

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д.Л. Пиневиц

28 ноября 2012 г.

Регистрационный № 134-1012



**Метод пренатальной диагностики различных типов врожденных  
X-сцепленных дефектов иммунной системы и анемии Фанкони  
инструкция по применению**

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический  
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,

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

**АВТОРЫ:**

Шарапова С.О., Мигас А.А., Гурьянова И.Е., Романцова А.А.,  
к.б.н. Белевцев М.В., д.м.н., проф., член-корр. Алейникова О.В.,  
Шепелевич Е.В., к.б.н. Головатая Е.И.

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
28.11.2012  
Регистрационный № 134-1012

**МЕТОД ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ  
ВРОЖДЕННЫХ Х-СЦЕПЛЕННЫХ ДЕФЕКТОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ  
И АНЕМИИ ФАНКОНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр “Мать и дитя”»

АВТОРЫ: С.О. Шарапова, А.А. Мигас, И.Е. Гурьянова, А.А. Романцова, канд. биол. наук М.В. Белевцев, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси О.В. Алейникова, Е.В. Шепелевич, канд. биол. наук Е.И. Головатая

Минск 2012

Первичные иммунодефициты (ПИД) — группа заболеваний, в основе которых лежат врожденные, генетически детерминированные нарушения функций иммунной системы. Главным проявлением ПИД является повышенная чувствительность к инфекциям. Тем не менее, и онкологические проявления и аутоиммунные болезни среди таких пациентов встречаются гораздо чаще, чем в общей популяции. На сегодняшний день описано 257 первичных иммунодефицитов, за которые отвечает 237 генов [*an update on the classification PID, 2011*]. Большинство первичных иммунодефицитов имеет аутосомно-рецессивный тип наследования (80,5%), 12% аутосомно-доминантный и 5% X-сцепленный.

Апластическая анемия (АА) — это нарушение полноценного функционирования костного мозга, которое характеризуется панцитопенией в периферической крови. Согласно иерархической модели гемопоэза опустошенный костный мозг при АА — результат нарушения в функционировании гематопозитической стволовой клетки (ГСК). Анемия Фанкони (АФ) — наиболее часто встречающийся наследственный синдром недостаточности костного мозга.

Применение настоящей инструкции позволит прогнозировать и предупреждать рождение больных сибсов в семьях с X-сцепленными первичными иммунодефицитами и анемией Фанкони.

**Медико-социальная значимость** пренатальной диагностики в семьях с X-сцепленными первичными иммунодефицитами и анемией Фанкони — это прогнозирование и предупреждение рождения больных сибсов, повышение эффективности терапии (аллогенной ТГСК) при рождении, до наступления перманентных повреждений органов и тканей, вследствие перенесенных инфекций у пациентов с ПИД и АФ, что в целом снизит смертность пациентов и приведет к улучшению общих показателей выживаемости.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **Оборудование:**

Центрифуга.

Центрифуга с охлаждением на 14000 об./мин.

ПЦР-боксы.

Вакуумный аспиратор.

Вортекс.

Спектрофотометр.

Термомиксер.

Термоциклер.

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Аппарат для вертикального электрофореза в полиакриламидном геле.

Документирующая система.

Микроскоп.

Проточный цитофлуориметр.

Секвенатор.

Морозильник -20°C.

Морозильник -70°C.

Дозаторы.

**Расходные материалы:**

Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами объемом от 0,1 до 1000 мкл.

Центрифужные пробирки (объем 15 мл).

Пробирки для проведения ПЦР (объем 0,2 мл).

Пробирки для проточного цитофлуориметра (объем 5 мл).

Пастеровские пипетки.

Камера Горяева.

**Реагенты:**

Реагент для создания градиента плотности (1,077 г/см<sup>3</sup>).

TRI-reagent.

Тaq-полимераза.

β-меркаптоэтанол.

Агароза.

Вода деионизованная.

Изопропанол.

Ингибитор РНКаз.

Маркер молекулярного веса.

