Нана Картлосовна, д.м.н., заведующая 2-м акушерским отделением патологии беременности
Ким Людмила Викторовна, аспирант 2-го акушерского отделения патологии беременности
Гата Альбина Сергеевна, к.м.н., заведующая отделом лицензирования и аккредитации
Павлович Станислав Владиславович, к.м.н., доцент, ученый секретарь

ФГБОУ МГУ им М.В. Ломоносова:
Скрябин Константин Георгиевич, академик РАН, заведующий кафедрой биотехнологии, биологический факультет
Прохорчук Егор Борисович, д.б.н., профессор кафедры биотехнологии, биологический факультет
Мазур Александр Михайлович, к.ф.-м.н., старший преподаватель кафедры биотехнологии, биологический факультет
Пантюх Катерина Сергеевна, аспирант кафедры биотехнологии, биологический факультет

маркеров с данными УЗИ), даже при четком соблюдении сроков обследования, позволяет отнести в группу риска для последующего проведения инвазивной диагностики лишь около 80% беременностей плодами с трисомией по 21-й хромосоме [6].

Таким образом, имеется необходимость в разработке и внедрении в практическое здравоохранение более современных неинвазивных скрининговых методов, позволяющих выделять группу риска с более высокой точностью.

Наиболее перспективным в данном направлении является неинвазивный пренатальный метод скрининга анеуплоидий, основанный на анализе внеклеточной ДНК плода в крови матери (далее «ДНК-скрининг», ПДС) [7, 8]. Источником внеклеточной ДНК плода в кровотоке матери являются апоптотические клетки плодового происхождения [9]. В большинстве случаев ДНК плода циркулирует в крови матери в количестве, достаточном для надежного анализа существующими в настоящее время методами, начиная с 10-11 недель беременности, и не детектируется уже через сутки после родов. Это позволяет осуществлять ДНК-скрининг по крови матери, в том числе, у повторно беременных женщин [10].

ДНК-скрининг по крови матери может проводиться с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing – NGS), которая в настоящее время начинает широко применяться в мировой и российской лабораторной практике для решения клинических задач [11, 12]. Высокопроизводительное секвенирование суммарной внеклеточной ДНК матери и плода с последующим статистическим биоинформационным анализом позволяет оценить количество фрагментов, приходящихся на каждую из хромосом, что дает возможность детектировать наличие или отсутствие анеуплоидий плода.

Преимущества ДНК-скрининга

Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери, в отличие от применяемых в настоящее время методов УЗИ и биохимического скрининга, является прямым методом исследования и может служить эффективным инструментом выявления хромосомных анеуплоидий плода у беременных женщин. По данным многочисленных исследований метод обладает высокими диагностическими характеристиками [13–20] и может применяться уже с 10–11 недель беременности, в том числе и у повторно беременных. Это позволяет рекомендовать применение ДНК-скрининга большинству беременных женщин для исключения анеуплоидий у плода.

Благоприятные результаты ДНК-скрининга позволяют с высокой вероятностью исключить анеуплоидии плода по исследуемым хромосомам, в том числе при решении вопроса о пролонгировании беременности на ранних сроках у женщин с угрожающим и привычным выкидышем.

Внедрение ДНК-скрининга по крови матери как рутинного скрининга беременных может совершить прорыв в оказании помощи беременным женщинам, позволит снизить число проводимых инвазивных процедур, при этом существенно уменьшить частоту рождения детей с тяжелыми инвалидизирующими заболеваниями и перинатальную смертность [21–24].

Проведение ДНК-скрининга

Общие принципы

1. ДНК-скрининг по крови матери должен быть добровольным.
2. Перед ДНК-скринингом показано ультразвуковое исследование, в частности, для получения сведений о количестве плодов, особенностях анатомии плода, оценки его жизнеспособности, при необходимости, уточнения срока беременности.
3. ДНК-скрининг рекомендуется проводить при сроке беременности не менее 10–11 акушерских недель.
4. При выявлении высокого риска хромосомных нарушений с помощью ДНК-скрининга необходимо проведение подтверждающих диагностических инвазивных процедур с получением результатов кариотипирования до 22 акушерских недель. В связи с этим, учитывая суммарное время выполнения процедуры ДНК-скрининга и подтверждающей инвазивной диагностики (около двух недель каждое), направление на ДНК-скрининг целесообразно осуществлять до срока беременности 17 акушерских недель.

Показания к проведению ДНК-скрининга

Скрининговое определение анеуплоидий плода (включая определение частичных анеуплоидий при наличии у плода несбалансированных транслокаций, ассоциированных с синдромами Дауна, Эдвардса и Патау) при одноплодной беременности всем женщинам, не имеющим противопоказаний.

Противопоказания к проведению ДНК-скрининга

1. Онкологические заболевания у беременной женщины.
2. Многоплодная беременность, включая случаи спонтанной редукции одного из плодов.

Клинические ситуации, при которых проведение ДНК-скрининга невозможно

Уровень плодовой ДНК ниже порога аналитической чувствительности метода (обычно 4–5%), что часто наблюдается при сроках беременности менее 10–11 недель.

Клинические ситуации, при которых проведение ДНК-скрининга ограничено

1. Индекс массы тела пациента более 30 кг/м^2.
2. Беременность, наступившая в результате ЭКО с использованием донорской яйцеклетки и при суррогатном материнстве.
3. Мозаицизм в соматических клетках матери, плода и его оболочек, в который вовлечены исследуемые хромосомы.
4. Наличие у пациента донорских органов и тканей.

ООО "ПРОНИКА МЕДИА"

Особенности проведения ДНК-скрининга

1. Все этапы анализа проводятся строго в соответствии с инструкциями производителей оборудования и наборов реагентов, стандартными операционными процедурами (СОП) или иными документами, утвержденными в данном учреждении, а также региональными и федеральными нормативными документами, регламентирующими лабораторно-диагностическую деятельность и порядок оказания медико-генетической помощи, в том числе «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утв. Минздравом СССР 17.01.1991 г.), Национального стандарта РФ ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» (утв. и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007г. №531-ст).

2. При наличии у лаборатории технической возможности определять долю внеклеточной ДНК плода, в отдельных случаях исследование может быть выполнено на более ранних сроках беременности при условии достижения доли плодовой ДНК порога аналитической чувствительности метода (обычно 4–5%). Доля плодовой ДНК зависит как от срока беременности, так и от массы тела беременной женщины и ряда других факторов [25–27]. В большинстве случаев к сроку беременности 10–11 акушерских недель она достаточна для проведения анализа на анеуплоидии. Однако примерно в 3–5% случаев получить результат не удается, в том числе из-за низкой доли плодовой ДНК [25, 28]. Практика показывает, что повторный забор крови на более поздних сроках позволяет получить результат только в 50–60% случаев, так как у части женщин доля плодовой ДНК остается низкой и на более поздних сроках. Тактика дальнейшего обследования пациента в этом случае должна быть согласована с врачом-генетиком и врачом акушером-гинекологом для принятия решения о проведении инвазивной пренатальной диагностики, так как низкая доля внеклеточной плодовой ДНК может быть связана с повышенным риском анеуплоидий [25, 29].

3. Технически получение результата возможно вплоть до момента родоразрешения. Однако положительные результаты тестирования необходимо подтверждать стандартными инвазивными диагностическими процедурами – биопсия хориона, плацентоцентез, амниоцентез, кордоцентез с дальнейшим проведением кариотипирования плода. При этом прерывание беременности по медицинским показаниям (хромосомная патология плода) разрешено до 22 недель беременности (Приказ Минздрава России от 3 декабря 2007г. №736). В связи с этим, учитывая время, необходимое для проведения самого исследования (до двух недель), а также процедур по подтверждению хромосомной патологии и прерыванию беременности, забор биоматериала для ДНК-скрининга целесообразно осуществлять до 17 акушерских недель. При наличии возможности провести подтверждающую диагностику за меньшее время (например, с помощью молекулярного кариотипирования) сроки исследования могут быть изменены.

4. Перед исследованием пациент должен быть ознакомлен с возможностями и ограничениями метода, а также подписать информированное согласие (см. образец в приложении 1). Пациенты должны быть проинформированы о том, что:

- ДНК-скрининг по крови матери предназначен для выявления женщин с высоким риском наличия анеуплоидий у плода и не заменяет диагностические инвазивные тесты;
- в случае выявления хромосомных нарушений с помощью ДНК-скрининга по крови матери необходимо проведение подтверждающих диагностических инвазивных процедур;
- пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий по крови матери не предназначен для выявления микроаномалий хромосом, мозаицизма, полиплоидии, структурных аномалий хромосом, моногенных и других генетических заболеваний, не связанных с анеуплоидиями;
- при наличии в семье ранее выявленных наследственных патологий может потребоваться назначение иных видов скрининговых тестов или проведение пренатальной диагностики с целью исключения конкретных заболеваний; в этом случае семье необходимо проконсультироваться с врачом-генетиком;
- отсутствие у плода нарушений по данным неинвазивного пренатального ДНК-скрининга по крови матери не гарантирует отсутствие анеуплоидий как по исследованным, так и по другим хромосомам. Наибольшая точность исследования достигается при выявлении анеуплоидий 21-й и 18-й хромосом, тогда как точность выявления трисомии по 13-й и численных нарушений по половым хромосомам – ниже;
- при низкой доле внеклеточной плодовой ДНК в крови матери получение результатов теста может оказаться невозможным; в этом случае необходима консультация врача-генетика и врача акушера-гинеколога, в том числе для решения вопроса о целесообразности проведения повторного исследования и инвазивной пренатальной диагностики.

