

Научно – исследовательская работа

Биология

**«Обоснование применения методики полимеразной
цепной реакции для неинвазивной пренатальной
диагностики резус- фактора плода».**

Выполнил(а):

Гуськова Софья Александровна

учащий(ая)ся 11 класса

МБОУ «СОШ №13», Россия, Калуга

Хегай Евгений Альбертович

научный руководитель:

должность: врач высшей категории,

заведующий клинико-диагностической лабораторией

место работы: ГБУЗ КО «КОКБ», Россия, г. Калуга

Самоценкова Анна Александровна

научный консультант:

должность: врач высшей категории,

заведующая консультативно - диагностическим отделением

ПЦ

место работы: ГБУЗ КО «КОКБ», Россия, г. Калуга

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1 Гемолитическая болезнь плода, новорожденного.....	6
1.1 Экономическое обоснование.....	8
1.2 Этапы полимеразной цепной реакции	9
Глава 2 Практическое описание исследования.....	12
2.1 Оборудование и материалы	12
2.2 Экспериментальный этап.....	13
2.3 Основные результаты.....	15
Заключение.....	19
Список литературы.....	21
Приложения.....	23

Введение

Несмотря на значительные достижения перинатальной медицины, проблема гемолитической болезни плода и новорожденного на фоне иммуноконфликтной беременности в нашей стране не может считаться до конца решенной [6, 7]. Гемолитическая болезнь плода в Российской Федерации диагностируется приблизительно у 0,6% новорожденных [11]. Показатели перинатальной смертности при гемолитической болезни плода остаются высокими и составляют 15 – 16% [11]. В медицинских организациях Калужской области зарегистрировано случаев гемолитической болезни новорожденных: 2012 – 29; 2013 – 68; 2014 – 86; 2015 – 113; 2016 – 101; 2017 – 108; 2018 – 95. Это составляет 2,1% [13].

Значимое снижение перинатальной заболеваемости и смертности от гемолитической болезни плода невозможно без организации мер по своевременной и всеобщей профилактике резус – иммунизации во время беременности и в раннем послеродовом периоде [9].

Более того, успехи в развитии молекулярно – генетических технологий в настоящее время сделали возможным неинвазивное определение резус – генотипа плода уже в конце первого триместра путем пренатального тестирования свободной ДНК плода в образцах матери с чувствительностью и специфичностью 98 – 100 %. Новое направление пренатальной диагностики, более надежное и безопасное для здоровья плода и матери, чем традиционные методы. Это направление, названное неинвазивной пренатальной диагностикой (НИПД), бурно развивается с конца 1990 – х гг. [13]. НИПД основана на анализе плодного материала, проникающего в материнский кровоток (приложение № 1, рис.1) [7].

Сегодня несколько разработок по НИПД доступны в качестве услуг для пациента. В первую очередь это анализ внеклеточной фетальной ДНК (вкфДНК) для определения хромосомных аномалий, выполняемый технологией секвенирования нового поколения [8]. Ввиду технической сложности и высокой стоимости оборудования такие технологии недоступны широкому кругу

лабораторий, поэтому во всем мире лишь некоторые лаборатории предлагают исследования на основе NGS в виде услуг.

Однако, такой анализ, как определение резус – фактора плода у резус – отрицательных беременных, можно выполнять в условиях стандартно оснащенной клинической ПЦР – лаборатории с помощью коммерческих наборов реагентов [12]. Благодаря сравнительно низкой цене наборы реагентов для ПЦР в режиме реального времени доступны для многих учреждений, и такой анализ можно внедрить в широкую практику.

Актуальность данной работы состоит в том, что полимеразная цепная реакция (ПЦР) является перспективной методикой неинвазивного определения резус – фактора плода как с позиции снижения перинатальной заболеваемости, так и с позиции снижения затрат на обследование в лечении беременных и новорожденных [9].

Цель настоящего исследования – раскрыть перспективы использования полимеразной цепной реакции в лабораторной диагностике неинвазивного определения резус – фактора плода.

Задачи:

1. Дать экономическое обоснование применения метода.
2. Изучить основные характеристики метода ПЦР.
3. Проанализировать планируемый результат.
4. Описать дальнейшую стратегию проекта.

В основу гипотезы положено предположение о наличие основного неинвазивного метода диагностики определения резус – фактора плода – полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Объект исследования: Фетальная ДНК, выделенная из плазмы крови беременной женщины.

Предмет исследования: Использование ПЦР в лабораторной диагностике неинвазивного определения резус – фактора плода.

Методы исследования:

1. Изучение научной литературы.

2. Подготовка, проведение исследования, протоколирование.

3. Анализ полученных результатов.

Автором сформулированы цели и задачи исследований, осуществлены теоретические и экспериментальные исследования. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в отборе плазмы крови из вакутейнеров, оформлении протоколов исследований, обработке данных, внесении результатов в лабораторную информационную систему (ЛИС). Автор лично участвовала в выделении ДНК (лизис, изоляция нуклеиновых кислот, освобождение ингибиторов, элюция) и постановке ПЦР (детекция образцов в амплификаторе) под наблюдением научного руководителя. Подтверждение резус – фактора у беременных женщин и определение резус – фактора новорожденных выполнено автором. Экономическое обоснование применения набора для неинвазивного определения резус – фактора плода по крови матери проведено автором работы. Автором предложен эффективный алгоритм проведения иммуногематологического исследования, который будет способствовать выявлению группы риска развития гемолитической болезни плода и новорожденного, а также обеспечит выполнение индивидуального подхода к резус – профилактике беременной женщины.

Научная новизна работы: определен доступный неинвазивный метод на основе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР – РВ) с высокой чувствительностью и точностью уже на 10 – й неделе беременности.

Практическая новизна: впервые в Калужской области проведено внедрение в практическое здравоохранение диагностики внеклеточной фетальной ДНК, выделенной из плазмы материнской крови, с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Практическая значимость работы: использование данной инновационной методики по раннему определению резус – фактора плода у резус – отрицательных беременных очевидна, так как позволяет решать вопрос о необходимости профилактического введения антирезусного иммуноглобулина.