Обратная транскриптаза.

Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ).

Набор праймеров.

Рэндом-гексамеры.

Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).

Хлороформ.

Этанол 70%.

Этанол 96%.

Фосфатно-солевой буфер (рН = 7,2–7,4).

Раствор, лизирующий эритроциты.

Раствор, фиксирующий лимфоциты.

Моноклональные антитела.

Раствор для внутриклеточного и внутриядерного определения белков в лимфоцитах.

Дигидрорадамин.

Параформальдегид.

Среда для культивирования (НАМ, Amniomax, Chang).

Эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС).

Ультросер.

Антибиотик.

Раствор Хэнкса.

Колхицин.

Цитрат натрия.

Хлорид калия.

Коллагеназа.

Этанол (или метанол).

Уксусная кислота.

Трипсин (0,25%).

Версен.

Краска Giemsa.

Растворы: 10% среда НАМ: 10 мл ЭТС, 2 мл ультросер, 1 мл антибиотик, 87 мл среды НАМ, 100% фиксатор: 10 мл уксусной кислоты, 30 мл этанола (96°).

Гипотонические растворы:

1% цитрат натрия: 1 г цитрата натрия на 100 мл дистиллированной воды.

Сывороточная гипотония: 10 мл сыворотки на 100 мл дистиллированной воды.

0,55% раствор КСИ: 55 мг КСИ на 100 мл дистиллированной воды.

60% уксусная кислота: 60 мл уксусной кислоты, 40 мл дистиллированной воды.

Фосфатный буфер: 23,880 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  растворить в 1 л дистиллированной воды; 9,078 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворить в 1 л дистиллированной воды. Смешать в соотношении 1:1, pH 6,8.

Рабочий раствор краски Giemsa: 5 мл краски на 95 мл фосфатного буфера (5% раствор). Можно использовать 10% раствор краски Giemsa на фосфатном буфере.

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показанием для проведения пренатальной диагностики X-сцепленных первичных иммунодефицитов является подтверждение носительства мутантного гена у матери, т. е. исключение мутации *de novo* у пробанда, и 100% вероятность рождения мальчика при X-сцепленных первичных иммунодефицитах. При анемии Фанкони — подтверждение наличия мутантных аллелей у родителей при консультировании детей обоего пола.

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Тяжелая экстрагенитальная патология в стадии декомпенсации.
2. Тяжелые гемостазиопатические заболевания, характеризующиеся повышенной кровоточивостью (в т. ч. наследственные).
3. Гнойно-септические заболевания.

*Факторы, которые могут ограничивать применение амниоцентеза и биопсии ворсин хориона:*

1. Воспалительные заболевания с повышением температуры тела.
2. Угроза прерывания беременности с кровянистыми выделениями.
3. Предшествовавшие лапаротомия и операции на матке.
4. Наличие множественных фиброматозных узлов на матке.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Пренатальная диагностика в группе X-сцепленных первичных иммунодефицитов проводится только в случае риска рождения мальчика и подтверждения носительства мутантного гена у матери, т. е. исключение мутации *de novo* у пробанда, и 100% вероятность рождения мальчика. При анемии Фанкони — подтверждение наличия мутантных аллелей у родителей при консультировании детей обоего пола. Проведение пренатальной диагностики возможно только в семьях с точно установленным диагнозом, т. е. с обнаруженной мутацией.

Из 13 генов, локализованных на X-хромосоме и отвечающих за первичные иммунодефициты, два описаны у единичных пациентов (*MAGT1, TAZ*), 4 гена (*XIAP, DKC1, IKBKG, PFC*) — частота встречаемости менее чем 1 на 1000.000

новорожденных мальчиков, остальные 7 (*BTK* — X-сцепленная агаммаглобулинемия, *CYBB* — X-сцепленная хроническая гранулематозная болезнь, *WAS* — синдром Вискотт-Олдрич, *IL2RG* — X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, *FoxP3* — иммунодисрегуляция, полиэндокринопатия, энтеропатия, сцепленная с X-хромосомой, *SH2D1A* — X-сцепленный лимфопролиферативный синдром, *CD40L* — X-сцепленный гипер-IgM-синдром) довольно часто встречаются в национальных регистрах пациентов с ПИД.