5. Несмотря на то что потенциально данный скрининговый метод обладает возможностью выявлять хромосомные микроделеции и микродупликации, назначение подобных исследований в настоящий момент не представляется целесообразным в связи с недостаточной валидированностью подобных исследований.

6. ДНК-скрининг по крови матери подразумевает только исследование на наличие анеуплоидий. Если требуется определение пола плода, это должно быть отдельно отражено в письменном заявлении пациента до начала исследования.

7. Результаты ДНК-скрининга не должны рассматриваться в отрыве от результатов других клинических тестов. В частности, при выявлении пороков развития плода с помощью УЗИ, необходимо проведение медико-генетического консультирования для решения вопроса о возможном назначении

ООО "ПРОНИМЕДИА"

инвазивных диагностических процедур вне зависимости от результатов ДНК-скрининга.

8. Результаты ДНК-скрининга должны интерпретироваться врачом акушером-гинекологом или врачом-генетиком. В случае неблагоприятных результатов ДНК-скрининга консультация врача-генетика обязательна.

Последовательность процедуры ДНК-скрининга

1. В сопроводительном документе-направлении указывается: наименование исследования; фамилия, имя, отчество, возраст/дата рождения, рост, вес, акушерский гестационный срок, подтверждение одноплодной беременности, дата и время взятия пробы, характер наступления беременности (самопроизвольно, в результате вспомогательных репродуктивных технологий, суррогатное материнство). Образец сопроводительного документа-направления представлен в приложении 2.

2. Для исследования используется плазма крови беременной женщины, полученная натощак. Кроме того, следует учитывать, что повышенная физическая активность перед взятием биоматериала может приводить к снижению доли внеклеточной плодовой ДНК [30]. В качестве антикоагулянта применяется ЭДТА. Рекомендуемый объем крови – 9 мл. Указанный объем позволяет, при необходимости, провести повторное исследование.

3. Кровь аспирируется в предварительно промаркированные пробирки. Для получения необходимого объема биоматериала допускается использование нескольких пробирок меньшего объема (например, 2 пробирки объемом 5 мл). В этом случае каждая пробирка должна быть промаркирована индивидуально. Пробирки должны заполняться кровью полностью, в пределах ±10% от указанного объема (то есть пробирка на 10 мл должна быть заполнена в пределах 8–10 мл).

4. Сразу после получения крови необходимо перемешать ее с антикоагулянтом, плавно переворачивая пробирку не менее 10 раз, если производителем не рекомендуется иначе. Кровь нужно перемешивать аккуратно, не допускается встряхивание.

5. Особенности взятия крови с помощью венозных катетеров:

- постоянные катетеры необходимо промыть физиологическим раствором, затем удалить из катетера достаточное количество крови, не менее двух объемов «мертвого пространства» катетера, чтобы быть уверенным, что проба не разбавлена и не контаминирована лекарственными средствами и антикоагулянтами.

6. В зависимости от предполагаемого срока доставки крови в лабораторию могут использоваться разные пробирки для получения биоматериала:

6.1. Доставка осуществляется в течение 2–3 часов. Взятие крови осуществляется в пробирки с антикоагулянтами K2E, K3E (ГОСТ Р ИСО 6710-2009), содержащими двукалиевую или трикалиевую соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в конечной концентрации 1,2–2 мг/мл крови (4–7 ммоль/л). Хранение и транспортировка производятся при температуре +4–10°С (замораживание не допускается).

6.2. При отсутствии возможности транспортировки биологического материала в лабораторию в течение 2–3 часов необходимо взятие крови в специальные пробирки со стабилизатором внеклеточной ДНК (Cell-Free DNA BCT, Streck, США, или аналогичные), обеспечивающие стабильность внеклеточной ДНК в течение нескольких дней. Хранение и транспортировка биоматериала производятся в соответствии с рекомендациями производителей указанных выше пробирок (обычно при комнатной температуре не выше 24°С, замораживание не допускается).

6.3. Разрешается хранение и транспортировка подготовленной для исследования плазмы (см. п.8) в замороженном виде, не допуская размораживания.

7. Клинический материал доставляется в лабораторию лицами, получившими специальный инструктаж, с учетом правил транспортировки.

8. Получение плазмы из цельной крови проводится с помощью двух последовательных центрифугирований продолжительностью 15–30 минут сначала при низком центробежном ускорении (1000–2000g) для разделения плазмы и клеток крови, затем при высоком центробежном ускорении (не менее 12000g). Это обеспечивает максимальное снижение риска лизиса клеток при получении плазмы на первом этапе, и избавление от клеточных элементов на втором, что крайне важно, так как контаминация материнской геномной ДНК может существенно влиять на долю плодовой ДНК и, как следствие на результаты скрининга.

9. Выделение внеклеточной ДНК из плазмы крови проводится специально предназначенными для этого наборами, согласно инструкциям производителей.

10. Процедура приготовления библиотек ДНК* состоит из ряда ферментативных реакций, чередующихся с процедурами очистки. В результате после модификации к 5'- и 3'-концам фрагментов ДНК присоединяются адаптерные нуклеотидные последовательности, необходимые для проведения изолированной амплификации и последующего секвенирования. В некоторых случаях производят отбор фракции ДНК необходимой длины. По окончании процедуры осуществляется контроль качества приготовленных библиотек ДНК с помощью флуоресцентного автоматического анализатора (например, Bioanalyzer 2100, Agilent) или другими адекватными методами.

11. Независимо от платформы, на которой проводится высокопроизводительное секвенирование ДНК, общая схема процесса состоит из двух этапов [31]:

- изолированная амплификация отдельных молекул библиотеки ДНК;
- секвенирование.

В случае платформы Ion Proton первый этап представляет собой эмульсионную ПЦР (эПЦР), в ее состав входят микросферы, на поверхности которых осуществляется амплификация ДНК. После завершения эПЦР контролируется эффективность ее прохождения и проводится обогащение сфер, несущих на своей поверхности продукты эПЦР. Секвенирование ДНК на сферах проводится на полупроводниковом секвенаторе Ion Proton и осно-

* Библиотекой ДНК в случае ДНК-скрининга называется совокупность всех фрагментов внеклеточной ДНК исследуемого образца, подготовленных особым образом для высокопроизводительного секвенирования.

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

вано на детекции специальными микросенсорами ионов водорода, выделяющихся в процессе реакции полимеризации (синтеза) ДНК.

При использовании платформы Illumina первый этап представлен так называемой «кластерной» ПЦР («мостиковой» ПЦР, bridge PCR) на поверхности проточной ячейки, помещаемой в секвенатор. В результате образуются кластеры ДНК, каждый из которых состоит из одинаковых копий одного из фрагментов приготовленной ранее библиотеки ДНК. Секвенирование кластеров основано на использовании обратимо блокированных терминирующих нуклеотидов, каждый из которых мечен своим флуорофором и несет на себе группу, блокирующую образование фосфодиэфирной связи после присоединения к синтезирумой цепи ДНК. После детекции вида присоединенного к кластеру нуклеотидного основания, блокирующая группа и флуорофор снимаются, цикл повторяется.

12. Первичный анализ данных секвенирования обычно осуществляется на сервере, управляющем прибором. Анализ включает оценку контролей качества секвенирования и выполнение первичных этапов биоинформатической обработки (выравнивание на референсный геном, фильтрация ПЦР-дупликатов, нормализация данных и др.).

13. В результате высокопроизводительного секвенирования внеклеточной ДНК, выделенной из плазмы крови матери, получают информацию о нуклеотидной последовательности 5–10 млн фрагментов. Затем каждый фрагмент анализируется на принадлежность к определенной хромосоме. Таким образом устанавливается количество фрагментов внеклеточной ДНК (суммарно материнского и плодового происхождения), приходящееся на каждую из хромосом, что позволяет детектировать случаи анеуплоидий. Так, например, если доля ДНК плода равна 10% от суммарной внеклеточной ДНК, то при трисомии одной из хромосом будет наблюдаться увеличение общего количества фрагментов данной хромосомы на 5% по сравнению с нормой. Необходимость значительного количества секвенированных фрагментов, помимо требований к высокой достоверности результатов анализа, обусловлена как небольшой долей ДНК плодового происхождения, так и малой долей каждой из хромосом в геноме (например, хромосома 21 составляет всего около 1,5%). Данный метод анализа является одним из вариантов опубликованного в литературе биоинформатического алгоритма обработки результатов [11, 32]. Существуют также и другие подходы к анализу данных [14, 28].

14. На основании результатов анализа данных высокопроизводительного секвенирования формируют лабораторное заключение. Примеры лабораторных заключений представлены в приложениях 3a и 3b. Лабораторное заключение не означает постановку диагноза согласно МКБ-10.