Глава I. Гемолитическая болезнь плода, новорожденного

Гемолитическая болезнь плода – заболевание, характеризующее гемолизом резус – положительных эритроцитов плода под воздействием анти – Rh (D) антител матери, проникающих в кровотоки плода через плацентарный барьер при несовместимости крови матери и плода по системе резус [11].

Вероятность резус – конфликта во время беременности возникает в том случае, если женщина резус – отрицательна, мужчина резус – положителен, и ребенок наследует резус – положительный антиген от отца.

Резус – фактор – антиген, который находится на поверхности красных кровяных телец – эритроцитов. Он может присутствовать (резус – положительный), или отсутствовать (резус – отрицательный).

Резус – фактор плода преодолевает плацентарный барьер и попадает в кровь матери. Её организм, восприняв плод как нечто чужеродное, начинает вырабатывать защитные антитела для уничтожения эритроцитов ребенка. Происходит гемолиз эритроцитов с образованием непрямого токсичного билирубина. Разрушение эритроцитов приводит к развитию анемии (снижению количества гемоглобина) у плода, а накопление непрямого билирубина приводит к развитию желтухи. Непрямой билирубин, достигая критического уровня, оказывает токсическое действие на целый ряд функций клеток. Непрямой билирубин в первую очередь поражает ядра клеток головного мозга. Прогрессирующая анемия и интоксикация приводят к сердечной недостаточности, развитию гипопропротеинемии и усилению проницаемости сосудов. Иммунологическая несовместимость плода и матери по резус – фактору является основной причиной гемолитической болезни новорожденного [11].

В Российской Федерации всем резус – отрицательным женщинам, беременным от резус – положительного мужчины, показано введение антирезусного иммуноглобулина на сроке 28 недель беременности и в течение 72 ч после родов, а также после аборт и инвазивных процедур [2]. Однако, по литературным данным около 50% резус – отрицательных беременных носят

резус – отрицательный плод. В таких случаях анализ предотвращает излишнее применение – резусного иммуноглобулина, поскольку профилактика показана только при беременности резус – положительным плодом [2].

Стоимость анти – D – иммуноглобулина достаточно высока, поэтому введение его всем женщинам подряд сопряжено с неоправданными экономическими затратами [8]. Кроме того, анти – D – иммуноглобулин может быть небезопасным для матери, так как его получают из донорской крови, а сама процедура введения хоть и редко, но может сопровождаться нежелательными побочными эффектами (аллергические реакции, диспепсические явления).

Учитывая все эти факторы, перед введением препарата анти D – иммуноглобулина целесообразно предварительно определять резус – фактор плода у резус – отрицательных женщин на сроке 11 – 17 недель, и лишь при подтверждении резус – положительного фактора надо принимать решение о профилактике антирезусным иммуноглобулином.

Методы неинвазивной пренатальной диагностики, дают доступ к генетической информации на ранних сроках гестации без риска и дискомфорта для беременной. ДНК плода присутствует в плазме матери и составляет 3,4% [7]. Этого количества вкфДНК достаточно для молекулярно – генетического анализа.

На сегодняшний день единственный метод прямого определения резус – фактора плода – это исследование материала, полученного инвазивным путем (хориоцентез, амниоцентез и кордоцентез). Выполняются обычно на 18 – 20 неделях беременности. Исследования связаны с риском потери плода: преждевременное излитие околоплодных вод, кровотечение из пунктируемого сосуда, плодово – материнское кровотечение, гематома пуповины, внутриутробная гибель плода [7].

1.1 Экономическое обоснование

Таблица 1.

Экономическое обоснование применения набора реагентов для неинвазивного определения резус – фактора плода по крови матери с 10 – й недели беременности [2, 13].

Число резус – отрицательных беременных в год в Калужской области	1640
Без определения резус – фактора плода	
Необходимо доз иммуноглобулина (равняется количеству резус – отрицательных беременных)	1640
Стоимость одной дозы (3 167 Р), нужно две дозы	6 334 Р
Количество анализов крови на резус – антитела (раз в месяц)	9
Цена одного анализа	400 Р
Стоимость анализов крови (резус – антитела)	5 904 000 Р
Стоимость антирезусного иммуноглобулина (расходы на профилактику резус – конфликта)	10 387 760 Р
Затраты на ведение и профилактику резус – конфликта	16 291 760 Р
При определении резус – фактора плода	
Стоимость одного определения резус – фактора плода	2 530 Р
Итого расходы на определение резус – фактора плода	4 149 200 Р
Так как 50% плодов окажутся резус – отрицательными, расходы на профилактику резус – конфликта уменьшаются в два раза	
Стоимость антирезусного иммуноглобулина	5 193 880 Р
Стоимость анализов крови (резус – антитела)	2 952 000 Р
Затраты на ведение и профилактику резус – конфликта	12 295 080 Р

Экономический эффект	3 996 680 Р
----------------------	-------------

1.2 Этапы полимеразной цепной реакции

ПЦР – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале. Процесс увеличения числа копий ДНК называется амплификацией [10].

Принцип метода основан на амплификации *in vitro* заданных фрагментов ДНК человека и последующей детекции кривых плавления продуктов ПЦР и специфических зондов с полностью или частично известной последовательностью.

Для реализации этого принципа необходимо наличие реакционной смеси, в состав которой должны входить следующие компоненты: (приложение № 2, рис.2).

– Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды. Состоят из оснований ДНК и РНК. Они играют ключевую роль в образовании продуктов амплификации.

– Tag – полимеразы – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3' – конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

– Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Это строительный материал, используемый Tag – полимеразой для синтеза цепи ДНК.

– Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

– Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, служащую мишенью для последующего многократного копирования.

– Контрольные образцы.

Процесс амплификации состоит из трех этапов, протекающих при различных температурных и временных режимах: (приложение №2, рис.3)

1. Денатурация ("плавление") ДНК. Переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под действием высоких температур.
2. Отжиг – связывание праймеров с матричной ДНК. Присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК – мишени. Праймеры производители реагентов подбирают так, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.
3. Элонгация (синтез) цепи. После отжига праймеров Tag – полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5' – экзонуклеазной активности.

