



В.В. Авруцкая, Н.В. Кривенцова, Р.А. Шокарев, В.С. Гимбут, С.Ю. Кригер

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ПЦР

*Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии
Россия, 344012, Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43. E-mail: V.Avrutskaya@rniiap.ru*

Цель: разработка метода пренатальной инвазивной диагностики и сравнение его возможностей со стандартной цитогенетической методикой.

Материалы и методы: проведена внутриутробная пренатальная инвазивная диагностика 366 беременных. В зависимости от срока беременности и способа обработки материала проводилась биопсия ворсин хориона, кордоцентез и амниоцентез.

Результаты: полученный материал был обработан с помощью КФ-ПЦР и параллельным проведением стандартного кариотипирования. Во всех случаях расхождений результатов двух методик отмечено не было.

Выводы: Методика количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР) имеет неоспоримые преимущества перед стандартной цитогенетической методикой и позволяет уменьшить длительность выполнения анализа и увеличить количество обследуемых пациентов.

Ключевые слова: пренатальная диагностика, хромосомная патология, инвазивные методы, количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция (КФ-ПЦР).

V.V. Avrutskaja, N.V. Kriventsova, R.A. Shokarev, V.S. Gimbut, S.Y. Kriger

PRENATAL INVASIVE DIAGNOSIS WITH QUANTITATIVE FLUORESCENT PCR

*Rostov Scientific Research Institute of Obstetrics and Pediatrics
43 Mechnikova st., Rostov-on-Don, 344012, Russia. E-mail: V.Avrutskaya@rniiap.ru*

Purpose: To develop the method of prenatal invasive diagnosis and compare it abilities with traditional genetic cytological examination.

Materials and Methods: There was conducted prenatal fetal invasive diagnosis of 366 pregnant women. Depending on the pregnancy age and genetic indications the chorionic villus sampling, cordocentesis and amniocentesis were carried.

Results: The obtained samples was treated with QF-PCR and it results was verified by standard karyotyping. In all cases, the differences of the two methods was not observed.

Summary: It was shown the technique of quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) has advantages over the standard cytologic examination and reduces analysis duration and increases the number of patients.

Keywords: prenatal diagnosis, chromosome diseases, quantitative polymerase-chain reaction.

Введение

Достижения современной медицины привели к значительному снижению заболеваемости и смертности населения, особенно детского возраста, от болезней, обусловленных внешне-средовыми факторами, и вывели на первые позиции врожденную и наследственную патологию, что вполне обоснованно, несмотря на относительную стабильность данной патологии в популяции [1].

Одна из главных задач состоит в разработке и совершенствовании методов контроля, диагностики и профилактики врожденной патологии, реализуя право каждого ребенка не только родиться, но и родиться здоровым. По

данным ВОЗ ежегодно в странах мира рождается до 6% (9 млн) детей с пороками развития, и в половине случаев это летальные и тяжелые пороки, требующие хирургической коррекции. До 80% тяжелых пороков развития заканчиваются смертью ребенка в младенческом возрасте.

Решающая роль в комплексе мероприятий по профилактике и предупреждению наследственных и врожденных болезней принадлежит пренатальной диагностике, позволяющей предотвратить рождение детей с тяжелыми некорректируемыми пороками развития, с социально значимыми генами и хромосомными болезнями и, тем самым, уменьшить груз популяции [2].

Пренатальная диагностика представляет собой комплекс врачебных мероприятий и диагностических ме-



тодов, направленных на выявление морфологических, структурных, функциональных или молекулярных нарушений внутриутробного развития человека.

В настоящее время в России пренатальная диагностика хромосомных нарушений включает в себя два этапа. Проводимые мероприятия регламентируются приказами МЗ РФ №457 от 28.12.2000 г. «О совершенствовании пренатальной диагностики в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей» и №808н от 2.10.2010 г. «Об утверждении порядка оказания акушерско-гинекологической помощи». На первом этапе проводятся скрининговые исследования с помощью биохимических и ультразвуковых маркеров, которые позволяют сформировать группу риска по рождению больного ребенка.

Второй этап заключается в проведении инвазивной процедуры у женщин из группы риска, которая направлена на выяснение кариотипа ребенка для точной постановки диагноза. Кариотипирование является «золотым стандартом» выявления хромосомных нарушений во всем мире. Клетки плода для картирования хромосом получают путем пункции хориона или кордоцентеза (забора крови плода из пуповины). Обе эти процедуры повышают риск прерывания беременности на 1–2 %.