Несоблюдение вышеизложенных требований может явиться причиной отсутствия результатов и затруднений при их интерпретации.

Общая продолжительность исследования зависит как от скорости доставки материала в лабораторию, так и от скорости анализа и интерпретации данных и может занимать от 5–10 рабочих дней, но не должно превышать две календарные недели.

Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг является комплексом взаимосвязанных лабораторных и биоинформатических этапов, поэтому при изменении любого из них может потребоваться полная валидация всей процедуры. Исключения составляют те случаи, когда производители указанных в настоящих Рекомендациях оборудования, реактивов, расходных материалов и программного обеспечения проводят обновление продукции, заменяя ее на совместимые аналоги, не уступающие по своим качественным и количественным характеристикам.

Меры предосторожности при проведении анализа

1. При проведении исследования необходимо соблюдать все правила работы с биологическим материалом человека.
2. Работу с анализируемыми образцами следует проводить в одноразовых медицинских перчатках без талька.
3. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.
4. Выделение ДНК и приготовление реакционной смеси следует проводить в ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком или ПЦР-боксах.
5. Для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК и ПЦР следует проводить в раздельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.
6. Необходимо избегать перемещения из одного помещения в другое лабораторного оборудования, в том числе пипеток, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов, а также реагентов и других расходных материалов.
7. Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
8. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
9. Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Эффективность ДНК-скрининга

По данным многочисленных исследований [13–20] метод неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери обладает высокими диагностическими характеристиками, которые, однако, могут различаться в зависимости от исследуемых хромосом (табл. 1). Здесь и далее диагностические характеристики приводятся с 95% доверительным интервалом в соответствии с «Правилами оценки клинической информативности лабораторных тестов. ГОСТ Р 53022.3-2008».

ООО "ПУБЛИКАЦИЯ"

Таблица 1. Диагностические характеристики ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери для различных хромосом (приведены с 95% доверительным интервалом, рассчитанным по обобщенным данным [13-20])

Анализируемая хромосома	Проведено исследований	Чувствительность, %	Специфичность, %	Положительная предиктивная оценка (PPV)*, %	Отрицательная предиктивная оценка (NPV)**, %
21	77 308	99,17 (98,48–99,6)	99,94 (99,91–99,95)	96,07 (94,84–97,08)	99,99 (99,98–99,99)
18	77 308	97,80 (95,7–99,04)	99,94 (99,92–99,96)	88,97 (85,48–91,87)	99,99 (99,98–100)
13	69 572	95,74 (89,46–98,83)	99,93 (99,91–99,95)	64,75 (56,2–72,66)	99,99 (99,99–100)
X/Y	22 237	92,75 (83,89–97,61)	99,91 (99,86–99,94)	76,19 (65,65–84,81)	99,98 (99,95–99,99)

*Положительная предиктивная оценка (PPV) – это процент лиц с положительными результатами теста, у которых имеется искомое заболевание. PPV позволяет оценить вероятность того, что заболевание действительно имеется, если результаты теста положительные. Зависит от свойств теста и характеристик исследуемой выборки;
**Отрицательная предиктивная оценка (NPV) – это процент лиц с отрицательными результатами теста, у которых нет искомого заболевания. NPV позволяет оценить вероятность того, что заболевание действительно отсутствует, если результаты теста отрицательные. Зависит от свойств теста и характеристик исследуемой выборки.

Приведенные данные, а также результаты валидации в российских лабораториях (см. табл. 8) демонстрируют, что предсказательная ценность отрицательного результата ДНК-скрининга по крови матери крайне высока и позволяет с высокой вероятностью (>99,9%) исключить наличие анеуплоидий по 21, 18, 13-й и половым хромосомам. В то же время предсказательная ценность положительного результата не достаточно высока и требует обязательного подтверждения с помощью инвазивных методов диагностики.

При анализе причин получения ложноположительных результатов ДНК-скрининга было установлено, что у части таких пациентов в дальнейшем были выявлены онкологические заболевания различной локализации в промежутке времени от 3 до 39 недель после проведения исследования. При сопоставлении стадии онкологического заболевания и сроков установления диагноза можно сделать вывод о наличии онкологического процесса на момент проведения исследования по крайней мере в части случаев. Чаще всего у пациентов с онкологическими заболеваниями по результатам неинвазивного ДНК-скрининга выявляли сочетанные хромосомные нарушения, затрагивающие несколько хромосом [34].

В некоторых случаях причиной ошибочных результатов пренатального ДНК-скрининга может явиться мозаицизм, то есть несовпадение генотипа плода с генотипом его оболочек или наличие клеточных линий с разным генотипом в организме матери [35–38]. Подтверждение и интерпретация случаев мозаицизма является одной из наиболее сложных проблем пренатальной диагностики.

Несмотря на отмеченные ограничения, ДНК-скрининг значительно превышает по эффективности существующие в настоящее время скрининговые методы, что позволяет рассматривать его в качестве наиболее перспективного [21–24].

Возможные проблемы и способы их устранения

Возможные проблемы и способы их устранения представлены в табл. 2.

Таблица 2. Возможные проблемы и способы их устранения

Описание проблемы	Способы устранения
Низкая доля плодовой ДНК (ниже порога аналитической чувствительности метода, обычно 4-5%).	- При сроке беременности менее 11 недель произвести повторное взятие биологического материала не ранее, чем через две недели, но не позднее 17 недель беременности. - При сроке беременности 11 недель и более при индексе массы тела женщины менее 30 кг/м2 проинформировать врача-генетика о возможном риске наличия анеуплоидий (согласно опубликованным данным низкая доля плодовой ДНК может быть ассоциирована с наличием анеуплоидий [25]).
Признаки гемолиза в плазме.	Повторное взятие крови с использованием иглы большего диаметра и другие меры для предотвращения механического разрушения клеток, а также строгое соблюдение правил транспортировки и хранения биоматериала.
Гиперлипемия (хилезная плазма).	- При наличии видимых признаков гиперлипемии образец не должен исследоваться, так как нельзя исключить неравномерное распределение внеклеточной ДНК между инфранатантом и жировой фракцией [33]. - Необходимо произвести повторное взятие биологического материала.
Попадание в исследуемый образец лекарственных препаратов, влияющих на возможность или эффективность выделения нуклеиновых кислот из биологического образца и/или прохождение реакции амплификации (гепарин и др.).	Необходимо произвести повторное взятие биологического материала, приняв меры для исключения попадания в исследуемый образец лекарственных препаратов, влияющих на возможность или эффективность выделения нуклеиновых кислот из биологического образца и/или прохождение реакции амплификации.

ООО "ПРОНИКА МЕДИА"

Безопасность технологии

Степень риска развития нежелательных побочных реакций и побочных эффектов при применении данной технологии определяется риском осложнений при получении биоматериала (венепункции):

- образование подкожной гематомы при сквозном прокалывании обеих стенок вены;
- развитие флебита и тромбофлебита в результате нарушений правил асептики;
- попадание возбудителя инфекции в сосудистое русло;
- повреждения надкостницы (периостит), нервов (паралич, неврит), воздушная эмболия вследствие нарушения техники выполнения венепункции.

Профилактика этих осложнений – атравматичное выполнение венепункции с соблюдением правил асептики [39].

Данный риск считается приемлемым при проведении диагностических мероприятий.

Социальные, правовые и этические вопросы проведения ДНК-скрининга

Согласно рекомендациям ВОЗ и требованиям ФЗ N323 от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», ДНК-скрининг анеуплоидий по крови матери должен осуществляться в соответствии с принципами информированного добровольного согласия, с обязательной гарантией конфиденциальности в отношении получаемой информации. Неблагоприятные результаты ДНК-скрининга должны сопровождаться генетическим консультированием [40].

Несмотря на неинвазивность, данная технология направлена на выявление хромосомных анеуплоидий у плода, лечение которых на сегодняшний день невозможно. Поэтому ее применение не позволяет избежать этических проблем, свойственных пренатальной диагностике в целом, так как единственным способом предотвращения рождения больного ребенка является прерывание беременности.

При широком внедрении неинвазивного пренатального ДНК-скрининга существует вероятность использования его результатов в немедицинских целях, например, для селекции по полу [41]. Это следует учитывать при разработке нормативных документов, регламентирующих проведение массового ДНК-скрининга, в частности, представляется целесообразным запретить выдачу информации о поле плода на ранних сроках беременности, когда по действующему законодательству допускается прерывание беременности без медицинских показаний. Исключение может быть сделано только при выявлении у плода нарушений по числу половых хромосом, например, при выявлении у плода женского пола моносомии по Х-хромосоме, а также при наличии в семье сцепленных с полом наследственных заболеваний.

Валидация ДНК-скрининга

Первая выборка

Дизайн исследования

Оценка эффективности использования данной медицинской технологии для диагностики анеуплоидий плода в группе беременных высокого риска проведена в ФГБУ НЦАГиП имени В.И. Кулакова Минздрава России и описана в работе Г.Т. Сухих и соавт. [21].