Переход от одной стадии к другой достигается изменением температуры в инкубируемой смеси. Этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается (приложение №2, рис.4). Сама реакция проходит в одноразовой пластиковой микропробирке, которую помещают в амплификатор.

Для контроля точности используют калиброванные внутренние контроли. В состав диагностических наборов введен положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО).

Для анализа ПЦР в реальном времени используют специальные амплификаторы (термоциклеры), с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки во время каждого цикла реакции (рис.1.) [10].



Рисунок 1. Амплификатор «CFX 96 Touch», Bio – Rad

Вывод: Данная инновационная методика по раннему определению резус – фактора плода у резус – отрицательных беременных очевидна, так как позволяет решить вопрос о необходимости введения иммуноглобулина, тем самым уменьшая необходимость в ненужных исследованиях, предотвратить излишнее использование анти – D – иммуноглобулина и значительно сэкономить бюджетные средства.

Глава II. Практическое описание исследования

2.1 Оборудование и материалы

Забор материала произведен в условиях процедурного кабинета, сертифицированным медицинским персоналом соответствующего профиля ГБУЗ КО «КОКБ». Пробы доставлены в клиничко – диагностическую лабораторию областной клинической больницы.

Процедуры с кровью на преаналитическом этапе, в том числе сроки и длительность центрифугирования, время хранения образцов до момента постановки тестов осуществлены согласно правилам проведения преаналитических мероприятий [3, 4].

При работе с исследуемыми и контрольными образцами соблюдены меры предосторожности, принятые при взаимодействии с потенциально инфицированным материалом (приложение №5 рис.12, 13, 14) [1].

Для проведения исследования включена группа пациенток, находящихся на учете у акушера – гинеколога ГБУЗ КО «КОКБ» с беременностью разного срока гестации (14 – 28 недель). Выделение ДНК из каждого образца плазмы дублировалось, и полученные образцы ДНК тестировались независимо друг от друга.

В работе проанализировано 12 образцов плазмы крови резус – отрицательных беременных с целью установления резус – фактора плода, при этом отрицательный резус – фактор у беременных определяли методом в гелевом тесте [5]. Во всех случаях результаты были подтверждены анализом крови на резус – принадлежность новорожденных (рис.5).

Все женщины подписали информированное согласие на выполнение исследований (приложение №7). Пациентки имели одноплодную беременность, подтвержденную УЗИ на момент обследования.

– Материал для исследования: венозная кровь в пробирке объемом 8 мл с ЭДТА – антикоагулянтом. Плазму крови отделяли от клеток с помощью центрифугирования. Во избежание дегградации вкфДНК, а также с целью сокращения в плазме крови доли материнской ДНК, высвобождающейся при

лизисе лейкоцитов, эти процедуры проводили не менее чем через 24 ч с момента взятия крови. Плазму крови отбирали в стерильные пробирки, свободные от ДНК, после чего выделяли вкфДНК.

- Амплификатор «CFX96» («Bio – Rad», США)
- ПЦР – бокс, «БАВ-ПЦР – «Ламинар – С»
- Пипетки (дозаторы) механические 120 – мкл, 20 – 200 мкл, 50 – 1000мкл
- Вортекс Микроспин FV – 2400, Biosan
- Отдельный халат, перчатки (без талька)
- Лабораторная микроцентрифуга Eppendorf MiniSpin
- Набор реагентов производителя
- ПЦР – пробирки 0,2 мл
- Магнитный штатив для пробирок 1,5 – 0,2 мл
- Емкости с крышкой дезинфицирующим раствором

2.2 Экспериментальный этап

Для выделения ДНК из образцов плазмы крови с помощью магнитных частиц применяли набор производителя (приложение №3, рис.5). Принцип используемого в наборе метода основан на обратимом связывании ДНК на поверхности магнитных частиц.

Этапы пробоподготовки (рис.2):

- лизис – к исследуемым образцам добавляют лизирующий раствор и магнитные шарики;
- изоляция НК – выделенная ДНК связывается с магнитными шариками;
- освобождение от ингибиторов – вымывание клеточных элементов в процессе отмывания;
- элюция – переводение ДНК с помощью низкосолевого буфера в раствор (приложение № 3, рис.6).



Рисунок 2. Этап выделения

После окончания процедуры выделения ДНК следует проведение ПЦР – реакции. Одноразовую пластиковую микропробирку помещают в амплификатор (рис.3).



Рисунок 3. Амплификация

ПЦР в режиме реального времени – это определение в реальном времени специфической последовательности ДНК в образце после каждого цикла амплификации. Задача прибора – поддерживать, быстро менять заданный температурный режим, держать ее в течение заданного времени и переходить к следующему этапу. Детекция флуоресцентного сигнала происходит на стадии 3 (приложение №4, рис.7). Результатом измерения являются кривые плавления.

Полученные результаты анализируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из исследуемых образцов.

Интерпретация производится с помощью программного обеспечения используемого прибора в режиме «реального времени».

Результат ПЦР – исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательных и положительных контролей амплификации. Пример результатов исследования, отвечающих всем необходимым параметрам верного прохождения реакций (приложение №5, рис.8).

Принцип интерпретации результатов определения резус – фактора плода следующий:

– ДНК гена резус – фактора ОБНАРУЖЕНА, если для данной пробы сигналы по каналу FAM в трех или двух пробирках RHD выше установленного порогового значения, и сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH выше установленного порогового значения (приложение №5 рис.9);

– ДНК гена резус – фактора НЕ ОБНАРУЖЕНА, если для данной пробы сигналы по каналу FAM в трех RHD ниже установленного порогового значения, а сигнал по каналу FAM в пробирке GAPDH выше установленного порогового значения и выходит не позже, чем контрольная ДНК (ПКО) (приложение №5 рис.10);

– Если для пробы получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР – исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из плазмы (приложение №5 рис.11).

2.3 Основные результаты

Ввиду сложности генетического кодирования резус – фактора крови и существования нескольких генетических механизмов, приводящих к резус – отрицательному – фенотипу, с целью повышения специфичности анализа ПЦР – РВ проводили по трем разным участкам гена RHD (экзонам 6, 7, 8) [5]. Параллельно ставили реакцию амплификации гена GAPDH с целью контроля выделения ДНК и прохождения ПЦР. Отрицательный и положительный контрольные образцы, присутствующие в наборе, анализировали при каждой постановке [10].