Около 85% всех описанных в IFAR (International Fanconi Anemia Registry) пациентов с известной комплементарной группой имели дефект в 1 из 3 генов *FANCA*, *FANCC*, *FANCG*.

В данной инструкции предложен метод пренатальной диагностики 7 X-сцепленных первичных иммунодефицитов (*BTK*, *CYBB*, *WAS*, *IL2RG*, *FoxP3*, *SH2D1A*, *CD40L*) и 3 видов анемии Фанкони (*FANCA*, *FANCC*, *FANCG*).

### **Иммунологическая диагностика различных типов X-сцепленных первичных иммунодефицитов**

*1.1. Функциональный тест для определения кислородообразующей функции NADPH+ оксидазы нейтрофилов — диагностика X-сцепленной хронической гранулематозной болезни*

При подготовке пробы у пациентов мужского пола дополнительно проводился забор крови матери. Кровь пациента и матери забиралась в пробирку, содержащую антикоагулянт гепарин. Для проведения исследования требуется два образца: один является негативным контролем, другой с индуцированной активацией с применением РМА. При подготовке пробы пипетируется по 100 мкл цельной крови с антикоагулянтом (гепарин) и проводится инкубация на холоде при 0°C. За инкубационный период проводится подготовка реагентов, которые необходимо готовить непосредственно перед применением. РМА готовится разведением концентрированного раствора, взятого в объеме 1,5 мкл в 60 мкл PBS (фосфатного буферного раствора). Данное разведение используется в расчете на одного пациента. За этот же период времени производится размораживание детектирующего реагента (DCF — дихлорфлуорисцеин диацетат или DHR 123-дигидрородамин 123). После инкубации вносятся в одну пробирку 20 мкл буферного раствора как негативного контроля для детекции спонтанной активации нейтрофилов, в другую — 20 мкл РМА как активатора индуцированной реакции. Инкубация пробы на водяной бане 10 мин при 37°C. После инкубации в пробу вносится детектирующий реагент в объеме 10 мкл с последующей инкубацией на водяной бане при тех же условиях. После завершения инкубации производится лизирование пробы на протяжении 7 мин с последующим двукратным отмыванием при 1500 об./мин 3 мин и температурой в центрифуге порядка 4°C при каждом цикле. Полученные образцы готовы для записи и анализа на проточном цитофлуориметре в течение 10–15 мин.

*1.2. Функциональный тест для определения активации T лимфоцитов для исследования экспрессии CD40L методом проточной цитометрии — диагностика X-сцепленного гипер-IgM-синдрома*

Периферическую кровь разводили средой RPMI-1640 с добавлением смеси антибиотиков (в дальнейшем — RPMI-A) в соотношении 1:1 или 2:1. Наслаивали 6–8 мл клеточной суспензии разведенной ПК на поверхность 4 мл Histopaque. Центрифугировали 20 мин при 1800 об./мин при комнатной температуре. Далее с

поверхности Histopaque собирали слой мононуклеарных клеток и переносили в пробирку, содержащую RPMI-A с добавлением минимум 1% эмбриональной сыворотки телят (ЭТС). Центрифугировали 10 мин при 1200 об./мин при комнатной температуре. Осажденные клетки ресуспендировали средой RPMI-A+1% ЭТС и осаждали 10 мин при 1200 об./мин. К осажденным клеткам добавляли культуральную среду и проводили подсчет выделенных мононуклеарных клеток в камере Горяева.

После выделения мононуклеарные клетки помещали в питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 2 mM L-глутамина и антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) и культивировали при 37°C во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч. Для активации клеток добавляли ФГА 2 мкг/мл.