Обследовано 259 женщин, направленных на пренатальную инвазивную диагностику с целью проведения кариотипирования плода. Взятие биоматериала для неинвазивного ДНК-скрининга осуществлялось на сроке беременности 10–20 недель (медиана составила 14 недель). Обследование также включало: скрининг I–II триместра беременности – эхография, определение содержания сывороточных маркеров, компьютерный анализ; цитогенетическое исследование; инвазивные процедуры. Внутриматочные вмешательства с целью получения хориона, плаценты, амниотической жидкости выполняли в 11–14 недель или в 17–20 недель в связи с противопоказаниями к проведению в ранние сроки беременности или поздним обращением женщины. У всех женщин было получено согласие на инвазивную пренатальную диагностику (биопсия ворсин хориона, плаценты, амниоцентез) и забор крови из вены для молекулярного анализа.

Перед проведением инвазивной пренатальной диагностики у женщин из периферической вены аспирировали 10,0 мл крови. Схема обследования беременных женщин представлена на рис. 1.

Полученный в ходе инвазивных процедур биологический материал анализировали с помощью стандартного цитогенетического метода – дифференциального G-окрашивания метафазных хромосом ворсин хориона, плаценты или амниотической жидкости по стандартному протоколу.

ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери проводили следующим образом. На первом этапе из крови женщины выделяли плазму. На втором этапе выделяли внеклеточную ДНК, содержащую материнскую и плодовую фракции. В последующем последовательно осуществляли приготовление библиотек ДНК для полупроводникового секвенирования, эмульсионную ПЦР и высокопроизводительное секвенирование (NGS) на приборе IonProton (LifeTechnologies ThermoFisher, США). Результаты оценивали с помощью биоинформатической обработки данных секвенирования ДНК. Достаточным считали содержание плодовой ДНК не менее 4%.

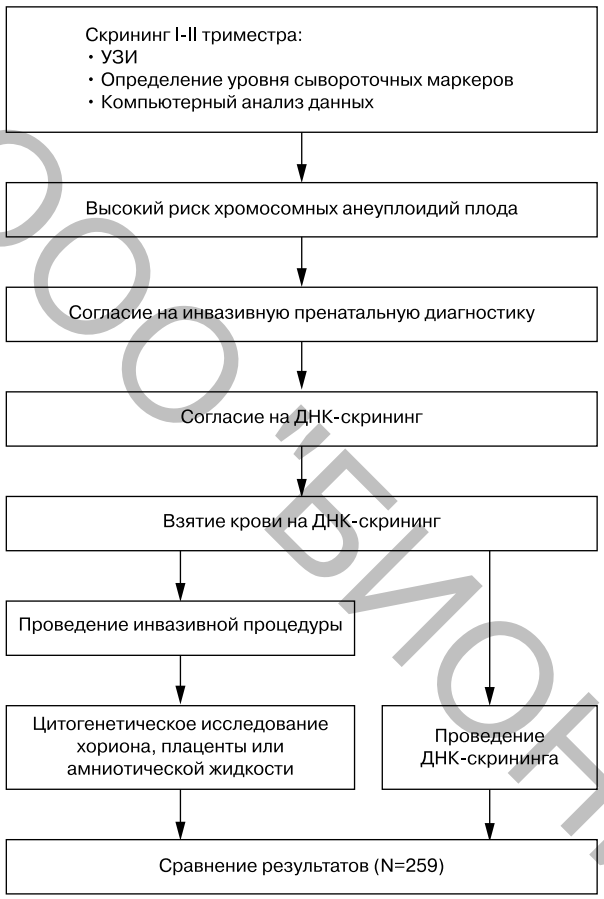
Оценка эффективности ДНК-скрининга по крови матери проведена в соответствии с «Правилами оценки клинической информативности лабораторных тестов. ГОСТ Р 53022.3-2008».

Характеристика выборки

Все беременные имели высокий риск хромосомной патологии плода, обусловленный возрастом, изменениями в уровнях сывороточных маркеров, особенно-

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

Рис. 1. Схема обследования беременных женщин



стями фенотипа плода. У 11% женщин предыдущие беременности закончились рождением детей с генетическими нарушениями или прерыванием неразвивающейся беременности с анеуплоидией у плода; 7% женщин страдали привычным выкидышем. У 13% беременность наступила после ЭКО, донорства яйцеклетки не было ни в одном случае. У 5% женщин в родословной отмечены случаи наследственной и врожденной патологии у близких родственников.

Результаты

Во всех 259 наблюдениях в образцах тканей плодового происхождения (хорион, плацента, амниотическая жидкость) был определен кариотип плода с помощью стандартного цитогенетического метода, а периферическая кровь женщин была исследована на наличие анеуплоидий и Y-хромосомы у плода методом высокопроизводительного секвенирования (неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг по крови матери). У 197 плодов по данным инвазивной диагностики установлен нормальный хромосомный набор, у 62 – патологический. Патология кариотипа была представлена: 34 наблюдения с трисомией по 21-й хромосоме, 11 наблюдений с трисомией по 18-й хромосоме, 5 наблюдений с трисомией по 13-й хромосоме, 12 наблюдений с моносомией хромосомы X.

Далее подробно проанализированы результаты, полученные при ДНК-скрининге по крови матери.

Среднее содержание доли плодовой ДНК в образцах составило 11,6% (90% доверительный интервал составил от 6,6 до 17,5%). В пяти образцах уровень плодовой ДНК был менее 4%, в связи с чем они были исключены из дальнейших расчетов диагностических характеристик ДНК-скрининга. Важно отметить, что в двух образцах с низкой долей плодовой ДНК молекулярно-генетическим методом не были выявлены трисомии по 21-й хромосоме (ложноотрицательный результат) (рис. 2), что подтвердило важность оценки доли плодовой ДНК для подтверждения валидности результатов ДНК-скрининга. Результаты выявления анеуплоидий для тех образцов, где доля плодовой ДНК была не менее 4%, представлены в табл. 3. Всего в анализ включено 254 образца.

Сопоставление полученных обоими методами результатов показало, что в 252 из 254 (99%) случаях данные цитогенетического и молекулярно-генетического исследований были идентичны. Всего молекулярно-генетическим методом было выявлено 62 анеуплоидии по 21, 18, 13-й и половым хромосомам, из них трисомия по 21-й хромосоме – 34 наблюдения, трисомия по 18-й хромосоме – 11 наблюдений, трисомия по 13-й хромосоме – 5 наблюдений, моносомия X-хромосомы – 12 наблюдений. Получен один ложноположительный результат при выявлении трисомии по 13-й хромосоме и один ложноположительный результат по моносомии хромосомы X. Результаты определения анеуплоидий по аутосомам в клинических образцах представлены на рис. 2.

При анализе половых хромосом все клинические образцы, где определялась Y-хромосома, были отнесены к мужскому полу, все отрицательные по Y-хромосоме образцы рассматривались как относящиеся к женскому полу. Моносомия хромосомы X была определена в 12 наблюдениях и подтверждена данными цитогенетического анализа в 11 (табл. 3).

Таблица 3. Результаты выявления анеуплоидий по анализируемым хромосомам с помощью неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери и инвазивной диагностики с применением стандартного цитогенетического метода (N=254)

Метод исследования	Анеуплоидии			
	Трисомии хромосом			Моносомия хромосомы X
	№ 21	№ 18	№ 13	
Цитогенетический (кариотипирование)	34	11	4	11
Молекулярно-генетический (ДНК-скрининг)	34	11	5	12

ООО "БИОНИКА МЕДИЦИНА"

В одном случае был получен результат, трактуемый как моносомия хромосомы X при наличии у плода нормального женского кариотипа 46,XX. Таким образом, чувствительность определения половых хромосом составила 100% (71,51–100%), специфичность – 99,59% (97,73–99,99%), что свидетельствует о возможности определения пола плода и моносомии по X-хромосоме (рис. 3).

Результаты выявления анеуплоидий молекулярно-генетическим и цитогенетическим методами представлены в табл. 4. По результатам испытаний выявлены 60 анеуплоидий по 21, 18 13-й и X-хромосомам, получен один ложноположительный результат по 13-й хромосоме и один ложноположительный результат по X-хромосоме.

В данном исследовании чаще всего наблюдали анеуплоидии по 21-й, 18-й и половым хромосомам, тогда как трисомии по 13-й хромосоме в обследованной выборке присутствовали в небольшом количестве. При выявлении моносомии хромосомы X и трисомии по 13-й хромосоме наблюдались ложноположительные результаты. Поэтому, несмотря на высокую чувствительность ДНК-скрининга при выявлении анеуплоидий по 13-й и половым хромосомам, специфичность диагностики ниже, чем для 21-й и 18-й хромосом.

Суммарная чувствительность ДНК-скрининга составила 100% (94,04–100%), специфичность – 98,97% (96,33–99,87%). PPV составила 96,77% (88,83–99,61%), NPV – 100% (98,10–100%). Общая эффективность теста при анализе анеуплоидий по хромосомам 21, 18, 13, X и Y, определяемая как доля истинных результатов среди всех проведенных исследований, составила 99,21% (97,18–99,90%).

Вторая выборка

Дизайн исследования

Оценка эффективности использования данной медицинской технологии для диагностики основных трисомий плода в группе беременных была проведена в рамках совместных с МГУ им. М.В. Ломоносова исследований.