По данным исследования в 10 опытных образцах резус – фактор фетальной ДНК обнаружен. В двух образцах – не обнаружен (рис.4).

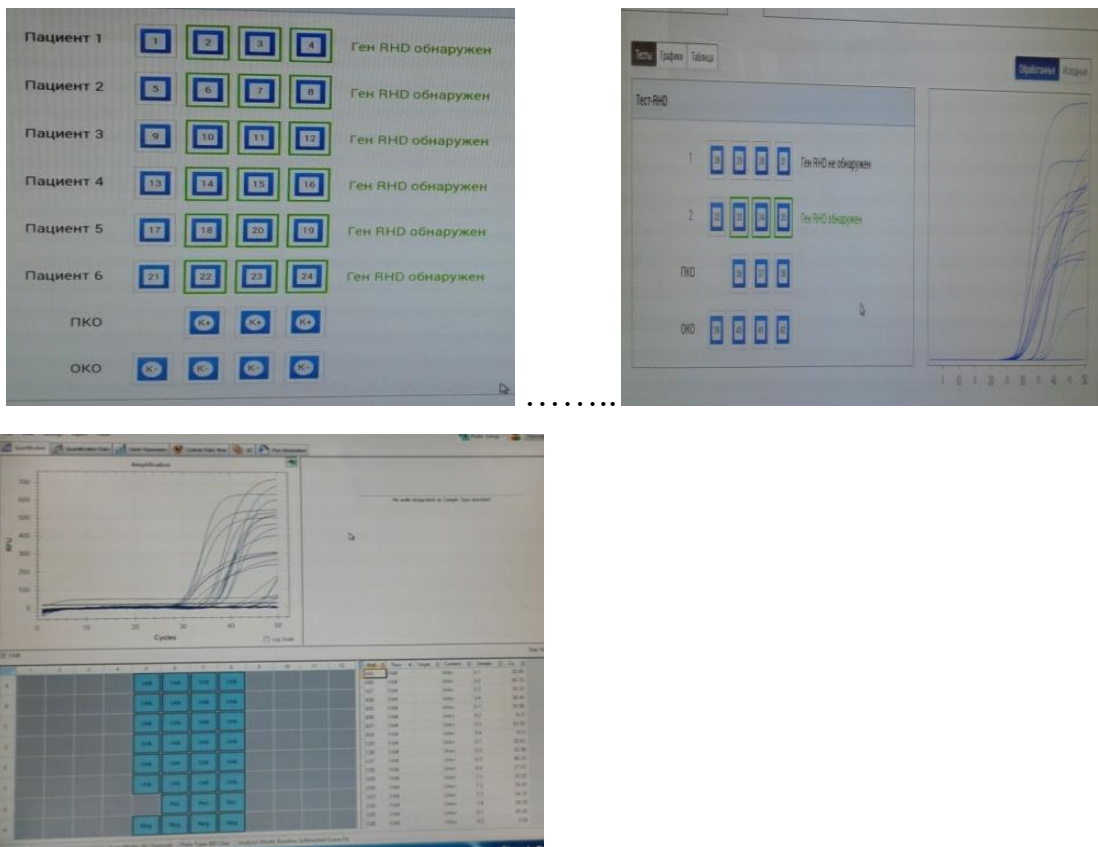


Рисунок 4. Протоколы исследования

После родов во всех случаях резус – фактор новорожденных определяли методом в гелевом тесте (ID – карты) (рис.5) [5].





Рисунок 5. Результаты определения группы, резус – фактора новорожденного в ID – картах в гелевом тесте

Затем эти данные сравнивались с результатами вкфДНК, выделенной из плазмы материнской крови, с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (таблица 2).

Таблица 2.**Результаты анализов образцов для определения резус – фактора****плода**

Дата забора	Мать Rh D ОТР.	Результат RHD	Дата отработки	Отец Rh D ПОЛ	Дата родов	Ребенок группа/Rh
01.03.2019	O (I)	обнаружена	16.03.2016	A(II)	26.05.2019	O (I) /пол
04.03.2019	O (I)	не обнаружена	16.03.2019	A (II)	23.05.2019	A (II) / отр
04.03.2019	B (III)	обнаружена	16.03.2019	A (II)	17.08.2019	AB (IV) /пол
11.03.2019	A (II)	обнаружена	16.03.2019	B (III)	17.07.2019	B (III) / пол
11.03.2019	A (II)	обнаружена	16.03.2019	O (I)	30.08.2019	A (II) / пол
07.03.2019	O (I)	не обнаружена	16.03.2019	A (II)	23.07.2019	O (I) / отр
21.03.2019	B (III)	обнаружена	23.03.2019	O (I)	07.07.2019	O (I) / пол
20.03.2019	A (II)	обнаружена	23.03.2019	A (II)	09.08.2019	A (II) / пол
19.03.2019	O (I)	обнаружена	23.03.2019	O (I)	05.06.2019	O (I) / пол
15.03.2019	A (II)	обнаружена	23.03.2019	O (I)	01.08.2019	A (II) / пол
15.03.2019	B(III)	обнаружена	23.03.2019	A (II)	14.07.2019	A (II) / пол
15.03.2019	A (II)	обнаружена	23.03.2019	O (I)	30.05.2019	A (II) /пол

Вывод: Можно с уверенностью сказать, что использование теста, имеющего высокие показатели чувствительности, точности и специфичности, открывает большие возможности для своевременной диагностики резус – конфликта, и как следствие, для профилактики связанных с ним состояний.

Заключение

На примере 2 клинических случаев показана значимость проведения скрининга фетальной ДНК у беременных женщин с резус – отрицательной принадлежностью. Данный скрининг должен быть включен в нормативные документы и, соответственно, введен в рутинную практику. Информация о резус – факторе плода должна быть документирована и при необходимости доступна для лечебного учреждения.

Таким образом, проведя исследовательскую работу, можно сделать следующие выводы:

1. Метод позволяет сохранить свыше 20% бюджетных средств на ведение беременных с резус – отрицательным фактором.

