

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

«*Беларусь*» 2016 г.

Регистрационный номер № 164-1115

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА  
СИНДРОМАЛЬНЫХ ФОРМ ГЕНОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА  
НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ  
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ IN SITU ГИБРИДИЗАЦИИ (FISH)

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ: к.б.н. Хурс О.М., к.м.н. Наумчик И.В., к.м.н. Румянцева Н.В.,  
Зобикова О.Л.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярно-цитогенетической диагностики синдромальных форм геномных заболеваний человека, использование которого позволит повысить эффективность диагностики заболеваний, обусловленных микроперестройками хромосом.

### **Область применения**

Инструкция предназначена для врачей-генетиков, врачей лабораторной диагностики, врачей-неврологов, врачей-педиатров, врачей общей практики.

### **Показания к применению**

Наличие врожденного заболевания, проявляющегося комплексом признаков (несколько из перечисленных):

умственная отсталость;

общие расстройства психологического развития;

расстройство развития речи и языка неуточненные;

эмоциональные расстройства и расстройства поведения, начинающиеся обычно в детском и подростковом возрасте;

врожденные аномалии (пороки развития) нервной системы; микроцефалия, другие врожденные аномалии мозга,

судороги неуточненной этиологии;

атаксия неуточненная.

**Противопоказания к применению отсутствуют.**

### **КРИТЕРИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ГРУПП РИСКА**

Врач специалист при наличии вышеуказанных показаний направляет пациента к врачу-генетику. Врач-генетик по результатам клинического осмотра и синдромологического анализа выбирает схему лабораторного обследования пробанда и семьи.

*Синдромы, обусловленные интерстициальными микроделециями (алгоритм №1)*

**Микроделеция 15q11.2q13 (синдром Ангельмана):** выраженная задержка моторного развития, выраженная задержка психического развития/умственная отсталость, отсутствие речи/минимальный словарный запас, микроцефалия, двигательные расстройства (атаксическая походка, тремор конечностей, прерывистые движения), характерное поведение (приступы немотивированного смеха), судорожный синдром, характерные аномалии на электроэнцефалограмме.

**Микроделеция 17p11.2 (синдром Смит-Магенис):** задержка психического развития/умственная отсталость, задержка речевого

развития, характерные лицевые дисморфии, низкорослость, генерализованная мышечная гипотония, расстройства поведения (в том числе агрессия и аутоагрессия), нарушение сна, тугоухость, аномалии опорно-двигательного аппарата (короткие широкие кисти, брахидактилия, выпуклые подушечки пальцев), пороки развития зубов.

*Синдромы, обусловленные субтеломерными микроделециями (алгоритм №2)*

**Микроделеция 1p36 (синдром моносомии 1p36):** задержка психического развития/умственная отсталость, выраженная задержка речевого развития, микроцефалия, характерные лицевые дисморфии, аномалии развития головного мозга, судорожный синдром, аномалии сердечно-сосудистой системы (в т.ч. кардиомиопатия), аномалии зрительного анализатора, тугоухость.

**Микроделеция 4p16.3 (синдром Вольфа-Хиршхорна):** тяжелые пре- и постнатальное отставание физического развития, задержка психо-моторного развития, выраженная задержка речевого развития, микроцефалия, характерные лицевые дисморфии, расщелина губы и неба, судорожный синдром, аномалии зрительного анализатора, множественные ВПР (чаще сердца и почек), аномалии половой системы.

**Микроделеция 17p13.3 (синдром Миллера-Дикера):** микроцефалия, выраженная задержка физического и психо-моторного развития, лиссэнцефалия I типа (классическая), другие аномалии развития головного мозга, характерные лицевые дисморфии.

**АЛГОРИТМЫ ДИАГНОСТИКИ** представлены на рисунках 1 и 2.

*Условные обозначения к схемам алгоритмов:*

КХО – критическая хромосомная область,  
LSI – локуспецифическая ДНК-проба,  
TEL – субтеломерная ДНК-проба,  
p – короткое плечо хромосомы, q – длинное плечо хромосомы,  
МЦИ – молекулярно-цитогенетическое исследование,  
inh – (англ. inherited) унаследованная форма,  
dn – (de novo) спорадическая форма,  
FISH – (англ. fluorescent in situ hybridization) флуоресцентной in situ гибридизация.