На 1, 2, 3-й день исследовали активацию Т-лимфоцитов. Добавляли соответствующее количество моноклональных антител в каждую пробирку: контроль — 1 мкл, CD40L — 10 (5) мкл. Инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. Отмывали дважды. Ресуспендировали в 500 мкл окрашивающего буфера перед записью на проточном цитофлуориметре.

### *1.3. Определение экспрессии Vtk методом проточной цитометрии — диагностика X-сцепленной агаммаглобулинемии*

Приготовить мононуклеары периферической крови пациента и здорового донора. Подогреть буфер для фиксации клеток на водяной бане 37°C в течение 5–10 мин перед использованием. (Оптимально) Культивируем клетки в RPMI с 5% человеческой сывороткой при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 2 ч. Стимулируем клетки соответствующим стимулятором. В случае ВТК перекисью водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 15 мин 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 182 раза больше концентрация) 5,5 мкл в 1 мл с клетками. Клетки фиксируем сразу же для поддержания фосфорилированного состояния. Непосредственно перед откручиванием клеток рекомендовано зафиксировать клетки путем добавления равного объема подогретого раствора для фиксации в клеточную суспензию. Перемешиваем путем переворачивания пробирок или кратковременным вортексированием. Инкубируем клетки при 37°C в течение 10–15 мин. Осаждаем клетки центрифугированием (300g) 5–10 мин, сливаем супернатант. Пермеабелизируем клетки путем добавления раствора для «дырок» (1–10×10<sup>6</sup> кл/мл, минимум 1 мл), инкубируем 10 мин при комнатной температуре. Отмываем клетки дважды. Центрифугируем клетки (300g) 5–10 мин, сливаем супернатант. Ресуспендируем клетки в растворе для отмывания клеток 10 млн/мл. Добавляем соответствующее количество моноклональных антител в каждую пробирку: контроль — 1 мкл, ВТК — 10 (3,5) мкл. Инкубируем при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. Отмываем дважды. Ресуспендируем в 500 мкл окрашивающего буфера перед записью на проточном цитофлуориметре.

### *1.4. Определение экспрессии WASP методом проточной цитометрии*

Приготовить клеточную суспензию и определить количество клеток. Суспензировать клетки в окрашивающем буфере (PBS + 2% FBS + 0,1% Sodium Azide) 2×10<sup>7</sup> Кл/мл и перенести в полистириновую пробирку (50 мкл суспензии клеток в 100 мкл буфера). Блокируем Fcγ рецепторов путем добавления 0,2 мкг очищенных 2,4G2 антител в 50 мкл окрашивающего буфера для каждой лунки. (0,4 мкл в 50 мкл в 1 пробирку). Инкубируем 5 мин на льду. Добавить 200 мкл

окрашивающего буфера в каждую лунку и ресуспензировать клетки. Центрифугировать 5 мин при 250×g, отобрать супернатант (1200 об./5 мин на большой центрифуге). Ресуспензируем клетки в 100 мкл раствора для фиксации клеток. Инкубируем 30 мин при комнатной температуре. Отмываем 2 раза в 200 мкл 1-кратного раствора для пермеабилзации. Центрифугируем при 250g в течение 5 мин. Сливаем супернатант. Окрашиваем внутриклеточные маркеры: первичные мАТ, контроль — 1 мкл; WASP — 15 мкл; Инкубируем 20 мин на льду. Отмываем в 200 мкл раствора — 1500 об./5 мин. Вносим вторичные антитела, по 0,5 мкл в каждую пробирку. Инкубируем 20 мин на льду. Отмываем в 200 мкл — 1500 об./5 мин. Ресуспензируем клетки в 500 мкл в окрашивающем буфере. Анализ на проточном цитофлуориметре.

### *1.5. Определение экспрессии внутриядерного транскрипционного фактора FoxP3*

Приготовить мононуклеары периферической крови пациента и здорового донора.