Обследованы 270 женщин с различным риском хромосомной патологии плода, обусловленным возрастом беременной, изменениями в уровнях сывороточных маркеров, особенностями фенотипа плода. У всех женщин было получено информированное согласие на забор крови из вены для использования их образцов в научно-исследовательской работе. Медиана возраста женщин на момент беременности составляла 35,1 года, мода 37,5 года. Женщины проходили стандартное обследование в сроке беременности 10–20 недель, которое включало: скрининг I–II триместра беременности – эхография, определение содержания сывороточных маркеров, компьютерный анализ; при назначении врача цитогенетическое исследование биоматериала плода (инвазивное пренатальное исследование). Схема обследования представлена на рис. 4.

Рис. 2. Результаты биоинформатического анализа данных ДНК-скрининга по крови матери при определении анеуплоидий по 21, 18 и 13 хромосомам (темно-серым цветом обозначены образцы с нормальным количеством хромосом, светло-серым – с наличием анеуплоидии) N=259

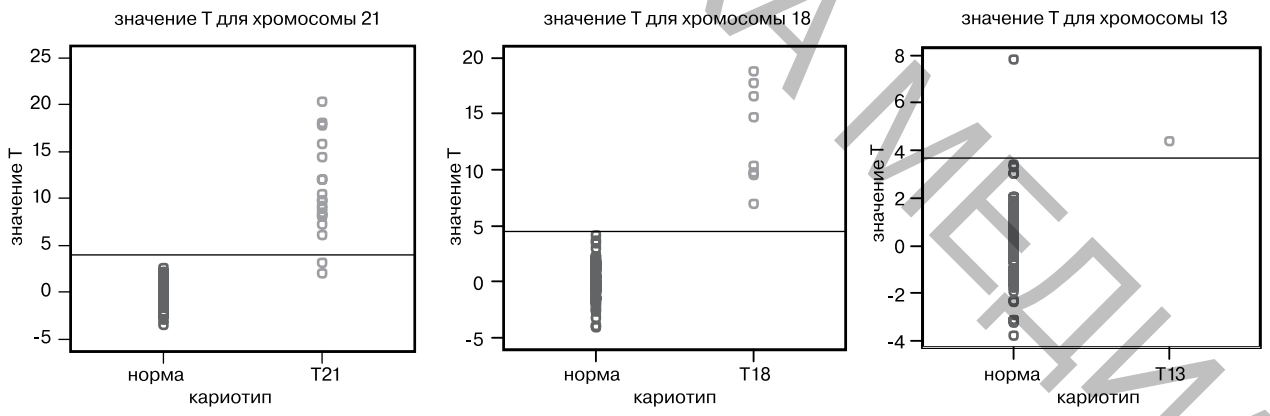


Таблица 4. Сравнение результатов ДНК-скрининга анеуплоидий по 21, 18, 13-й и половым хромосомам с данными кариотипирования плода

		Подлинный статус, количество наблюдений		
		Патология	Норма	Итого
Результат ДНК-скрининга	Патология	истинно положительный 60	ложноположительный 2	62
	Норма	Ложноотрицательный 0	истинно отрицательный 192	192
	Итого	60	194	254

ООО "ПОНИКА МЕДИА"

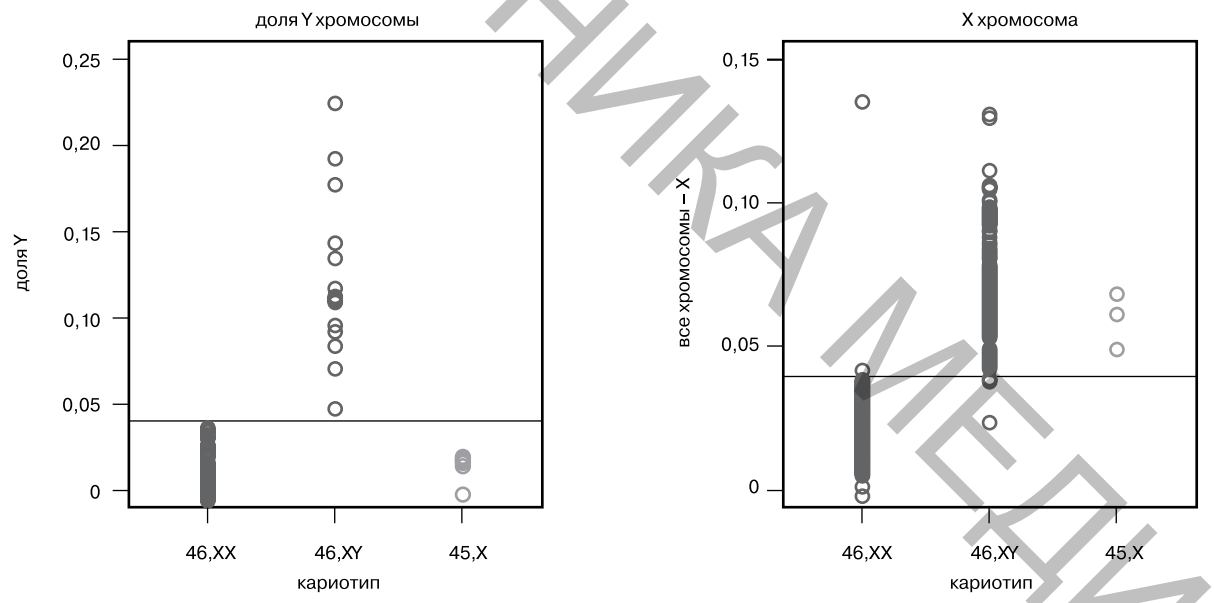
Таблица 5. Сравнение результатов неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери и инвазивной диагностики с применением стандартного цитогенетического метода

Метод исследования	Анеуплоидии			
	Трисомии хромосом			Моносомия хромосомы X
	№ 21	№ 18	№ 13	
Цитогенетический (кариотипирование)	9	1	0	1
Молекулярно-генетический (ДНК-скрининг)	10	1	0	1

Таблица 6. Сравнение результатов ДНК-скрининга анеуплоидий по 21, 18, 13 и половым хромосомам по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) с данными кариотипирования плода (выборка 2)

		Подлинный статус, количество наблюдений		
		Патология	Норма	Итого
Результат ДНК-скрининга	Патология	истинно положительный 11	ложноположительный 1	12
	Норма	ложноотрицательный 0	истинно отрицательный 258	258
	Итого	11	259	270

Рис. 3. ДНК-скрининг по крови матери: определение половых хромосом X и Y у плодов (темно-серым цветом обозначены образцы с нормальным количеством хромосом, светло-серым – с наличием анеуплоидии), N=259



Характеристика выборки

У 49% женщин был отмечен риск анеуплоидии по результатам биохимического скрининга, 8,6% женщин имели предыдущие невыношенные беременности, у 3% женщин были семейные случаи анеуплоидии или наследственных заболеваний, у 16% женщин было подозрение на хромосомную аномалию по УЗИ, у 4% женщин было бесплодие в анамнезе, у 0,7% женщин был случай мертворожденного ребенка, у 5% женщин беременность наступила после ЭКО.

ДНК-скрининг основных трисомий хромосом плода осуществляли следующим образом. На первом этапе из крови женщины выделяли плазму, на втором – внеклеточную ДНК, содержащую материнскую и плодовую фракции. В последующем осуществляли приготовление библиотек ДНК для высокопроизводительного (NGS) секвенирования на приборе HiSeq 1500 (Illumina, США). Данные секвенирования обрабатывали с использованием оригинального биоинформатического программного обеспечения. Достаточным считали содержание плодовой ДНК не менее 5%.

Оценку достоверности полученных результатов проводили путем сравнения с данными о кариотипе плода и исходах беременностей. Цитогенетическое

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

Таблица 7. Результаты валидации ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери (объединенные данные, 524 наблюдения)

Анализируемая хромосома	Чувствительность, %	Специфичность, %	Положительная предиктивная оценка (PPV), %	Отрицательная предиктивная оценка (NPV), %
21	100 (91,8–100)	99,8 (98,8–100)	97,7 (88–99,9)	100 (99,2–100)
18	100 (73,5–100)	100 (99,3–100)	100 (73,5–100)	100 (99,3–100)
13, X, Y	100 (47,8–100)	99,8 (98,9–100)	83,3 (35,9–99,6)	100 (99,3–100)

Таблица 8. Основные диагностические характеристики ДНК-скрининга анеуплоидий по 21, 18, 13 и половым хромосомам плода по крови матери

Анализируемая хромосома	Претестовая вероятность, анеуплоидии, %	Посттестовая вероятность наличия анеуплоидии в зависимости от результата ДНК-скрининга, %		Диагностические характеристики	
		При положительном результате ДНК-скрининга (PPV)	При отрицательном результате ДНК-скрининга (100-NPV)	Чувствительность,%	Специфичность, %
21	1,6	>94,84	<0,02	99,17	99,94
18	0,5	>85,48	<0,02	97,80	99,94
13	0,1	>56,20	<0,01	95,74	99,93
X/Y	0,3	>65,65	<0,05	92,75	99,91

Рис. 4. Схема обследования пациентов в МГУ им. М.В. Ломоносова

исследование тканей плодового происхождения проводили у 93 беременных из группы с высоким риском наличия хромосомной патологии плода. Среди обследованных 93 беременных было выявлено 11 (11,8%) случаев анеуплоидии плода. У 177 женщин из группы низкого риска беременность закончилась родами. После завершения беременности родами было получено фенотипическое подтверждение отсутствия анеуплоидий.

