

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Кошечкин С.И.<sup>3</sup>, Шевченко Г.В.<sup>1</sup>, Марданлы С.Г.<sup>4,5</sup>, Дёмкин В.В.<sup>1,2</sup>

### ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРА Y-ХРОМОСОМЫ В ПЛАЗМЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ: ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТОЧНОСТЬ НА РАЗНЫХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

<sup>1</sup>ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ООО «НаноДиагностика», 123182, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ООО «Кномикс», 121069, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ГОУ ВО МО Государственный гуманитарно-технологический университет, 142611, г. Орехово-Зуево, Московская область, Россия;

<sup>5</sup>ЗАО «ЭКОлаб» 142530, г. Электрогорск, Московская область, Россия

Проведена оценка клинической информативности теста на выявление маркера Y-хромосомы в плазме беременной женщины на разных сроках беременности методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Исследованы образцы крови 4616 женщин на сроках беременности от 4 до 32 эмбриональных недель. Детекцию маркера Y-хромосомы проводили на основе амплификации участка гена TSPY. Маркер Y-хромосомы однозначно выявлен в 2131 образце, что составило 46,2% от общего числа проанализированных проб. В 233 образцах (5%) маркер Y-хромосомы выявлен с пониженной достоверностью, в 15 образцах (0,3%) при первичном исследовании однозначного заключения о наличии или отсутствии в плазме Y-специфичной ДНК сделать не удалось. Диагностическая точность определения маркера Y-хромосомы в плазме женщины на 4-6-й эмбриональной неделе беременности составляла 95,5%, с 7-й недели и на более поздних сроках беременности диагностическая точность достигала 97,3-98,2%. Тестирование с 7-й недели эмбрионального развития может рекомендоваться для надёжного пренатального определения пола плода по результатам анализа внеклеточной циркулирующей фетальной ДНК методом ПЦР-РВ.

**Ключевые слова:** неинвазивное пренатальное тестирование; внеклеточная циркулирующая фетальная ДНК; определение пола плода; ПЦР в реальном времени.

**Для цитирования:** Кошечкин С.И., Шевченко Г.В., Марданлы С.Г., Демкин В.В. Выявление маркера Y-хромосомы в плазме беременных женщин методом ПЦР в реальном времени: диагностическая точность на разных сроках беременности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 423-428. DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-423-428

**Для корреспонденции:** Демкин Владимир Витальевич, канд.мед. наук, рук. Центра клеточных и геномных технологий; e-mail: vdemkin@img.ras.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарность.** Наборы для амплификации генов TSPY, GAPDH и BIRC5 предоставлены ООО «НаноДиагностика» на безвозмездной основе.

Поступила 22.04.2022

Принята к печати 20.05.2022

Опубликовано 18.07.2022

*Koshechkin S.I.<sup>3</sup>, Shevchenko G.V.<sup>1</sup>, Mardanly S.G.<sup>4,5</sup>, Demkin V.V.<sup>1,2</sup>*

DETECTION OF Y-CHROMOSOME MARKER IN PLASMA OF PREGNANT WOMEN USING REAL TIME PCR: DIAGNOSTIC ACCURACY DEPENDING ON GESTATION AGE

<sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics of National Research Centre «Kurchatov Institute», 123182, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>NanoDiagnostics LLC., 123182, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Knomx LLC, 121069, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>State educational institution of higher education of the Moscow region, State Humanitarian University of Technology «GGTU», 142611, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russia;

<sup>5</sup>CJSC «EKOlab», 142530, Elektrogorsk, Moscow region, Russia

*The evaluation of the clinical significance of the test for the detection of the Y-chromosome marker in the plasma of a pregnant woman at different stages of pregnancy by real-time PCR was carried out. The blood samples of 4616 women at 4 to 32 gestation weeks were studied. Identification of the Y-chromosome marker was carried out based on the amplification of a region of the TSPY gene. The Y-chromosome marker was unambiguously identified in 2131 samples, which accounted for 46.2% of the total number of analyzed samples. In 233 samples (5%), the Y-chromosome marker was detected with reduced reliability, and in 15 samples (0.3%), an unambiguous conclusion about the presence or absence of Y-specific DNA in plasma could not be made during the initial study. The diagnostic accuracy of the Y-chromosome marker determination in the plasma of a pregnant woman at the 4-6th gestation week was 95.5%, and from the 7th week and at later stages of pregnancy it reached 97.3-98.2%. Testing from the 7th gestation week may be recommended for reliable prenatal sex determination of the fetus by real-time PCR analysis of extracellular circulating fetal DNA.*