**Дополнительные исследования (к алгоритму №1)**

1. В случае обнаружения в кариотипе реципрокной транслокации и наличии сигнала используемой ДНК-пробы на одной из деривативных хромосом (исключена утрата тестируемой области) причиной возникновения характерных клинических признаков у пациента может

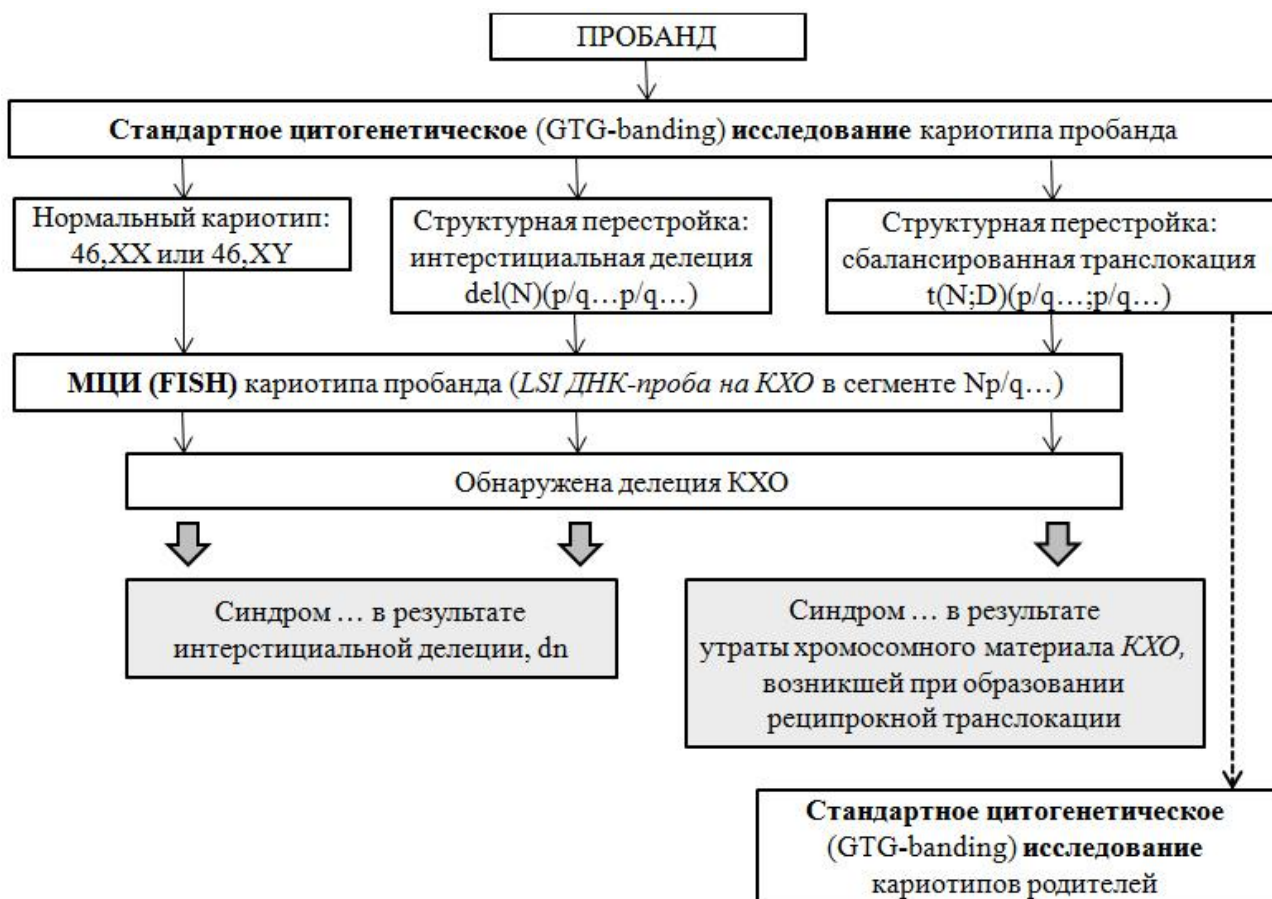
быть «разрыв» одного из генов в пределах КХО. Тестирование такой аномалии требует применения специальных молекулярно-генетических методов.