Специфичность ДНК-скрининга определяли как долю правильно определенных анеуплоидий (при сравнении с клиническими данными и данными кариотипирования).

Оценка диагностической ценности неинвазивного пренатального скрининга проведена в соответствии с «Правилами оценки клинической информативности лабораторных тестов. ГОСТ Р 53022.3-2008».

Результаты

Сроки беременности составляли от 10 до 18 недель (в среднем 14 недель). Среднее содержание доли ДНК плода в образцах составило 11,2%. В пяти образцах уровень плодовой ДНК был менее 5%. У этих женщин проводился повторный забор крови через 2 недели. Содержание внеклеточной ДНК плода в этих пяти образцах после повторного забора на более позднем сроке составляло не менее 5%.

Для всех 270 образцов периферической крови беременных женщин с достаточной долей плодовой ДНК отсутствие или наличие основных трисомий плода было определено неинвазивно молекулярно-генетическим методом. Отсутствие анеуплоидий у плода по данным ДНК-скрининга по крови матери было определено в 258 наблюдениях. Во всех

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

258 наблюдениях, для которых получен нормальный результат при проведении ДНК-скрининга по крови матери, беременность завершилась родами фенотипически нормальным ребенком.

Патология кариотипа была определена в 12 наблюдениях: 10 случаев трисомии по 21-й хромосоме, одно наблюдение с трисомией по 18-й хромосоме и одно наблюдение с моносомией Х-хромосомы. В 11 наблюдениях с выявленными неинвазивно анеуплоидиями эти данные совпали с результатами инвазивной пренатальной диагностики (табл. 5).

В одном случае трисомии по 21-й хромосоме результат ДНК-скрининга не был подтвержден при инвазивной пренатальной диагностике (ложноположительный результат). В 11 случаях из 12 данные, полученные как цитогенетическим, так и молекулярно-генетическим методом, были идентичны (табл. 6).

По результатам испытаний выявлены 12 анеуплоидий по 21, 18, 13-й и Х хромосомам, не получено ложноотрицательных результатов и получен один ложноположительный результат по хромосоме 21. Таким образом, чувствительность метода составила 100,00% (71,51–100%), специфичность – 99,61% (97,87–99,99%). PPV составила 91,67% (61,52–99,79%), NPV – 100% (98,58–100%).

Результаты валидации ДНК-скрининга

В обоих исследованиях ДНК-скрининг продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность при выявлении анеуплоидий плода по крови матери. При этом важно отметить, что приведенные значения PPV и NPV существенно зависят от распространенности той или иной анеуплоидии в обследуемой выборке (так называемая претестовая вероятность). Определение претестовой вероятности является крайне важным в диагностическом процессе, так как влияет на итоговую вероятность наличия заболевания в зависимости от результатов теста (так называемая посттестовая вероятность). Частота выявления анализируемых анеуплоидий в первой выборке составила 23,6%, тогда как во второй всего 4,1%, что объясняется особенностями формирования групп. Первая выборка состояла из беременных с высоким риском анеуплоидий по данным биохимического скрининга, тогда как во второй преобладали беременные с низким риском хромосомных аномалий. Тем не менее, посттестовые вероятности наличия анеуплоидий при положительном результате ДНК-скрининга (PPV) в обеих выборках были очень близки: 96,77% (88,83–99,61%) и 91,67% (61,52–99,79%) соответственно. Это дало основание для объединения результатов, полученных в первом и втором исследованиях (табл. 7).

Полученные в ходе валидации результаты в целом соответствуют литературным данным, что позволяет опираться на значения NPV и PPV, рассчитанные на основании литературных данных для большой выборки (табл. 1) при формировании лабораторного заключения.

Поскольку с практической точки зрения необходимо оценить вероятность наличия анеуплоидии, то при положительном результате теста она равна PPV, а при отрицательном результате – величине 100%-NPV. С учетом статистической неопределенности, в обоих случаях рекомендуется использовать нижнюю границу 95% доверительного интервала соответствующей величины.

Вероятность наличия анеуплоидий по 21, 18, 13-й и половым хромосомам с учетом статистической неопределенности в зависимости от результата ДНК-скрининга представлены в табл. 8.

Следует отметить, что предиктивные оценки (посттестовые вероятности) зависят от распространенности соответствующей патологии в исследуемой популяции (т.е. от претестовой вероятности). Значения претестовых вероятностей анеуплоидий по анализируемым хромосомам, для которых получены соответствующие предиктивные оценки, приведены в табл. 8. В случае наличия дополнительных клинических данных (таких как УЗИ и биохимические маркеры хромосомной патологии), существенно изменяющих претестовую вероятность наличия анеуплоидий у конкретного пациента, посттестовые вероятности могут быть соответствующим образом скорректированы. Рекомендуется указывать количественную оценку вероятности соответствующей анеуплоидии при формировании лабораторного заключения (см. приложение 3). Необходимо также обращать внимание на концентрацию плодовой ДНК, которая должна быть не ниже порога чувствительности метода (около 4%).

Заключение

ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери обладает значительно более высокими чувствительностью и специфичностью по сравнению с применяемыми в настоящее время стандартными комбинированными скринингами первого и второго триместров беременности. Это позволяет рекомендовать применение ДНК-скрининга большинству беременных женщин. Он может проводиться уже с 10–11 недель беременности, в том числе и у повторно беременных. Благоприятные результаты ДНК-скрининга позволяют с высокой вероятностью исключить анеуплоидии плода по исследуемым хромосомам, в том числе при решении вопроса о пролонгировании беременности на ранних сроках у женщин с угрожающим и привычным выкидышем. При выявлении высокого риска хромосомных нарушений с помощью ДНК-скрининга по крови матери необходимо проведение медико-генетического консультирования и выполнение подтверждающих диагностических инвазивных процедур.

Необходимым этапом исследования является определение доли плодовой ДНК. Если она ниже порога чувствительности метода (около 4%), то результаты ДНК-скрининга могут быть недостоверными.

Применение метода ограничено или невозможно у женщин с избыточной массой тела и ожирением, при многоплодной беременности, при наличии онкологических заболеваний.

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

Внедрение ДНК-скрининга по крови матери как рутинного скрининга беременных может совершить прорыв в оказании помощи беременным женщинам, позволит снизить число проводимых инвазивных процедур, при этом существенно уменьшить частоту рождения детей с тяжелыми инвалидизирующими заболеваниями и перинатальную смертность.

Материально-техническое обеспечение ДНК-скрининга

Оборудование

1. Центрифуга «Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400», SIA «BIOSAN», Республика Латвия или аналоги других производителей.
2. Дозаторы многофункциональные 1-4-8-12 канальные механические (0,1 – 2,5 мкл, 2 – 20 мкл, 10 – 100 мкл, 20 – 200 мкл, 100 – 1000 мкл) Biohit Oy, Финляндия или Eppendorf AG, Германия или аналоги других производителей.
3. Холодильники фармацевтические по ТУ 9452-168-07503307-2004 в следующих исполнениях: ХФ-250 «ПОЗИС», ХФ-250-1 «ПОЗИС», ХФ-400 «ПОЗИС», ХФ-400-1 «ПОЗИС», ФГУП «ПОЗиС», Россия или аналоги других производителей.
4. Морозильник микропроцессорный со звуковой и световой сигнализацией и температурным табло для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов ММ-180/20/35-»ПОЗИС» ФГУП «Производственное объединение «Завод имени Серго», Россия или аналоги других производителей.
5. Центрифуга для микропробирок (модели MiniSpin, MiniSpin plus, MiniSpin plusS PACE, 5418, 5424, Eppendorf AG, Германия) или аналоги других производителей (для постановки необходимо 2 шт: одна располагается в зоне выделения, вторая – в зоне постановки секвенирования).
6. Отсасыватель медицинский ОМ-1 ОАО «Утес», Россия или аналоги других производителей.
7. Вакуумный коллектор для центрифужных колонок QIAvac24 Plus, Qiagen, США или аналоги других производителей.
8. Вакуумный насос ValueVE-225, Millipore, США или аналоги других производителей.
9. Станция по производству ультрачистой воды Simplicity UV Water Purification System, Millipore, США или аналоги других производителей.
10. Термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1 ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналоги других производителей.
11. Амплификатор детектирующий серии ДТ-96, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия.
12. Бокс лабораторный с УФ лампой для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-бокс) БЛ-ПЦР-»ДНК-Техн» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналоги других производителей.
13. Магнитный штатив под микропробирки DynaMag-2 Magnet Life Technologies Thermo Fisher, США или аналоги других производителей.
14. Флуориметр Qubit версии 1, 2 или 3 (Life Technologies Thermo Fisher, США).
15. Анализатор нуклеиновых кислот Bioanalyzer 2100 (Agilent, США).
16. Оборудование для проведения высокопроизводительного секвенирования на основе технологии Ion Torrent:
    - высокопроизводительный секвенатор Ion Proton (Life Techno-logies Thermo Fisher, США);
    - прибор для проведения эмульсионной ПЦР Ion OneTouch2 (Life Technologies Thermo Fisher, США);
    - обогатитель темплированных сфер с ДНК после эмульсионной ПЦР OneTouch ES (Life Technologies Thermo Fisher, США);
    - термостат суховоздушный СПУ ТС-1/20 (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) или аналоги других производителей;
    - двухступенчатый регулятор давления для инертных газов, 8 бар, вход G3/4», выход 1/4» Female BSPT (AirFlow, Италия) или аналоги других производителей;
    - штуцер с наружной резьбой (BSPT- резьба), Stainless Male Connector 6mm OD – 1/4.
17. Оборудование для проведения высокопроизводительного секвенирования на основе технологии Illumina:
    - высокопроизводительный секвенатор HiSeq1500 (или модели, 2500, 3000) или высокопроизводительный секвенатор NextSeq 500 или высокопроизводительный секвенатор MiSeq (все Illumina, США);
    - система автоматической генерации клональных кластеров cBot (Illumina, США).