**Key words:** non-invasive prenatal testing (NIPT); cell free fetal DNA (cffDNA), fetal sex determination, qPCR.

**For citation:** Koshechkin S.I., Shevchenko G.V., Mardanly S.G., Demkin V.V. Detection of Y-chromosome marker in plasma of pregnant women using real time PCR: diagnostic accuracy depending on gestation age. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): (in Russ). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-423-428>

**For correspondence:** Demkin V.V., PhD, Head of the Center of Cellular and Gene Technology; e-mail: [vdemkin@img.ras.ru](mailto:vdemkin@img.ras.ru)

**Information about authors:**

Koshechkin S.I., <https://orcid.org/0000-0002-7389-0476>;  
Shevchenko G.V., <https://orcid.org/0000-0002-1293-1078>;  
Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;  
Demkin V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3408-6100>.

**Acknowledgment.** Kits for amplification of *TSPY*, *GAPDH* and *BIRC5* genes were provided by NanoDiagnostics LLC free of charge.

**Financing.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

Received 22.04.2022

Accepted 20.05.2022

Published 18.07.2022

**Введение.** Раннее определение пола ребёнка при беременности имеет важное социальное и медицинское значение. Показания для определения пола плода связаны с риском развития заболеваний, сцепленных с полом: мышечная дистрофия Дюшенна и Беккера, гемофилия, синдром хрупкой X-хромосомы (синдром Мартина-Белла), других врождённых генетических дефектов (врождённая гиперплазия надпочечников), аномалий, связанных с неоднородным развитием наружных половых органов в семейном анамнезе и др.

Основным методом пренатальной диагностики пола в медицинской практике является метод ультразвукового исследования (УЗИ), но он эффективен лишь во втором и третьем триместрах беременности, поскольку наружные половые органы дифференцируются только к концу первого триместра [1, 2]. В последние годы определение пола плода стало возможным в рамках проведения неинвазивного пренатального теста (НИПТ), который проводится на основе анализа материнской крови методом секвенирования и нацелен на выявление трисомий 13, 18, 21 хромосом. При проведении НИПТ с 10-й недели беременности тест обладает высокой точностью, но относительно дорог, и выполняется в течение достаточно длительного времени (от 10 до 30 дней). Альтернативой НИПТ на основе секвенирования по определению пола плода может служить метод ПЦР. Тест на наличие в крови беременной женщины Y-хромосомы методом ПЦР быстр, точен и относительно недорог.

Предпосылкой для бурного развития методов генетического неинвазивного пренатального тестирования стало открытие в 1997 г. в крови беременной женщины внеклеточной ДНК плодного происхождения [3]. Основным источником циркулирующей внеклеточной фетальной ДНК (вкфДНК) является трофобласт, который высвобождает ДНК в систему кровообращения матери в результате апоптоза [4, 5]. ВкфДНК может быть обнаружена уже на 4-5-й неделе беременности, т. е. ещё до установления собственного кровообращения плода [6, 7], и исчезает из кровотока матери уже через несколько часов после родов [8, 9]. НИПТ по фетальной ДНК в крови беременной женщины открыл возможность к выявлению анеуплоидий и других генетических дефектов плода, включая отдельные мутации [10], к раннему определению пола и резус-фактора плода [11].

Для определения пола плода методом ПЦР в качестве маркёров Y-хромосомы используются в основном два вида мишеней: однокопийный ген *SRY* и мультикопий-

ный ген *TSPY (DYS14)* [12, 13]. Несколько протоколов определения маркёров Y-хромосомы с использованием метода ПЦР прошли испытания и стали клинически доступны во многих странах, чему способствовали многочисленные публикации и обзоры, посвящённые анализу результативности различных методик в зарубежной научной литературе [12-14]. Оценка эффективности определения пола плода методом ПЦР-анализа вкфДНК показала, что среднестатистическая чувствительность и специфичность метода являются высокими (95,5-96% и 98,6-99%, для методик с использованием маркёров на гены *SRY* и *TSPY*, соответственно). Эти показатели в различных работах могут иметь достаточно широкий разброс: по чувствительности от 65% до 100%, по специфичности от 73% до 100% [12-14]. Неоднородность результатов может быть обусловлена как особенностями методики, применяемой каждой группой исследователей, так и, что представляется наиболее вероятным, различными сроками проведения тестирования, представленными в выборках.