В поликлиническом отделении Ростовского института акушерства и педиатрии совместно с генетической лабораторией проводятся инвазивные процедуры.

Синдромы Дауна, Эдвардса и Патау являются самыми частыми хромосомными патологиями среди новорожденных. Только в Ростовской области ежегодно рождается около 45 детей с трисомией по 21 хромосоме, от 3 до 6 детей с трисомиями по 13 и 18 хромосомам.

В последнее время в практике многих зарубежных лабораторий для диагностики наиболее частых трисомий применяется метод количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР), который основан на обнаружении тройной дозы специфичных для каждой хромосомы высокополиморфных STR маркеров и, следовательно, позволяет выявить третью «лишнюю» хромосому.

Клиническое применение КФ-ПЦР многократно подтверждено высокой чувствительностью, специфичностью, позволяет получить 97% результатов в течение 24 часов и снизить риск прерывания беременности до 0,5%, так как для получения ДНК плода возможно использование амниоцитов.

В нашем исследовании мы изучили целесообразность применения КФ-ПЦР для пренатальной диагностики наиболее частых трисомий у пациенток Ростова и Ростовской области.

Материалы и методы

С 2006 по 2009 год нами проведено обследование 366 беременных. В отборе пациентов мы придерживались стандартных показаний для направления на инвазивную пренатальную диагностику, одобренных ВОЗ, а именно:

1. Возраст беременной 35 лет и старше.
2. Наличие ребенка с хромосомной болезнью.
3. Наличие у кого-либо из супругов или их родственников хромосомных перестроек.
4. Наличие в семье больного с наследственной моногенной болезнью.
5. Наличие в предыдущей беременности плода с множественными пороками развития.
6. Наличие ультразвуковых маркеров хромосомных болезней.

Пациентки были обследованы с помощью трех различных инвазивных методик. С 9–14 недель использовали метод биопсии ворсин хориона, с 20–26 недели – кордоцентез. А начиная с 2009 года, с 16–34 недели – амниоцентез с последующей обработкой материала методом КФ-ПЦР.

Все пациентки подписывали информированное согласие на проведение инвазивной диагностики, которая проводилась в специальном боксированном помещении с соблюдением методов асептики и антисептики. Проведение манипуляции осуществлялось трансабдоминальным доступом, под контролем ультразвукового аппарата Acuson Sequoia 512. Биопсия ворсин хориона проводилась с помощью аспирационного шприца иглой 18G, в количестве 5 мг. При кордоцентезе иглой 21G пунктировалась вена пуповины и осуществлялся забор 1–2 мл крови плода. При амниоцентезе иглой 22G проводился забор 7 мл амниотической жидкости. Ворсины хориона и плодовая кровь обрабатывались стандартным цитологическим методом. Начиная с 2009 года, при обработке амниоцитов, ворсин хориона и плаценты выделялась ДНК плода с последующей оценкой с помощью методики КФ-ПЦР. Для постановки мультиплексной ПЦР для идентификации синдрома Дауна нами были выбраны четыре высокополиморфных маркера (*D21S1435*, *D21S1411*, *D21S11* и *IFNAR*), расположенные на длинном плече 21 хромосомы и фланкирующие критический регион для синдрома Дауна (21q22.1–21q22.3). Данный набор маркеров также позволяет обнаружить и транслокационные варианты синдрома Дауна. Для постановки второй мультиплексной ПЦР для идентификации трисомий по 13 и 18 хромосомам также были выбраны по 4 STR маркера на каждую хромосому.

Если маркеры в мультиплексных ПЦР были неинформативны, нами использовались дополнительные STR маркеры.

Выделение ДНК проводили из 3–7 мл амниотической жидкости или 12 мг ворсин хориона с помощью набора D1Atom DNA Prep100.

Один из праймеров в каждой паре был маркирован флуоресцентной меткой FAM, R6G или TAMRA. Для постановки мультиплексной ПЦР использовали PCR Master Mix, праймеры вносили в концентрации 2–22 пМ на реакцию. Геномную ДНК вносили в конечной концентрации 2 нг/мкл.

Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводили с помощью капиллярного ДНК-анализатора ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). В качестве внутреннего размерного стандарта использовали ROX-500 (Applied Biosystems). Фрагментный анализ осуществляли с помощью программы «GeneMapper» v3.7.