Реактивы и расходные материалы

1. Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro* (№ ФСЗ 2009/05024, Axygen ScientificInc., США от 10.09.2009, срок действия: не ограничен) на 0,2 (в стрипах и по отдельности), 0,6 или 1,5 мл или аналоги других производителей.
2. Микропробирки LoBind на 1,5 мл для лабораторных исследований *in vitro* (Eppendorf, Германия).
3. Микроробирки для измерений на флуориметре Qubit 2.0 Qubit assay tubes (Life Technologies Thermo Fisher, США) или аналогичные оптически прозрачные микропробирки на 0,6 мл.
4. Комплект реагентов для выделения внеклеточной фракции ДНК из плазмы крови QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit кат. 55114 (Qiagen, США).
5. Перчатки латексные хирургические неопудренные, стерильные и нестерильные VogtMedical (Vogt Medical Vertieb CmbH, Германия) или аналоги других производителей.

ООО "ГЕНОНИКА МЕДИЦИНА"

6. Емкости-контейнеры одноразовые (желтого и красного цвета) по ТУ 9398-002-13026403-2009 следующих исполнений: -ЕК-01-»КМ-Проект» (для сбора острого инструментария класса Б,В); – ЕК-02-»КМ-Проект» (для сбора органических отходов класса Б,В), ООО НВП «КМ-проект», Россия) или аналоги других производителей.
7. Средство дезинфицирующее «Жавель Солид» (№77.99.18.380.Р.000124.04.03 от 09.04.2003 г., срок действия не ограничен, JasolS.A., Франция) или аналоги других производителей.
8. Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем (Axygen ScientificInc., США) или аналоги других производителей.
9. Наконечники универсальные с фильтром пластиковые в штативах для лабораторных дозаторов и роботизированных систем (Eppendorf, Германия) или аналоги других производителей.
10. Натрия хлорид (РУ PN003832/01 от 29.10.2009 г., срок действия не ограничен, ООО «Гематек», Россия) или аналоги других производителей.
11. Этанол 96%, чистота для молекулярно-биологических работ (Sigma Aldrich, США) или аналоги других производителей.
12. 100% изопропанол (Sigma-Aldrich, США) или аналоги других производителей.
13. MQ вода без нуклеаз (Ambion, США) или аналоги других производителей.
14. Магнитные микрочастицы для очистки ДНК AMPure XP beads (Beckman, США).
15. Набор для флуоресцентного определения концентрации ДНК Qubit dsDNA HS Assay Kit кат. Q32854 (Life Technologies Thermo Fisher, США).
16. Набор для проведения флуоресцентного определения количества и качества ДНК High Sensitivity DNA Kit кат. 5067-4626 (Agilent, США).
17. Для проведения высокопроизводительного секвенирования на платформе Ion Proton требуются следующие наборы:
    - набор для приготовления библиотек ДНК для высокопроизводительного секвенирования Ion Xpress Fragment Library Kit P/N 44712652 (Life Technologies Thermo Fisher, США);
    - наборы ДНК-адаптеров для приготовления библиотек ДНК для высокопроизводительного секвенирования Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 Kit кат. 4474517 (Life Technologies Thermo Fisher, США);
    - NaOH, 10M раствор, для молекулярно-биологических работ (Sigma-Aldrich, США) или аналоги других производителей;
    - магнитные частицы для обогащения библиотек ДНК Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Life Technologies Thermo Fisher, США);
    - набор для проведения эмульсионной ПЦР и обогащения ДНК Ion PI Template OT2 200 Kit v3 или Ion PI Hi-Q Template kit (Life Technologies Thermo Fisher, США);
    - набор для проведения высокопроизводительного секвенирования Ion PI Sequencing 200 Kit v3 или Ion PI Hi-Q Sequencing kit (Life Technologies Thermo Fisher, США);
    - набор полупроводниковых чипов Ion PI Chip Kit v2 или Ion PI Chip Kit v3 (Life Technologies Thermo Fisher, США);
    - азот газообразный особой чистоты 5.4 (N2, 99,9994%) в баллонах 40 л объемом газа не менее 4,5 куб.м. (НИИ КМ, Россия).
18. Для проведения высокопроизводительного секвенирования на платформе Ion Proton требуются следующие наборы:
    - набор для приготовления библиотек ДНК для высокопроизводительного секвенирования NEB-Next DNA Library Prep Reagent Kit for Illumina или NEB-Next Ultra DNA Library Prep Reagent Kit for Illumina (New England BioLabs, США) или Ovation Ultralow System V2 1–16 кат. 0344 (Nugen, США);
    - набор ДНК-адаптеров для приготовления библиотек ДНК для высокопроизводительного секвенирования NEBNext Multiplex Oligos for Illumina Index Primers Set1, Set2 (New England BioLabs, США);
    - набор для генерации клональных кластеров на cBot для секвенирования в быстром режиме TruSeq Rapid Duoc Bot или для секвенирования врежиме полной загрузки TruSeq SR Cluster Kit, Bot-HS (Illumina, США);
    - набор для генерации клональных кластеров на HiSeq для секвенирования в быстром режиме TruSeq Rapid SR Cluster Kit – HS (Illumina, США);
    - набор для проведения высокопроизводительного секвенирования в быстром режиме TruSeq Rapid SBS Kit – HS (50 cycle) (Illumina, США) или в режиме полной загрузки TruSeq SBS Kit – HS (200cycle).

Литература

1. *Nagaoka S.I., Hassold T.J., Hunt P.A.* Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. Nat. Rev. Genet. 2012; 13(7): 493-504.
2. *Hook E.G.* Epidemiology of Down syndrome. In: Pueschel S.M.; Rynders J.E., eds. Down syndrome. Advances in biomedicine and the behavioral sciences. Cambridge: Ware Press; 1982: 11.
3. *Pont S.J., Robbins J.M., Bird T.M., Gibson J.B., Cleves M.A., Tilford J.M., Aitken M.E.* Congenital malformations among liveborn infants with trisomies 18 and 13. Am. J. Med. Genet. 2006; 140(16): 1749-56.
4. *Cereda A., Carey J.C.* The trisomy 18 syndrome. Orphanet. J.Rare Dis. 2012; 7: 81.
5. *Кащеева Т.К., Лязина Л.В., Вохмянина Н.В., Кузнецова Т.В., Романенко О.П., Баранов В.С.* Анализ случаев рождения детей с болезнью Дауна в Санкт-Петербурге в 1997-2006 годах. Журнал акушерства и женских болезней. 2007; 56(1): 11-5.
6. *Жученко Л.А., Андреева Е.Н., Воскобоева Е.Ю., Давыдова О.Н., Калашникова Е.А., Кокаровцева С.Н., Лагкуева Ф.К., Одегова Н.О., Серкова Н.А., Степнова С.В., Судакова Е.В., Цветкова Т.Г.* Реализация мероприя-

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

тий Национального проекта «Пренатальная (дородовая) диагностика нарушений развития ребенка» в Московской области. Российский вестник акушера-гинеколога. 2013; 4: 6-12.