Фетальная ДНК появляется в кровотоке матери уже с 4-й недели эмбрионального развития, но на столь раннем сроке существует риск получения ложноотрицательного результата из-за низкого содержания фетальной ДНК в крови матери. К 7-й неделе содержание вкфДНК возрастает до 3-4%, а к 10-11 неделе достигает 10% от всей ДНК в плазме беременной женщины [6, 15].

В России определение пола плода по вкфДНК в крови беременной женщины предлагают многие клиники и лаборатории. Существуют и отечественные коммерческие тест-системы для определения маркёра Y-хромосомы методом ПЦР [16]. Заявленные сроки проведения анализа и его диагностическая точность в каждом отдельном случае сильно разнятся. Чаще всего предлагается проводить тестирование на 10-11 неделе беременности, но есть и предложения провести высокоточное исследование (98%) на 5-6 или 6-7 неделе.

Цель исследования – оценка на разных сроках беременности клинической эффективности теста на выявление маркёра Y-хромосомы по гену *TSPY* в плазме крови беременной женщины методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

**Материал и методы.** Исследованы образцы плазмы крови, взятые у 4616 беременных женщин с одноплодной беременностью. Все женщины подписывали информированное согласие перед выполнением исследований. Срок беременности определяли на основании данных

УЗИ, либо по первому дню последней менструации (далее эмбриональный и акушерский сроки, соответственно). Для женщин, у которых заявлен только акушерский срок, эмбриональный определяли путём вычитания 2-х недель от акушерского. Распределение обследованных женщин по срокам беременности приведено в табл. 1. Минимальный эмбриональный срок беременности составлял 4 нед, максимальный – 32 недели.

Взятие образцов венозной крови проводили с использованием вакуумных пробирок с Na<sub>2</sub>ЭДТА, объёмом 5-6 мл. Плазму крови отделяли от форменных элементов путём центрифугирования при 3000 г в течение 10 мин, плазму крови переносили в стерильные микропробирки объёмом 1,5 мл. Отделение плазмы крови производили не позднее, чем через 24 час от момента взятия крови с целью сокращения доли материнской геномной ДНК, высвобождающейся из клеток в результате спонтанного лизиса. Полученные образцы плазмы крови дополнительно центрифугировали при 13000 г в течение 3 мин, 0,5 мл полученного супернатанта использовали для выделения вкфДНК.

Выделение вкфДНК проводили с использованием набора «Рибосорб» (Интерлабсервис, Москва) в соответствии с инструкцией производителя с небольшими отступлениями: вместо стандартных 100 мкл для выделения использовали 500 мкл плазмы крови, финальную экстракцию ДНК проводили в 80 мкл Н<sub>2</sub>О.

Выделенную ДНК анализировали методом ПЦР-РВ с использованием набора для амплификации участка гена *TSPY* (ООО «Нанодиагностика», Россия). Прохождение реакции регистрировали по расщеплению Taqman-зонда, меченного флуоресцентным красителем. Общий объём реакционной смеси составлял 30 мкл, из которых 5 мкл составляла проба. Эффективность амплификации гена *TSPY* составляла 95%, предел чувствительности – 60 копий/мкл. Качество выделения ДНК контролировали методом ПЦР-РВ по амплификации генов *GAPDH* или *BIRC5* с использованием наборов ООО «Нанодиагностика». Для повышения достоверности амплификацию каждого маркера проводили в нескольких повторах: *TSPY* – в 4-х, *GAPDH* и *BIRC5* – в 2-х повторностях. Помимо тестируемых образцов, в каждую постановку включали положительный и отрицательный контроли ПЦР и отрицательный контроль выделения ДНК, для исключения ложноположительных результатов, вызванных контаминацией растворов.