### Дополнительные исследования (к алгоритму №2)

1. При наличии у пациента ярко выраженной клинической картины, характерной для синдрома моносомии 1p36, и отсутствии делеции локуса, входящего в состав использованной ДНК-пробы, проводится дополнительный анализ FISH с применением другой по локализации ДНК-пробы на хромосомную область 1p36.

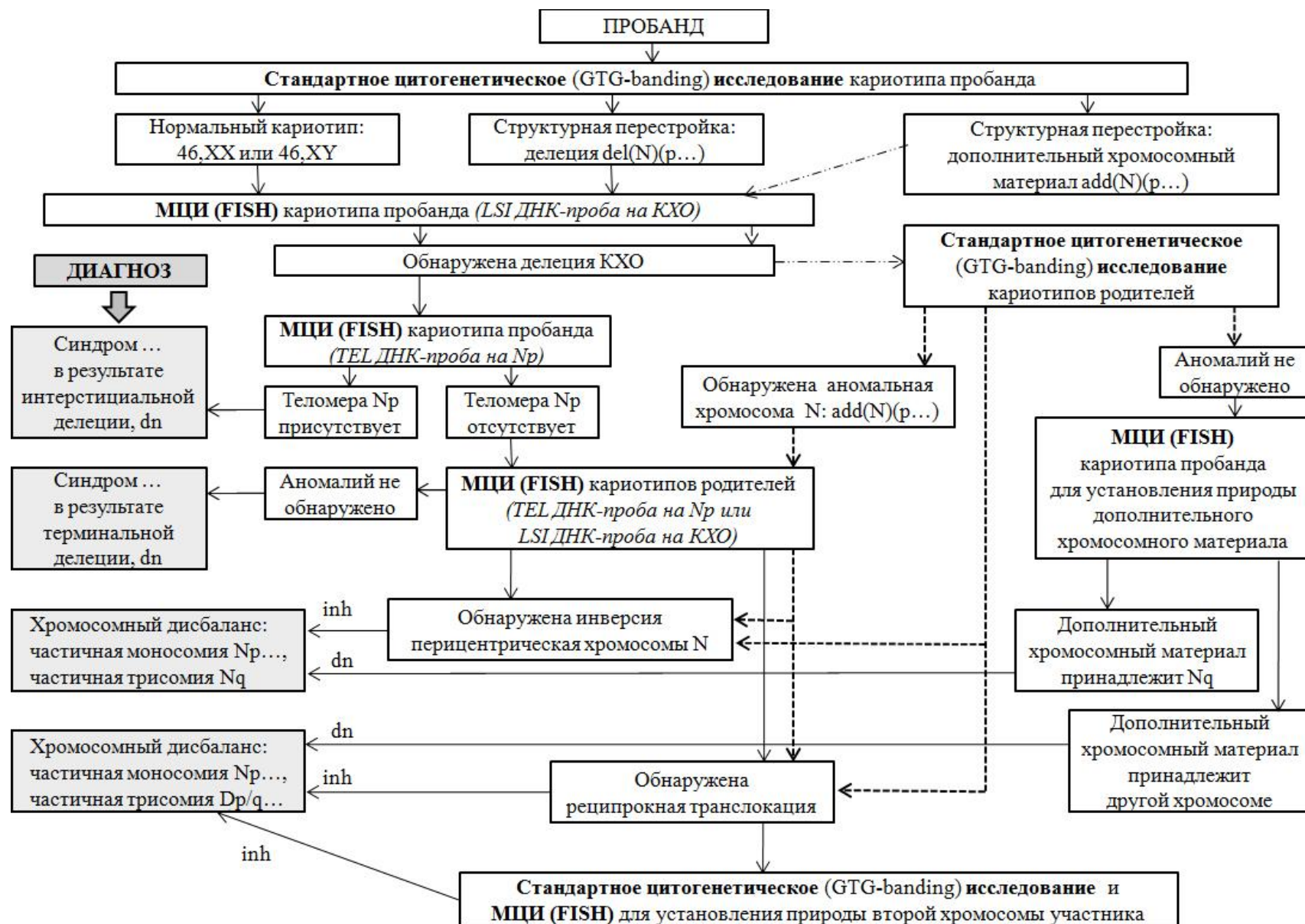
2. При отсутствии в кариотипе пробанда микроделеции 15q11.2q13 лабораторная диагностика должна быть продолжена с целью исключения других генетических причин возникновения синдрома Ангельмана: однородительской дисомии хромосомы 15, мутации в гене UBE3A, мутации в центре импринтинга, спонтанного нарушения метилирования.