2. Выяснено, что ПЦР – это способ наработки в больших количествах и выявления специфических участков нуклеиновых кислот.

3. Образцы проанализированы по гену RHD, кодирующий белок RhD.

4. Исследования в рамках настоящего проекта могут быть продолжены.

Так, в перспективе определение пола ребенка на основе анализа внеклеточной фетальной ДНК, выделенной из плазмы крови беременной, с помощью ПЦР.

Определение пола плода может быть полезным в случаях:

– назначения специальной терапии на этапе внутриутробного развития плода, например, для лечения некоторых эндокринных расстройств, таких как врожденная дисфункция коры надпочечников.

– наличие вероятности генетических заболеваний и заболеваний, сцепленных с полом.

В настоящее время насчитывается более 300 наследственных заболеваний и признаков, связанных с полом. Для этих болезней характерна передача патологического гена обычно здоровыми женщинами – носительницами их сыновьям [7, 9, 14].

Традиционные инвазивные методы, применяемые для выявления заболеваний, сцепленных с полом, имеют высокие риски и не могут быть

выполнены до 11 недель беременности, а по результатам УЗИ пол можно определить лишь с 13 – й недели, что связано с формированием наружных половых органов [9, 14].

Список литературы

Нормативно – технические документы:

1. МУ 1.3.2569 – 09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы III – IV групп патогенности».
2. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01. 11. 2012 г. №572 н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» к ФЗ от 21. 11. 2011г. № 323 – ФЗ.
3. СанПиН 1.3.2322 – 08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями болезней».
4. СанПин 2.1.7.2790 – 10 «Санитарно – эпидемиологические требования с медицинскими отходами».

Книги:

5. Дуткевич И.Г. Практическое руководство по клинической иммуногематологии. Санкт – Петербург «СпецЛит», 2018. С.79 – 86.
6. Малышева О.В., Баранов В.С. Неинвазивная пренатальная диагностика. Проблемы, подходы и перспективы // Журн. акушерства и женских болезней. 2012. Т.LXI. №3. С. 83 – 93.
7. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Невынашивание беременности. Руководство для практикующих врачей. М.: МИА, 2011. 534 с.
8. Тороповский А.Н., Никитин А.Г., Викторов Д.А. Неинвазивная пренатальная диагностика пола и резус – фактора плода (результаты многоцентрового исследования) // Доктор Ру. 2016. No 8 (125) – No 9 (126). С. 38 – 43.
9. Фролова О.Г., Суханова Л.П., Волгина В.Ф. Пренатальная диагностика – важнейшая задача региональных программ модернизации здравоохранения // Акушерство и гинекология. 2012. No 5. С. 75 – 78.
10. ПЦР "в реальном времени" / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др.; под ред. д. б. н. Д.В. Ребрикова; предисл. Л.А. Остермана и

акад. РАН и РАСХН Е.Д. Свердлова; 2 – е изд., испр. и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 223 с.

11. Резус – сенсбилизация. Гемолитическая болезнь плода. Клинические рекомендации (протокол) / Г.М. Савельева, Л.В. Адамян, М.А. Курцер и др. Письмо Минздравсоцразвития РФ. М.: 2017. С. 2 – 5.

Описание патентных документов

12. Набор олигонуклеотидных праймеров и зондов и способ количественного определения фетальной ДНК в кровотоке беременной женщины на основе анализа гиперметилированных участков ДНК плода: пат. 2642622 РФ, Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен» (RU) / А.Н. Тороповский, А.Г. Никитин, Д.А. Викторов, Е.В. Жмырко. 1 с.

Электронный ресурс удаленного доступа (Internet)

13. Калужская область – статистика по региону. Режим доступа: URL:[http://russia.duck.consulting > regions / 40](http://russia.duck.consulting>regions/40) (дата обращения – 01. 02. 2019).

14. Cell free fetal DNA (cffDNA) migrating into the maternal blood stream via the apoptotic trophoblast cells shedding off the placental tissue. Режим доступа URL: [http:// en.wikipedia.org wiki / File: Cell_free_fetal_DNA_shedding_into_maternal_bloodstream.pdf](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cell_free_fetal_DNA_shedding_into_maternal_bloodstream.pdf) (дата обращения – 15. 02. 2019).