ПЦР проводили в амплификаторах Bio-Rad CFX96 (США). Режим амплификации: предварительный прогрев при 95° С 10 мин; 50 циклов со следующими характеристиками: 95° С – 10 с, 60° С – 20 с, 72° С – 10 с; фиксацию уровня флуоресценции производили при 60° С.

Результаты ПЦР классифицировали по трём категориям: женский пол плода, мужской пол плода, мужской пол плода с пониженной достоверностью. Заключение о женском поле плода принималось только в случае отсутствия амплификации гена *TSPY* по крайней мере в двух из 4-х повторах реакции (см.рисунок, а). Пол плода признавали мужским, если во всех повторах реакции для данного образца кривые амплификации гена *TSPY* имели сходную динамику нарастания флуоресцентного сигнала, превышающего пороговый уровень не позднее 38 цикла (см.рисунок, б). Если кривые амплификации гена *TSPY* для одного образца воспроизводились во всех или большинстве репликах реакции, но в разных репликах демонстрировали различную динамику: поздние *St*,

различные *St* в разных репликах, низкую и разную интенсивность разгорания, то пробу относили к категории «мужской пол с пониженной достоверностью» (см.рисунок, в), т. к. амплификационные кривые в таких паттернах по времени появления и по динамике разгорания похожи на контаминационные сигналы. Если амплификационные кривые имели очень поздние *St* со значительными различиями в динамике разгорания в повторах, то пол плода считали неопределённым (см.рисунок, г) и проводили повторное исследование.

Для 1680 женщин результаты молекулярного анализа сравнивали с данными УЗИ обследования на 20-22-й неделе беременности. Для 378 женщин результаты ПЦР тестирования сравнили с анатомической идентификацией пола ребёнка после родов. По результатам верификации рассчитаны чувствительность, специфичность, диагностическая точность, положительная и отрицательная прогностические ценности (positive predictive value, negative predictive value) метода.

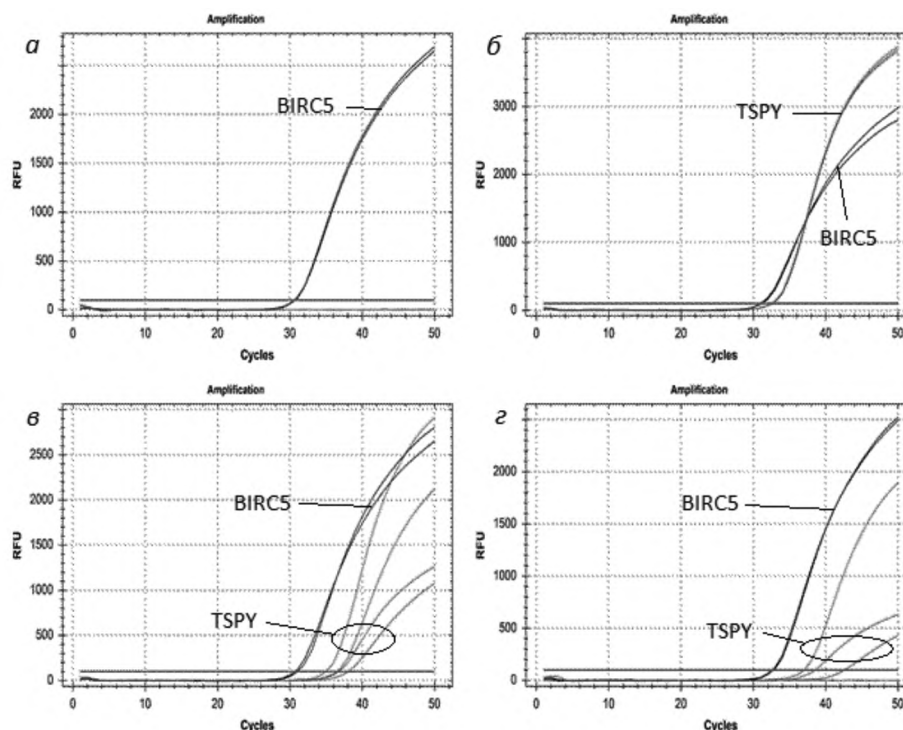
**Результаты и обсуждение.** Маркер Y-хромосомы однозначно выявлен в 2131 образце (табл. 2), что составило 46,2% от общего числа проанализированных проб. С пониженной достоверностью маркер Y-хромосомы выявлен в 233 образцах (5%), в 15 образцах (0,3%) при первом исследовании однозначного заключения о наличии или отсутствии в плазме Y-специфичной ДНК сделать не удалось.