Внести необходимое количество поверхностных моноклональных антител CD4 и CD25 на дно пробирки 12×75 мм. Добавить по 100 мкл клеточной суспензии в каждую пробирку, перемешать и инкубировать 20 мин при комнатной температуре в темноте. Добавить 2 мл промывающего буфера. Центрифугируем при 250×g 10 мин, сливаем надосадочную жидкость. Фиксируем клетки, мягко перемешивая в остаточном объеме раствора и добавляем 2 мл раствора А (FoxP3). Перемешиваем. Инкубируем 10 мин при комнатной температуре в темноте. Центрифугируем при 500×g 5 мин. Для пермеабилзации клеток мягко ресуспензируем осадок в остаточном объеме буфера и добавляем 0,5 мл раствора С (FoxP3) в каждую пробирку. Перемешиваем. Инкубируем 30 мин при комнатной температуре в темноте. Отмываем клетки, центрифугируем, сливаем супернатант. Шаг повторяем дважды. Добавляем 5 мкл моноклональных антител FoxP3. Мягко перемешиваем. Инкубируем 30 мин при комнатной температуре в темноте. Ресуспензируем в отмывающем буфере. Образцы готовы для записи на проточном цитофлуориметре.

### *2.1. Мутационный скрининг генов VTK, CYBB, WAS, SH2D1A, IL2-g chain, FoxP3, CD40L*

Мутационный анализ генов X-сцепленных первичных иммунодефицитов проводился у пациентов с нарушенными функциональными иммунологическими тестами методом полимеразной цепной реакции на тотальной клеточной ДНК, которую выделяют методом фенол-хлороформной экстракции из периферической крови или костного мозга пациентов.

ПЦР проводят при стандартных условиях: 1х ПЦР буфер с KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 1U Taq полимеразы. ПЦР для всех фрагментов включает 38 циклов амплификации. Тотальную клеточную ДНК вносят в реакцию в количестве 100 нг.

Продукт ПЦР реакции, предназначенный для секвенирования, очищался от неспецифических продуктов амплификации с использованием электрофореза в 6% полиакриламидном геле и элюировался из вырезанного фрагмента геля в ТЕ (Трис-ЭДТА) — буфер (рН = 8,0) в ходе инкубации в термомиксере при 45°С в течение 1 ч.

Далее очищенный образец использовался в качестве матрицы для реакции секвенирования. Реакция терминации проводилась с использованием тех же

праймеров, что и для ПЦР и готовой смеси терминаторов BigDye Terminators v1.1. Для секвенирования в каждую реакцию терминации вносилось 4 мкл ТЕ-буфера, содержащего очищенный ПЦР-продукт, 3,2 пмоль прямого или обратного праймера, использовавшихся для ПЦР-амплификации, 9 мкл чистой воды, 4 мкл раствора терминаторов BigDye Terminators v1.1 и 2 мкл буфера для секвенирования.

Продукты реакции терминации очищались от невстроившихся терминаторов этанол/ЭДТА преципитацией. Капиллярный электрофорез и детекция полученных продуктов терминации осуществлялись на секвенаторе.

## *2.2. Генетическая диагностика анемии Фанкони у пациентов с положительным ДЭБ-тестом*

Праймеры для проведения секвенирования генов *FANCA*, *FANCC*, *FANCG*.

## *2.3. Методика цитогенетического исследования культуры клеток биоптата ворсин хориона и плаценты*

*Полупрямой метод:*

1. Посадка. Ворсины промыть в растворе Хэнкса и поместить в чашки Петри с 3 мл питательной среды.

2. Чашки Петри поставить в инкубатор на 20–24 ч (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 80% влажность).

3. Снятие. Ввести 0,3 мкл колхицина и оставить в инкубаторе на 45–50 мин.

4. Гипотоническая обработка. Удалить среду пипеткой и добавить 4 мл 1% раствора цитрата натрия. Оставить на 10 мин при температуре 37°C.

5. Фиксация. Добавить 4 мл 100% фиксатора и оставить на 3–5 мин. Удалить пипеткой смесь гипотонии и фиксатора и добавить 4 мл предварительно охлажденного 100% фиксатора, оставить при комнатной температуре не менее чем на 15 мин.