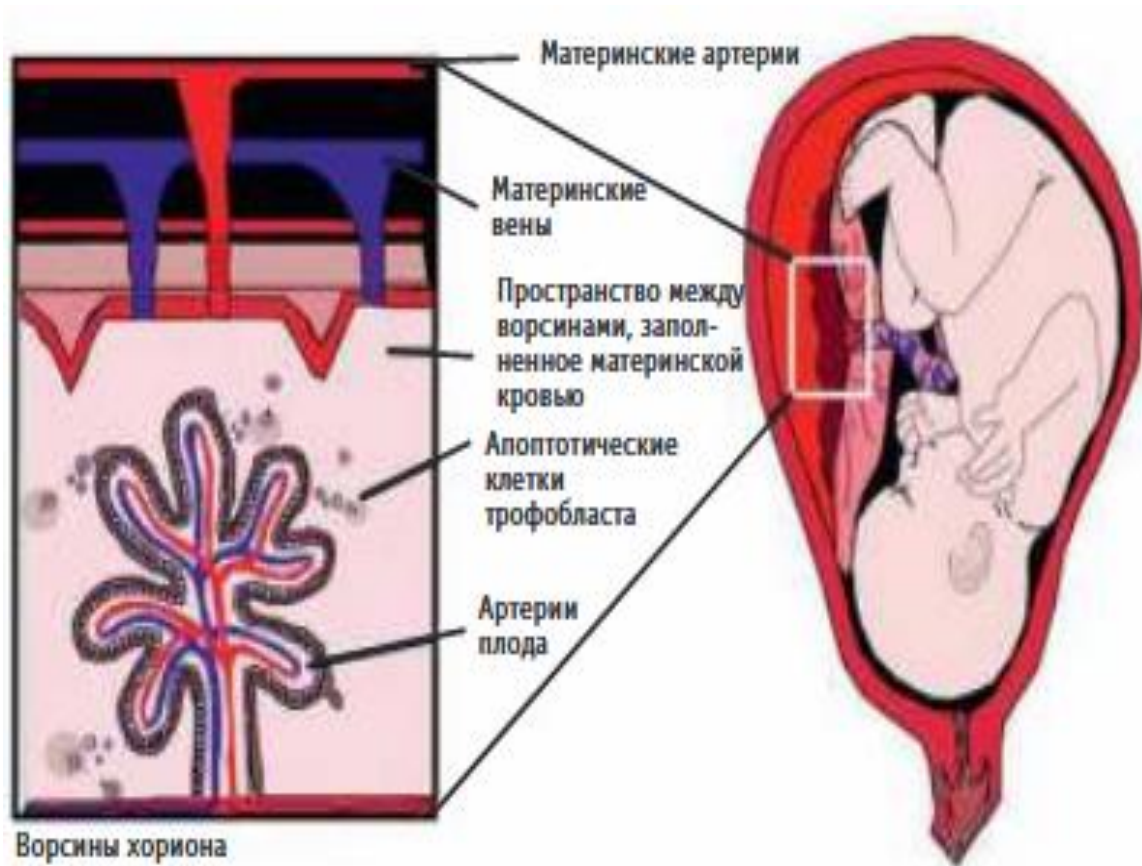


Рисунок 1. Механизм миграции генетического материала плода в кровоток матери

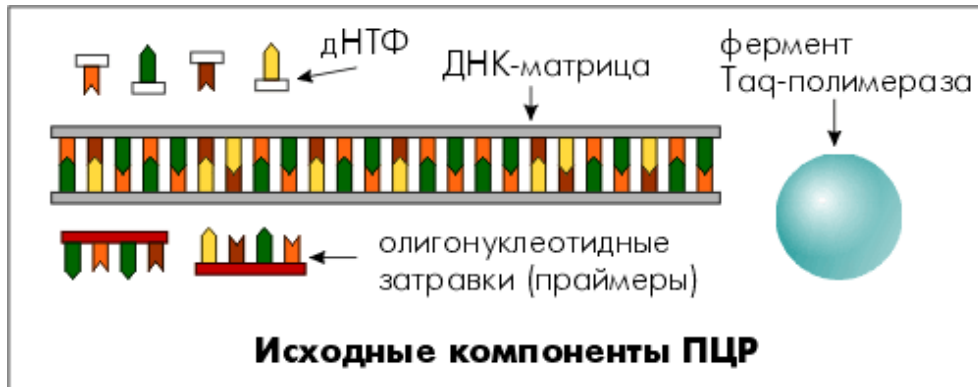
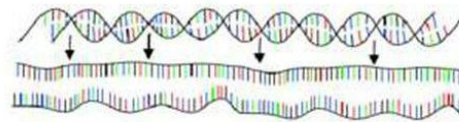
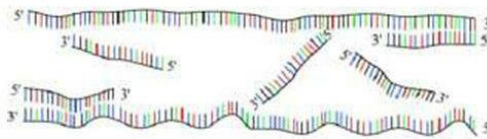


Рисунок.2. Основные компоненты реакционной смеси для ПЦР

Денатурация ДНК
(95°C)



Отжиг праймеров
(55-65°C)



Полимеризация цепей ДНК
(72°C)

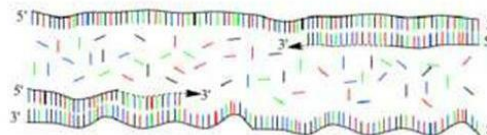


Рисунок 3. Процесс амплификации

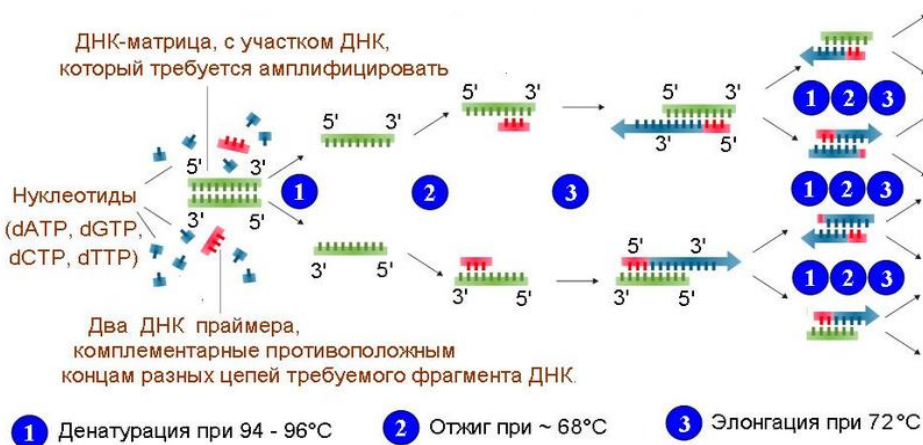


Рисунок 4. Общая схема ПЦР

Приложение №3
Выделение нуклеиновых кислот



Рисунок 5. Наборы производителя



Рисунок 6. Схема выделения

Приложение № 4
Проведение амплификации



Стадия	Температура, С ⁰	Время	Всего циклов
1	95	5 мин	1
2	94	10 сек	50
3	62 [*]	50 сек	

Рисунок 7. Термоциклер, программа амплификации

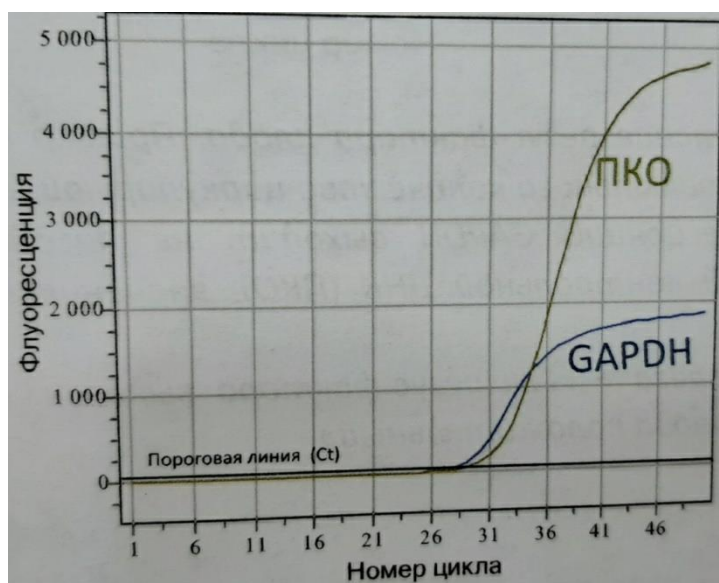


Рисунок 8. Пример кривых флуоресценции хорошего выделения ДНК

Кривая флуоресценции GAPDH выходит раньше порогового цикла положительной контрольной ДНК (ПКО), можно приступать к интерпретации результатов