Если исключить результаты проб на сроках менее 5 недель, когда вкфДНК может ещё не появиться в крови женщины, то статистика выявления Y-специфичной ДНК в зависимости от срока беременности, на котором выполнялся анализ, демонстрирует определённые закономерности: доля анализов с однозначно выявленным *TSPY*-маркером растёт от 27% при 4-5-ти недельной беременности и достигает максимума 48-49% к 8-й неделе беременности, и далее держится на этом уровне; доля результатов с выявленным Y-специфичным маркером с пониженной достоверностью, напротив, уменьшается с 10 до 1-1,5% в тех же диапазонах сроков беременности (табл. 2). Если сложить число проб, классифицированных как «мужские» и «мужские с пониженной достоверностью», то в сумме они дают показатель, близкий к 50% во всем диапазоне проанализированных сроков беременности, что свидетельствует, что пробы с нестабильными Y-специфичными сигналами, как правило, могут интерпретироваться в пользу мужского пола, однако интерпретация результатов с пониженной достоверностью для индивидуальной женщины имеет повышенный риск неверного определения пола плода.

Таблица 1

Количество обследованных женщин на разных сроках беременности

Эмбриональный срок (нед)	Число женщин
4-6	338
6-8	1772
8-12	2193
12-25	305
26-32	8
Всего	4616



Кривые амплификации генов *TSPY* и *BIRC5*.

*a* – женский пол плода; *б* – мужской пол плода; *в* – мужской пол плода с пониженной достоверностью; *г* – пол плода не определён.

Таблица 2

**Определение пола на основе выявления маркера *TSPY* на разных сроках беременности**

Число женщин	Эмбриональный срок (нед)	Y <sup>+</sup> (в %)	Y <sup>+</sup> с пониженной достоверностью (в %)	Результат не определён (в %)
4616	4-35	46,2	5,0	0,3
В том числе:				
37	4-5	27,0	5,4	0
835	5-6	38,4	10,4	0,5
1562	6-7	44,8	7,7	0,3
1360	7-8	48,5	3,2	0,2
1699	8-9	49,0	1,4	0,1
886	9-10	48,8	0,9	0,2
517	10-12	49,9	1,2	0,8
311	12-32	47,3	0,6	1,0

**Примечание.** Пробы, попадающие в пограничные сроки беременности, включены в состав обеих соседних выборок.

Для 316 женщин (в основном на сроках беременности до 10 нед) исследование проводили повторно с независимым забором крови через 5-10 дней. Повторное исследование на сроках беременности более 7 недель в подавляющем числе случаев подтверждало первоначальный результат, но в одном случае позволило выявить техническую ошибку, допущенную при первичном исследовании. На сроках беременности до 7 недель повторный анализ позволял снять сомнения, возникающие при получении нестабильных Y-специфичных сигналов.

Наиболее ранние сроки, на которых у женщин выявляли Y-специфичную вкфДНК, – 4 эмбриональные недели (см. табл. 2), что соответствует данным литературы

[6]. Учитывая статистику положительных результатов «с пониженной достоверностью», нельзя исключать получение ложноотрицательных результатов в силу как индивидуальных особенностей развития нормальной беременности, так и отклонения от нормального протекания беременности, например, задержка развития плода, нарушение кровоснабжения плаценты и т. д., которые могут приводить к смещению времени появления и к изменению концентрации вкфДНК в кровотоке [6, 7]. На практике следует учитывать и повышенную погрешность в определении начала беременности при сроках менее 7 нед, что в случае его ошибочного завышения может привести к ложноотрицательным результатам.

Минимальным сроком беременности, на котором рационально проводить определение пола плода, следует признать срок после 7 эмбриональных недель беременности.