3. В случае обнаружения по результатам анализа FISH в кариотипе родителя сбалансированной структурной перестройки дополнительно проводится стандартное цитогенетическое исследование кариотипа.



Примечание – N – номер тестируемой хромосомы: 15 или 17; D – номер хромосомы участника в реципрокной транслокации.

Рисунок 1 – Алгоритм №1 диагностики интерстициальных микроделеций



Примечание – N – номер тестируемой хромосомы: 1 или 4 или 17; D – номер хромосомы участника в реципрокной транслокации.

Рисунок 2 – Алгоритм №2 диагностики субтеломерных микроделечий

## ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Стандартное цитогенетическое исследование

Дифференциальная (GTG-banding) окраска хромосом; анализ выполняется при уровне разрешения 550-650 сегментов на гаплоидный набор.

### Молекулярно-цитогенетическое исследование (метод FISH)

*Биологический материал для исследования.* Используются клетки лимфоцитов периферической крови, буккального эпителия, фибробластов кожи, ворсин хориона, амниотической жидкости.

*Проведение FISH.* Приготовление препаратов хромосом, технология проведения FISH осуществляются в соответствии с инструкцией Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 118-1109 от 12.02.2010.

*Характеристика локуспецифических ДНК-проб, используемых для тестирования наличия/утраты критической хромосомной области:*

1p36: должна иметь в составе ДНК-клоны, локализованные в пределах сегмента 1p36.33,

4p16.3: должна иметь в составе гены *WHSC2* и *WHSC1*,

15q11.2q13: рекомендуется наличие в составе гена *UBE3A*,

17p13.3: должна иметь в составе ген *PAFANI1B1 (LIS1)*,

17p11.2: должна иметь в составе ген *RAI1*.

Для определения природы дополнительного хромосомного материала, выявленного в процессе диагностики, анализ FISH выполняется с использованием необходимых в конкретном случае флуоресцентных ДНК-проб.

*Анализ и оценка результатов гибридизации.* Анализ сигналов на метафазных хромосомах включает просмотр не менее 10 метафаз при отсутствии мозаицизма. Для уточнения мозаичного статуса кариотипа просматривают дополнительно 10 метафаз. Анализ сигналов на интерфазных ядрах включает просмотр не менее 25 клеток. Для уточнения мозаичного статуса кариотипа просматривают 200 интерфаз и более.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТА МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ (FISH)

Кариотип пациента, исследованный с помощью молекулярно-цитогенетического метода FISH, записывают согласно правилам Международной системы номенклатуры хромосом человека (Shaffer L.G. et al. An international system for human cytogenetic nomenclature (ISCN 2013), recommendations of the international standing committee on human cytogenetic nomenclature).

В записи формулы заглавными буквами указывается вид использованной для диагностики ДНК-пробы: название клона или название локуса (согласно Genome Database) или название гена (согласно HUGO-approved nomenclature). В случае наличия в составе ДНК-пробы нескольких локусов, либо использования двух и более ДНК-проб названия тестируемых локусов указываются через запятую без пробелов. Название контрольного локуса в формуле не прописывается.

*Пример 1. Запись результата анализа FISH без предварительного стандартного цитогенетического исследования.*

ish 17p13.3(LIS1×2)

Интерпретация: локус *LIS1* (хромосомная область синдрома Миллера-Дикера) присутствует на обеих гомологичных хромосомах 17.

ish del(17)(p13.3p13.3)(LIS1–)

Интерпретация: локус *LIS1* (хромосомная область синдрома Миллера-Дикера) отсутствует на одной из гомологичных хромосом 17, обнаружена микроделеция тестируемого сегмента p13.3.

*Пример 2. Запись результата анализа FISH с предварительным стандартным цитогенетическим исследованием.*

46,XX.ish 15q11.2(UBE3A×2)

Интерпретация: локус *UBE3A* (хромосомная область синдромов Прадера-Вилли/Ангельмана) присутствует на обеих гомологичных хромосомах 15.