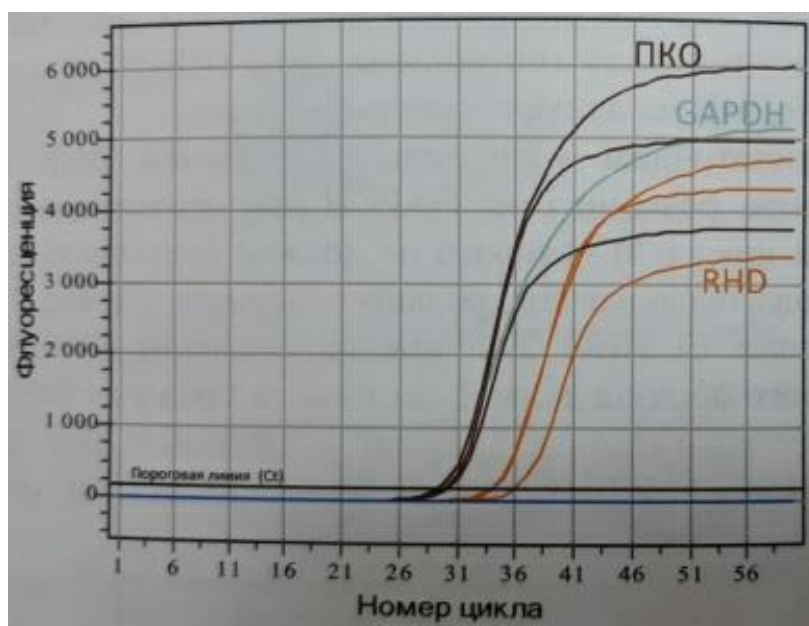


Рисунок 9. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот.

Кривая флуоресценции GAPDH выходит не позднее пороговых циклов положительной контрольной ДНК (ПКО), значение RHD выше порогового уровня. Результат анализа – «Ген резус – фактора выявлен. С вероятностью 99% резус – фактор плода положительный».

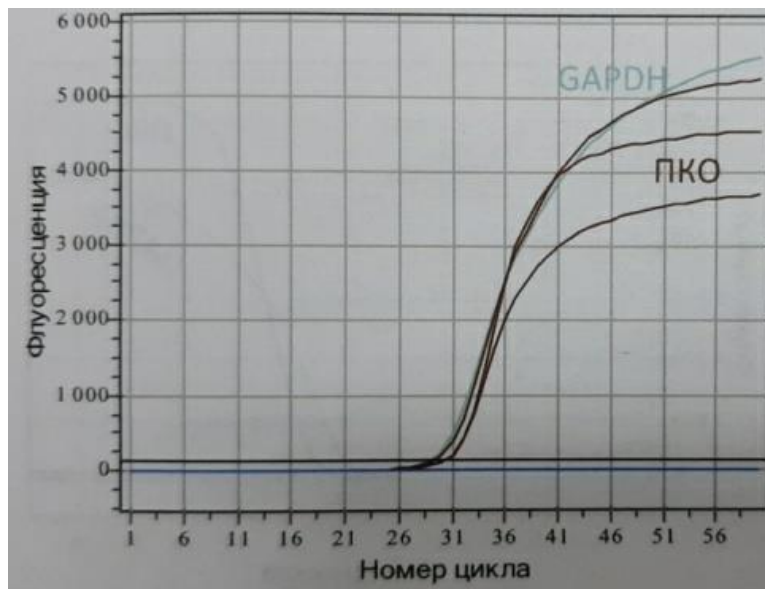


Рисунок 10. Пример кривых флуоресценции для анализа оптимального количества циркулирующих нуклеиновых кислот

Кривая флуоресценции GAPDH выходит не позднее пороговых циклов положительной контрольной ДНК (ПКО), значение RHD ниже порогового уровня. Результат анализа – «Ген резус – фактора не выявлен. С вероятностью 99% резус – фактор отрицательный».

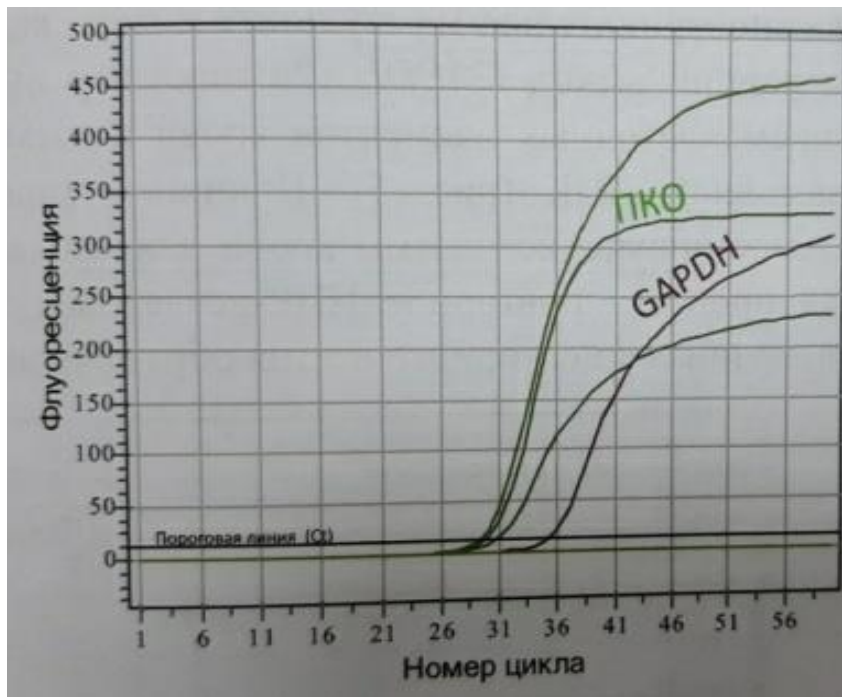


Рисунок 11. Пример кривых флуоресценции для анализа недостаточного количества циркулирующих кислот

Результат анализа невалидный, необходимо повторное выделение ДНК.