Результаты

За период с 2006 по 2009 год проведено 150 биопсий ворсин хориона, обработка материала проведена цитогенетическим методом. Выявлено 4 случая синдрома Дауна, 1 – синдрома Эдвардса, 2 – синдрома Тернера, 1 – триплоидии, 2 случая транслокации (45XY t 13/14 и 46XX t (7/11)). Во всех случаях выявления синдрома Дауна у плодов причиной направления послужило увеличенное воротниковое пространство (ТВП) от 3 до 4,5 мм. Возраст пациенток в 2 случаях был старше 35 лет (39 и 40). В случаях выявления синдрома Тернера и триплоидии у всех



пациенток при ультразвуковом исследовании отмечалось увеличение ТВП более 5 мм (5–7,5 мм). При синдроме Эдвардса воротниковое пространство было в пределах нормативных значений, но выявлен мегацистис. В обоих случаях обнаружения транслокации у плодов, они имели место у беременных, имеющих в своем кариотипе транслокационные перестройки.

За тот же период проведено 174 кордоцентеза. Выявлено 6 случаев синдрома Дауна, один из которых транслокационный, 7 – синдрома Эдвардса, 2 – синдрома триплоидии, 2 – хромосомных аномалий (45XU inv9). Из 6 случаев синдрома Дауна причиной обращения у одной пациентки (32 года) послужили ультразвуковые маркеры, обнаруженные в I триместре беременности (ТВП 4,2); у двух пациенток (24 и 26 лет) – ультразвуковые маркеры II триместра (атрезия 12-перстной кишки и индекс длины бедра менее 0,9 соответственно); у двух пациенток (35 и 39 лет) – изменения биохимических маркеров 16 недель беременности; и в случае транслокационного синдрома Дауна у самой пациентки выявлен кариотип 45,XX t14/21. Все случаи синдрома Эдвардса выявлены у пациенток, имеющих ультразвуковые маркеры II триместра – замедление внутриутробного роста плода (ЗВРП) (100% случаев), единственная артерия пуповины (28,6% случаев), диафрагмальная грыжа (28,6%), омфалоцеле (14,3%), дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП) (14,3%). В 2 случаях выявления хромосомных аномалий у плодов пациенток, 22 и 31 год соответственно, показаниями послужили ЗРП и вентрикуломегалия (100% случаев). Все случаи триплоидии сопровождались множественными пороками развития.

В 2009 году нами проведено 4 биопсии ворсин хориона и 38 амниоцентезов, полученный материал которых был обработан с помощью КФ-ПЦР. Во всех случаях параллельно с КФ-ПЦР для верификации диагноза было проведено стандартное кариотипирование. При биопсии ворсин хориона во всех случаях не выявлено патологии. При выполнении методики амниоцентеза выявлены

синдромы Эдвардса и Патау. В первом случае причиной проведения амниоцентеза было наличие ультразвуковых маркеров хромосомных болезней в 22 недели: ЗВРП, «симптом лимонной корки», «клубникообразная форма» головки, ДМЖП, возраст пациентки 43 года, во втором случае – наличие УЗИ маркеров I триместра: ТВП – 5,2 мм, возраст 27 лет.

Заключение

Пренатальная диагностика является одним из перспективных направлений в диагностике тяжелых инвалидизирующих заболеваний. Новая методика КФ-ПЦР имеет ряд преимуществ, которые в дальнейшем позволят увеличить количество обследуемых пациентов:

1. Для анализа требуется только небольшой объем ворсин хориона или амниотических вод (не больше 7 мл).
2. Проведение анализа возможно с 9 по 28 неделю беременности.
3. 100% точность для обнаружения основных аутосомных трисомий (синдром Дауна, Эдвардса и Патау).
4. Специфичность определения наличия остальных хромосомных заболеваний у плода составляет 99,8%.
5. При необходимости, возможно провести определение пола ребенка, резус-фактора и тестирование на наличие мутаций ряда наследственных заболеваний (муковисцидоза, нейросенсорной тугоухости, спинальной амиотрофии и др.).
6. Анализ может быть выполнен в течении 48 часов с момента поступления образца амниотической жидкости в лабораторию.

На основании полученных результатов представляется целесообразным и экономически оправданным широкое внедрение КФ-ПЦР для диагностики хромосомных болезней у плода с самых ранних сроков беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.С., Вахарловский В.Г. Наследственные болезни и дородовая диагностика. - С-Пб.: Знание., 2003. – 48 с.
2. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / Под ред. Айламазяна Э.К., Баранова В.С. – М.: МЕДпресс-информ., 2006. – 384 с.

ПОСТУПИЛА: 25.11.2010