7. *Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W., Wainscoat J.S.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997; 350(9076): 485-7.
8. *Fauzdar A.* Non-invasive prenatal testing (NIPT): a better option for patients. Mol. Cytogenet. 2014; 7(Suppl. 1): I17.
9. *Alberry M., Maddocks D., Jones M., Abdel Hadi M., Abdel-Fattah S., Avent N., Soothill P.W.* Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. Prenat. Diagn. 2007; 27(5): 415-8.
10. *Gregg A.R., Gross S.J., Best R.G., Monaghan K.G., Bajaj K., Skotko B.G.* et al. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. Genet. Med. 2013; 15(5): 395-8.
11. *Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R.* Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105(42): 16266-71.
12. *Ong F.S., Lin J.C., Das K., Grosu D.S., Fan J.B.* Translational utility of next-generation sequencing. Genomics. 2013; 102(3): 137-9.
13. *Norton M.E., Brar H., Weiss J., Karimi A., Laurent L.C., Caughey A.B.* et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. Am. J. Obstet. Gynecol. 2012; 137: e1-137. e8.
14. *Dar P., Curnow K.J., Gross S.J., Hall M.P., Stosic M., Demko Z.* et al. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphismebased noninvasive prenatal aneuploidy testing. Am. J. Obstet. Gynecol. 2014; 527: e1-527. e17.
15. *Bhatt S., Parsa S., Snyder H., Taneja P., Halks-Miller M., Seltzer W., DeFeo E.* Clinical laboratory experience with noninvasive prenatal testing: update on clinically relevant metrics. ISPD 2014 poster.
16. *Palomaki G.E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M., Ehrich M.* et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. Genet. Med. 2011; 13(11): 913-20.
17. *Palomaki G.E., Deciu C., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M.* et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as down syndrome: an international collaborative study. Genet. Med. 2012; 14(3): 296-305.
18. *Nicolaides K.H., Musci T.J., Struble C.A., Syngelaki A., Gil M.M.* Assessment of fetal sex chromosome aneuploidy using directed cell-free DNA analysis. Fetal Diag. Ther. 2014; 35(1): 1-6.
19. *Porreco R.P., Garite T.J., Maurel K., Marusiak B., Ehrich M., van den Boom D., Deciu C., Bombard A.* Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. Am. J. Obstet. Gynecol. 2014; 211(4): 365. e1-12.
20. *Jiang F., Ren J., Chen F., Zhou Y., Xie J., Dan S.* et al. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. BMC Med. Genomics. 2012; 5: 57.
21. *Сухих Г.Т., Каретникова Н.А., Баранова Е.Е., Шубина Е.С., Коростин Д.О., Екимов А.Н., Парсаданян Н.Г., Гус А.И., Бахарев В.А., Трофимов Д.Ю., Воеводин С.М., Тетруашвили Н.К.* Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) в группе женщин высокого риска. Акушерство и гинекология. 2015; 4: 5-10.
22. *Agarwal A., Sayres L.C., Cho M.K., Cook-Deegan R., Chandrasekharan S.* Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. Prenat. Diagn. 2013; 33(6): 521-31.
23. *Neyt M., Hulstaert F., Gyselaers W.* Introducing the noninvasive prenatal test for trisomy 21 in Belgium: a cost-consequences analysis. BMJ Open. 2014; 4(11): e005922.
24. *Benn P., Cuckle H., Pergament E.* Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. Ultrasound Obstet. Gynecol. 2013; 42(1): 15-33.
25. *Norton M.E., Jacobsson B., Swamy G.K., Laurent L.C., Ranzini A.C., Brar H.* et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. N. Engl. J. Med. 2015; 372(17): 1589-97.
26. *Wataganara T., Peter I., Messerlian G.M., Borgatta L., Bianchi D.W.* Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels. Obstet. Gynecol. 2004; 104(3): 545-50.
27. *Lim J.H., Kim M.H., Han Y.J., Lee da E., Park S.Y., Han J.Y., Kim M.Y., Ryu H.M.* Cell-free fetal DNA and cell-free total DNA levels in spontaneous abortion with fetal chromosomal aneuploidy. PLoS One. 2013; 8(2): e56787.
28. *Nicolaides K.H., Syngelaki A., Gil M., Atanasova V., Markova D.* Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. Prenat. Diagn. 2013; 33: 575-9.
29. *Pergament E., Cuckle H., Zimmermann B., Banjevic M., Sigurjonsson S., Ryan A.* et al. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. Obstet. Gynecol. 2014; 124: 210-8.
30. *Schlütter J.M., Hatt L., Bach C., Kirkegaard I., Kølvraa S., Uldbjerg N.* The cell-free fetal DNA fraction in maternal blood decreases after physical activity. Prenat Diagn. 2014. 34(4): p.341-4.
31. *Ребриков Д.В.,* ред. NGS: высокопроизводительное секвенирование. М.: БИНОМ; 2014.
32. *Chiu R.W., Chan K.C., Gao Y., Lau V.Y., Zheng W., Leung T.Y.* et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105(51): 20458-63.
33. *Nikolac N.* Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. Biochem. Med. (Zagreb). 2014; 24(1): 57-67.
34. *Bianchi D.W., Chudova D., Sehnert A.J., Bhatt S., Murray K., Prosen T.L.* et al. Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. JAMA. 2015; 314(2): 62-9.
35. *Grati F.R., Malvestiti F., Ferreira J.C.P.B., Bajaj K., Gaetani E., Agrati C.* et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. Genet Med 2014; 16(8): 620-4.
36. *Pan Q., Sun B., Huang X., Jing X., Liu H., Jiang F.* et al. A prenatal case with discrepant findings between non-invasive

ООО "ЕВОНИКА-МЕДИА"

prenatal testing and fetal genetic testings. Mol Cytogenet 2014; 7: 48.

37. *Wang J.C., Sahoo T., Schonberg S., Kopita K.A., Ross L., Patek K., Strom C.M.* Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases. Genet. Med. 2015; 17(3): 234-6.
38. *Wang Y., Chen Y., Tian F., Zhang J., Song Z., Wu Y.* et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. Clin. Chem. 2014; 60(1): 251-9.
39. *Егорова М.О.* Венепункция и пробоподготовка крови. М.: Практическая медицина; 2014. 32с.
40. Proposed International Guidelines on Ethical issues in Medical Genetics and Genetic Services. Report of WHO Meeting on Ethical Issues in Medical Genetics. Geneva, 15-16 December 1997. World Health Organization, Human Genetics Programme; 1997. 15 p.
41. *Ижевская В.Л.* Старые заботы и новые этические проблемы в пренатальной диагностике. Медицинская генетика. 2015; 4: 67.

ООО "БИОНИКА МЕДИА"

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

ОБРАЗЕЦ ИНФОРМИРОВАННОГО СОГЛАСИЯ

ПОЛНОЕ НАИМЕНОВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ
НАЗВАНИЕ СТРУКТУРНОГО ПОДРАЗДЕЛЕНИЯ
Информированное согласие на исследование
«Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий по крови матери»

Я, _____,
дата рождения (день, месяц, год) _____,
паспорт (серия, номер) _____, кем выдан _____
_____ когда выдан «____» _____г.,
проживающая по адресу _____,
контактный телефон _____,
срок беременности _____, мой вес_____кг, мой рост __

Я проинформирована о назначении, возможностях и ограничениях неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий у плода по крови матери, в том числе:

- ДНК-скрининг по крови матери предназначен для выявления женщин с высоким риском наличия анеуплоидий у плода и не заменяет диагностические инвазивные тесты.
- В случае выявления хромосомных нарушений с помощью ДНК-скрининга по крови матери необходимо проведение подтверждающих диагностических инвазивных процедур. При этом важно учитывать, что прерывание беременности по медицинским показаниям (хромосомная патология плода) разрешено до 22 недель беременности (Приказ Минздрава России от 12 ноября 2012г. № 572н).
- Пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий по крови матери не предназначен для выявления микроаномалий хромосом, мозаицизма, полиплоидии, структурных аномалий хромосом, моногенных и других генетических заболеваний, не связанных с анеуплоидиями.
- При наличии в семье ранее выявленных наследственных патологий может потребоваться назначение иных видов скрининговых тестов или проведение пренатальной диагностики с целью исключения конкретных заболеваний. В этом случае необходимо проконсультироваться с врачом-генетиком.
- Отсутствие у плода нарушений по данным неинвазивного пренатального ДНК-скрининга по крови матери не гарантирует отсутствие анеуплоидий как по исследованным, так и по другим хромосомам.
- Точность выявления разных анеуплоидий отличается (для 21-й и 18-й хромосом выше, чем для 13-й и половых хромосом).
- При низкой доле внеклеточной плодовой ДНК в крови матери получение результатов может оказаться невозможным. В этом случае необходима консультация врача, в том числе для решения вопроса о проведении повторного исследования или инвазивной диагностики.
- Сдача крови осуществляется ***натощак*** в сроки беременности с 10–11 до 17 акушерских недель; проведение исследования на более поздних сроках допускается только на основании коллегиального решения врача акушера-гинеколога, врача-генетика, врача лабораторного генетика.
- Перед сдачей крови необходимо избегать повышенной физической активности, т.к. она может приводить к снижению доли внеклеточной плодовой ДНК.
- Информация о поле плода может быть указана по моему желанию только на сроках беременности более 12 недель, с целью предотвращения селекции по полу.
- Полученная в ходе исследования информация может быть в обезличенном виде использована медицинским учреждением для научных исследований в порядке, регламентированном ФЗ от 27.07.2006г. N152-ФЗ «О персональных данных».

Я понимаю всю информацию, содержащуюся в данном документе. Я имела возможность задать все интересующие меня вопросы и получила удовлетворившие меня ответы. Ознакомившись с вышеуказанной информацией, на проведение неинвазивного ДНК-скрининга по крови матери согласна.

Пациент (Ф.И.О.) _____ Подпись _____
Подтверждаю, что пациент ознакомился с представленной информацией и расписался в моем присутствии.

Медицинский работник (Ф.И.О.) _____ Подпись_____

Дата «____» _____ 20____г.

ООО "ПЕРИНАТАЛ МЕДИА"