6. Приготовление препаратов. Ворсины достать и подсушить на фильтровальной бумаге. Поместить ворсины в 1–2 капли 60 или 80% уксусной кислоты на 1–2 мин. Осторожно распределить клеточную суспензию на предварительно нагретые стекла. Стекла высушить на плитке.

Общее время нахождения ворсин в уксусной кислоте не должно превышать 6–7 мин.

7. Рутинное окрашивание препаратов. Поместить стекла в раствор краски Giemsa на 8–10 мин, время подобрать эмпирическим путем. Промыть препараты водой и высушить стекла.

Дифференциальное окрашивание препаратов:

а) обработка препаратов трипсином. Время обработки подбирается эмпирическим путем;

б) поместить стекла в раствор краски Giemsa на 8–10 мин. Промыть препараты водой и высушить стекла.

8. Анализ полученного препарата врачом-лаборантом-цитогенетиком.

*Длительное культивирование:*

1. Посадка:

*1 метод (с предварительной механической обработкой)*

Ворсины измельчить, перенести в пробирку. Оставить на 1 ч без среды. Добавить 2 мл питательной среды. Поставить в инкубатор (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 80% влажность).

*II метод (с предварительной ферментативной обработкой)*

а) поместить ворсины в центрифужную пробирку. Добавить 1 мл трипсина, предварительно нагретого до 37°C. Оставить в инкубаторе на 30 мин – 1 ч. Пробирка должна быть в наклонном положении, периодически ворсины встряхивать;

б) центрифугировать 5 мин (1000 об./мин). Удалить пипеткой трипсин. Добавить 1 мл раствора коллагеназы. Инкубировать 40 мин – 2 ч (37°C). Пробирка должна быть в наклонном положении, периодически ворсины встряхивать;

в) центрифугировать 5 мин (1000 об./мин). Удалить пипеткой раствор коллагеназы. Добавить 2 мл питательной среды. Оставить пробирку в инкубаторе (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 80% влажность).

2. Ежедневно контролировать рост культуры под инвертированным микроскопом. Каждые 2–3 дня менять среду.

3. Субкультивирование. Удалить среду. Добавить 1 мл версена. Удалить. Добавить 2 мл трипсина. Удалить. Оставить в термостате на 5–6 мин. Залить 1 мл среды и с помощью пипетки снять колонии. Перенести суспензию клеток в чашки Петри. Добавить среду.

Субкультивирование может проводиться внутри чашек Петри без переноса суспензии на другие единицы.

4. Снятие. Ввести 0,30 мкл колхицина на 30–40 мин. Оставить в инкубаторе.

5. Гипотоническая обработка. Удалить пипеткой среду. Добавить 4 мл гипотонии. Оставить на 20 мин в термостате (37°C).

6. Фиксация. Добавить 2 мл 50% фиксатора. Удалить. Добавить 2 мл 50% фиксатора. Удалить. Повторить обработку 50% фиксатором еще 2 раза. В последний фиксатор добавить 1 мл 100% фиксатора. Удалить. Залить 2 мл 100% фиксатора. Удалить. Повторить обработку 100% фиксатором еще 2 раза.

7. Высушить препараты.

8. Оставить препараты на сутки в термостате (56°C).

9. Дифференциальное окрашивание препаратов:

9.1. Обработка препаратов трипсином. Время обработки подбирается эмпирическим путем.

9.2. Поместить стекла в раствор краски Giemsa на 8–10 мин. Промыть препараты водой и высушить стекла.

10. Анализ полученного препарата врачом-лаборантом-цитогенетиком.