Приложение № 6

Документы

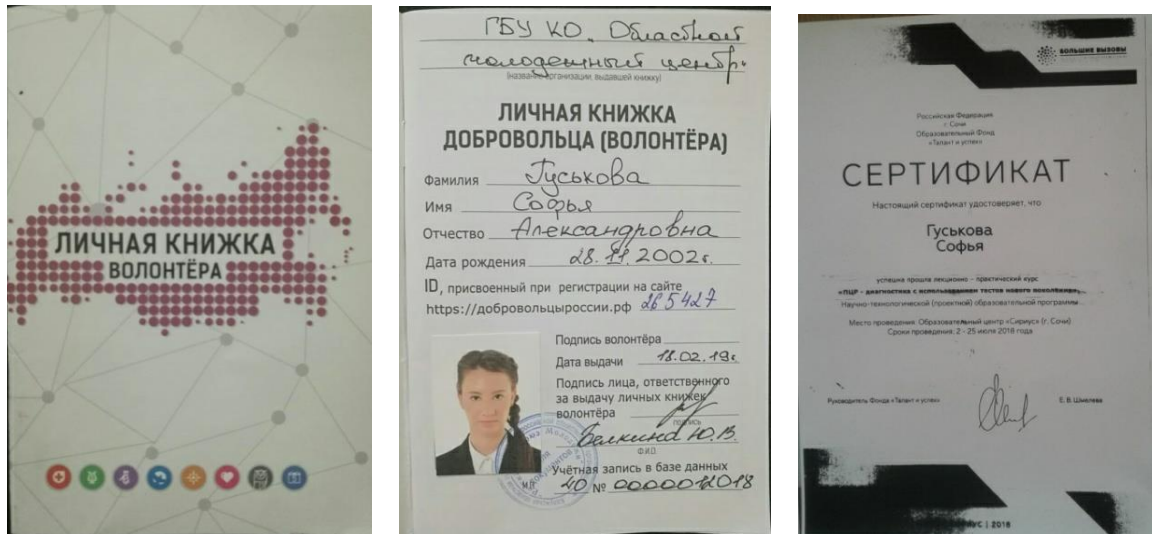


Рисунок 12. Документы для работы в клиничко-диагностической лаборатории

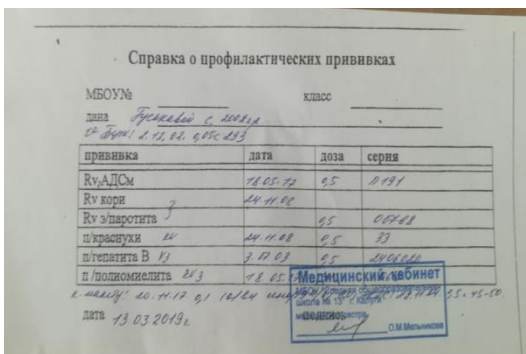


Рисунок 13. Прививочный сертификат

Рисунок 14. Напряженность иммунитета

Приложение № 7

Информированное согласие на проведение лабораторного исследования по определению резус- фактора плода по крови матери.

Я, нижеподписавшаяся,

« ___ » _____ года рождения,

Паспорт _____, Выдан « ___ » _____ г. в соответствии со статьей 20ФЗ от 21. 11. 2011 №323 – ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» настоящим даю информированное добровольное согласие на выполнение лабораторного исследования по определению резус- фактора плода по крови матери в ГБУЗ КО «КОКБ».

Мне, согласно моей воле, в доступной для меня форме даны полные и всесторонние разъяснения цели, методов проведения лабораторных исследований, возможные результаты проведенных исследований.

Я проинформирована медицинским работником

_____ (должность, Ф.И.О. медицинского работника)

о нижеследующем:

1. достоверность определения резус – фактора по крови матери составляет 99%;
2. метод определения резус – фактора основан на выявлении гена RHD в крови резус – беременной (если ген выявлен, делается вывод о резус – положительном плоде, если не выявлен, то о резус – отрицательном);
3. при сроке беременности менее 10 недель при определении резус – фактора, результат исследования (анализ) может являться не достоверным;
4. в случае, если у меня многоплодная беременность, выполненное исследование (анализ) не сможет выявить резус – фактор ребенка.

В процессе изложения информации о предстоящем анализе медицинский работник не приукрашивал их возможностей и не скрывал возможных осложнений и рисков предполагаемых лабораторных исследований. Я, в свою очередь, полно и достоверно изложила врачу информацию о состоянии своего здоровья и сроках беременности.

Я имела возможность задавать любые вопросы и на все вопросы получила исчерпывающие ответы. Мне разъяснена также альтернатива проведения лабораторного исследованием инвазивной методики (кордоцентез) и возможность не прибегать к ним.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

– Получив полную информацию о возможных последствиях и осложнениях связи с проведением лабораторного исследования, я подтверждаю, что мне понятен смысл всех терминов. На меня не оказывалось давление, и я осознанно принимаю решение о проведении лабораторного исследования.

– Подтверждаю, что добровольно предоставляю свой биологический материал, находясь в состоянии беременности, для выполнения указанного лабораторного исследования не в целях прерывания беременности.

Я имела возможность отказаться от проведения указанного лабораторного исследования и всех видов медицинских вмешательств, связанных с проведением указанного лабораторного исследования

Подтверждаю, что результаты анализа не будут использованы мной для принятия решения о прерывании беременности.

Пациент _____
(Ф.И.О. гражданина) (подпись)

Дата « ____ » _____ 20__ г.

Медицинский работник _____
(Ф.И.О медицинского работника, должность) (подпись)

Дата « ____ » _____ 20__ г.