46,XX.ish del(15)(q11.2q11.2)(UBE3A–)

Интерпретация: локус *UBE3A* (хромосомная область синдромов Прадера-Вилли/Ангельмана) отсутствует на одной из гомологичных хромосом 15, обнаружена интерстициальная микроделеция тестируемого сегмента q11.2.

46,XX.ish del(15)(q11.2q12)(UBE3A–,GABRB3–)

Интерпретация: локусы *UBE3A* и *GABRB3* (хромосомная область синдромов Прадера-Вилли/Ангельмана) отсутствуют на одной из гомологичных хромосом 15, обнаружена интерстициальная микроделеция тестируемых сегментов q11.2q12.

46,XX.ish del(15)(q11.2q11.2)(UBE3A–,GABRB3+)

Интерпретация: локус *UBE3A* отсутствует на одной из гомологичных хромосом 15, локус *GABRB3* присутствует на обеих гомологичных хромосомах 15. Установлена интерстициальная микроделеция сегмента q11.2: частичная делеция хромосомной области синдромов Прадера-Вилли/Ангельмана.

46,XX,del(15)(q11.2q13).ish del(15)(q11.2q12)(UBE3A–,GABRB3–)

Интерпретация: цитогенетически установленная делеция сегментов q11.2q13 исследована с помощью ish. Обнаружена делеция локусов *UBE3A* и *GABRB3*, локализованных в хромосомной области синдромов Прадера-Вилли/Ангельмана.

46,XY.ish del(4)(p16.3)(GS10K2/T7-,WHSC1-,WHSC2-)

Интерпретация: локус GS10K2/T7 (4p теломерный регион) и локусы *WHSC1*, *WHSC2* (хромосомная область синдрома Вольфа-Хиршхорна) отсутствуют на одной из гомологичных хромосом 4, обнаружена терминальная микроделеция тестируемого сегмента p16.3.

46,XY.ish del(4)(p16.3p16.3)(GS10K2/T7+,WHSC1-,WHSC2-)

Интерпретация: локус GS10K2/T7 (4p теломерный регион) присутствует на обеих гомологичных хромосомах 4, локусы *WHSC1* и *WHSC2* (хромосомная область синдрома Вольфа-Хиршхорна) отсутствуют на одной из гомологичных хромосом 4, обнаружена интерстициальная микроделеция тестируемого сегмента p16.3.

46,XX.ish t(2;17)(q37;p13.3)(282M15/SP6+,LIS1+,D2S447-,2QTEL47-; D2S447+,2QTEL47+,282M15/SP6-,LIS1-)

Интерпретация: обнаружена криптическая реципрокная транслокация между хромосомами 2 и 17. На деривативной хромосоме 17 отсутствует локус 282M15/SP6 (17p теломерный регион) и локус *LIS1* (хромосомная область синдрома Миллера-Дикера), присутствуют локусы D2S447 и 2QTEL47 (2q теломерный регион). На деривативной хромосоме 2 отсутствуют локусы D2S447 и 2QTEL47, присутствуют локусы 282M15/SP6 и *LIS1*.

46,XX.ish der(17)t(2;17)(q37;p13.3)mat(D2S447+,2QTEL47+, 282M15/SP6-,LIS1-)

Интерпретация: на аномальной хромосоме 17 отсутствует локус 282M15/SP6 (17p теломерный регион) и локус *LIS1* (хромосомная область синдрома Миллера-Дикера), присутствуют локусы D2S447 и 2QTEL47 (2q теломерный регион). Хромосома является деривативной, унаследована от матери-носительницы реципрокной транслокации t(2;17).

46,XY.ish inv(4)(p36)(D4S2930+,GS10K2/T7-,WHSC1-,WHSC2-)(q35)(GS10K2/T7+,WHSC1+,WHSC2+,D4S2930-)

Интерпретация: обнаружена криптическая перичентрическая инверсия хромосомы 4. На p-плече присутствует локус D4S2930 (4q теломерный регион), отсутствуют локус GS10K2/T7 (4p теломерный регион) и локусы *WHSC1*, *WHSC2* (хромосомная область синдрома Вольфа-Хиршхорна), на q-плече присутствуют локусы GS10K2/T7, *WHSC1*, *WHSC2*, отсутствует локус D4S2930.