#### *2.4. Выделение ДНК из амниотической жидкости*

Центрифугировать пробирку с амниотической жидкостью 5 мин на 3,000 грм. Слить надосадочную жидкость. Добавить 1 мл PBS. Ресуспензировать. Перенести в эппендорф. Центрифугировать 3 мин 8,000 грм. Убрать надосадочную жидкость. К осадку добавить 0,5 мл DB-буфера. Тщательно отвортексировать на малых оборотах. Поставить на 55°C в термошейкер до полного растворения (30–60 мин). Добавить равное количество фенол-хлороформа для ДНК. Отвортексировать. Центрифугировать 5 мин 10,000 грм. Собрать верхнюю фазу и перенести в новую пробирку. Добавить 1 мл изопропанола. Отвортексировать тщательно.

Центрифугировать 30 мин на 14,000 грм. Убрать надосадочную жидкость. К осадку добавить 70% этанол. Встряхнуть. Центрифугировать 5 мин на 14,000 грм. Аккуратно собрать надосадочную жидкость. Сушить в ламинаре. Добавить ТЕ буфер, рН = 8,0, 50–100 мл. В термошейкер на 37°C на 15–30 мин.

#### 2.5. Выделение ДНК из ворсинок хориона

Пробирку центрифугировать на 5,000 грм 10 мин. Собрать супернатант. Добавить 0,5 мл DB-буфера и 5 мкл протеиназы. Поставить в термошейкер на 37°C до полного растворения (на ночь). Добавить равное количество фенол-хлороформа для ДНК. Отвортексировать. Центрифугировать 5 мин 10,000 грм. Собрать верхнюю фазу и перенести в новую пробирку. Добавить 1 мл изопропанола. Отвортексировать тщательно. Центрифугировать 30 мин на 14,000 грм. Убрать надосадочную жидкость. К осадку добавить 300–500 мкл DB-буфера. Отвортексировать. Осадить. Поставить в термошейкер на 55°C до полного растворения (1–2 ч). Добавить равное количество 8М ацетата аммония. Встряхнуть. Поставить на -20°C на 5 мин. Центрифугировать 20 мин на 14,000 грм. Перенести супернатант в новую пробирку. Добавить 1 мл изопропанола. Отвортексировать тщательно. Центрифугировать 30 мин на 14,000 грм. Убрать надосадочную жидкость. К осадку добавить 0,5 мл 70% этанола. Встряхнуть. Центрифугировать 5 мин на 14,000 грм. Аккуратно собрать надосадочную жидкость. Сушить в ламинаре. Добавить ТЕ буфер, рН 8,0, 100–200 мл. В термошейкер на 37°C на 15–30 мин.

**Пренатальная диагностика** осуществляется после подтверждения носительства мутантного гена у матери, т. е. исключение мутации *de novo* у пробанда, и 100% вероятности рождения мальчика при X-сцепленных первичных иммунодефицитах. При анемии Фанкони — подтверждение наличия мутантных аллелей у родителей при консультировании детей обоего пола.

### ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные сложности в проведении пренатальной диагностики X-сцепленных первичных иммунодефицитов и способы их устранения изложены в табл.

Таблица — Возможные сложности в проведении пренатальной диагностики X-сцепленных первичных иммунодефицитов и способы их устранения

Проблемы	Способы разрешения
При пренатальной диагностике X-сцепленных ПИД вероятный забор материнских клеток, которые несут в себе мутацию	Для X-сцепленных ПИД преимущественным методом получения ДНК плода является забор ворсин хориона; врач-цитогенетик зрительно под микроскопом отбирает самые ветвистые ворсинки и в течение 2 дней определяет пол ребенка; при заборе амниотической жидкости возможность попадания материнских клеток в образец увеличивается, особенно если в саму жидкость попадает кровь, тогда второй

	мутационный анализ проводят из клеток культуры, полученной к 20-й неделе гестации
Недостаточное количество клеток плода при амниоцентезе для одновременного проведения мутационного анализа и HLA-типирования при отказе прерывания беременности после обнаружения мутации у плода	Одновременно при амниоцентезе берется культура клеток (амниоцитов), которая к 20–22-й неделе может дать достаточное количество клеток для HLA-типирования
ПЦР не проходит	Проверить качество ДНК, очистить методом высаливания, повторить мутационный анализ