46,XY.ish rec(4)dup(4q)inv(4)(p36)(D4S2930+,GS10K2/T7-,WHSC1-, WHSC2-)(q35)(D4S2930+)pat



Интерпретация: на р-плече аномальной хромосомы 4 отсутствуют локус GS10K2/T7 (4p теломерный регион) и локусы WHSC1, WHSC2 (хромосомная область синдрома Вольфа-Хиршхорна), присутствует локус D4S2930 (4q теломерный регион), на q-плече присутствует локус D4S2930. Хромосома является рекомбинантной, унаследована от отца-носителя перичентрической инверсии inv(4)(p36q35).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ДИАГНОСТИКИ

Установленный тип хромосомной аномалии, которая привела к утрате КХО, является основой для формулировки диагноза врачом специалистом.

1. При обнаружении в кариотипе пациента интерстициальной или терминальной микроделеции КХО устанавливается диагноз соответствующего синдрома.

*Пример 1. Для синдромов, обусловленных интерстициальными делециями.*

46,XX,del(17)(p11.2p11.2)

Диагноз: синдром Смит-Магенис, спорадическая форма в результате интерстициальной микроделеции (МКБ10 Q93.8).

46,XY,del(15)(q11.2q11.2)

Диагноз: синдром Ангельмана, спорадическая форма в результате интерстициальной микроделеции (МКБ10 Q93.8).

*Пример 2. Для синдромов, обусловленных интерстициальными или терминальными делециями.*

46,XX,del(1)(p36) или 46,XX,del(1)(p36p36)

Диагноз: синдром моносомии 1p36, спорадическая форма в результате терминальной (или интерстициальной) микроделеции (МКБ10 Q93.8).

46,XY,del(4)(p16.3) или 46,XY,del(4)(p16.3p16.3)

Диагноз: синдром Вольфа-Хиршхорна, спорадическая форма в результате терминальной (или интерстициальной) микроделеции (МКБ10 Q93.3).

46,XX,del(17)(p13.3) или 46,XX,del(17)(p13.3p13.3)

Диагноз: синдром Миллера-Дикера, спорадическая форма в результате терминальной (или интерстициальной) микроделеции (МКБ10 Q93.8).

2. При обнаружении в кариотипе пациента деривативной/рекомбинантной хромосомы с моносомией тестируемой КХО устанавливается диагноз «Хромосомная болезнь: расшифровка хромосомного дисбаланса» (МКБ10 Q99.8 для всех случаев).

*Пример 1. При наличии соответствующей реципрокной транслокации/перичентрической инверсии в кариотипе родителя.*

46,XX,der(17)t(2;17)(q37;p13.3)mat

Диагноз: Хромосомная болезнь, унаследованная форма: частичная моносомия 17p13.3 (синдром Миллера-Дикера), частичная трисомия 2q37 (МКБ10 Q99.8).

46,XY,rec(4)dup(4q)inv(4)(p36q35)pat

Диагноз: Хромосомная болезнь, унаследованная форма: частичная моносомия 4p36 (синдром Вольфа-Хиршхорна), частичная трисомия 4q35 (МКБ10 Q99.8).

*Пример 2. При нормальных кариотипах родителей.*

46,XX,der(1)t(1;10)(p36;q26.3)dn

Диагноз: Хромосомная болезнь, спорадическая форма: частичная моносомия 1p36 (синдром моносомии 1p36), частичная трисомия 10q26.3 (МКБ10 Q99.8).

46,XY,rec(17)dup(17q)inv(17)(p13.3q25)dn

Диагноз: Хромосомная болезнь, спорадическая форма: частичная моносомия 17p13.3 (синдром Миллера-Дикера), частичная трисомия 17q25 (МКБ10 Q99.8).

### **Перечень возможных осложнений или ошибок и пути их устранения**

1. При отсутствии на препарате гибридизации флуоресцентной ДНК-пробы (отсутствие четкого флуоресцентного сигнала контрольного и тестируемого участков) следует изменить температуру денатурации ДНК-пробы либо температуру денатурации препарата хромосом (при использовании отдельной денатурации), либо температуру коденатурации. Температура подбирается экспериментально.

2. В случае отсутствия на значительном количестве метафаз четкого флуоресцентного сигнала тестируемой области или контрольного участка или совместно тестируемого и контрольного сегментов следует повторить анализ для получения четкого результата.