С технической точки зрения анализ циркулирующей вкфДНК характеризуется гиперчувствительностью вследствие работы с крайне низкими концентрациями мишени. В сочетании с высокой чувствительностью метода ПЦР это существенно увеличивает риск получения ложноположительных результатов по причине контаминации. Кривые амплификации контаминационных сигналов обладают поздним Ct и не воспроизводятся при повторном исследовании. Единичные всплески контаминационных кривых встречались регулярно, несмотря на строгое соблюдение правил технологического регламента, направленных на предотвращение молекулярной контаминации. Такие спорадические артефакты относительно легко идентифицировались при тестировании проб в нескольких повторах. В нашей практике маркер *TSPY* сначала диагностировали в 5 повторах, затем, в результате совершенствования организации диагностического процесса, их количество сокращено до четырёх. Дальнейшее сокращение числа повторов, по нашему мнению, привело бы к увеличению доли результатов «с пониженной достоверностью». Дифференцировать контаминационные сигналы от истинных особенно важно на ранних сроках беременности, так как из-за крайне низкой концентрации ДНК мишени они могут совпадать по Ct.

Сопоставление результатов ПЦР-тестирования с результатами родов выявило 8 случаев несовпадений (табл. 3). Несовпадения в равной степени касались как выявления, так и невыявления маркера Y-хромосомы, но если на сроках до 6 недель несовпадения приходились на невыявление маркера, и могут быть объяснены недостаточной концентрацией вкфДНК, то после 6 недель преобладали несовпадения, вызванные ошибочным выявлением маркера, что может быть вызвано контаминацией.

Отмечено 8 случаев несовпадения результатов ПЦР-тестирования с результатами ультразвукового обследования (УЗИ), проводимого на более поздних сроках (табл. 3). В 5-ти случаях родоразрешение подтвердило заключение генетического анализа, в двух случаях результаты родоразрешения остались неизвестными из-за утраты связи с пациенткой. В одном случае ошибочным оказался результат генетического анализа. Повторное

исследование спорной плазмы крови, хранившейся в архиве при  $-45^{\circ}\text{C}$ , показал несовпадение с результатом первого анализа, что свидетельствует о технической ошибке, допущенной при выполнении первого анализа. Более точное определение пола плода методом ПЦР по сравнению с УЗИ не является неожиданностью, поскольку правильность ультразвуковой диагностики существенно зависит от предлежания плода, применяемой аппаратуры и квалификации врача.

Рассматривая случаи несоответствия результатов ПЦР-тестирования, данных УЗИ и послеродового фенотипа ребёнка помимо ошибок диагностического процесса нельзя исключить случаи, связанные с нарушением половой дифференциации (НПД, disorders of sex development, DSDs), которые могут проявляться на хромосомном, гонадном и анатомическом уровнях [17, 18]. В частности, документированы люди с мужскими наружными половыми органами, имеющие кариотип 46, XX [19-22] и люди с кариотипом 46, XY и с женскими половыми органами [23-24].

По некоторым оценкам синдром 46, XX НПД встречается с частотой 1:20000 новорожденных мальчиков [25] с различными клиническими проявлениями: неоднозначные мужские наружные гениталии, бесплодие или гипогонадизм; синдром 46, XY НПД встречается с частотой 6,4:100 000 новорожденных девочек [23].

Рассчитанные на основании полученных данных аналитические показатели использованной методики определения пола плода приведены в табл. 4. Расчёт чувствительности и специфичности для разных сроков беременности показывает, что на сроках до 6 недель снижена чувствительность (93,1% по сравнению с 97,6-100% для более поздних сроков) и отрицательная прогностическая ценность (90,9% по сравнению с 97-100% для более поздних сроков). Полученные показатели чувствительности и специфичности определения пола плода для сроков от 7 недель соответствуют наивысшим показателям, описанным в литературе различными авторами [12-15].

**Заключение.** ПЦР-РВ позволяет определять маркер Y-хромосомы во многих случаях уже на 5-6 й неделе беременности, но из-за проблем спонтанной контаминации или возможного нарушения нормального протекания беременности клиническая чувствительность и отрицательная прогностическая ценность теста на этих сроках снижена. Начиная с 7-й эмбриональной недели беременности чувствительность метода превышает

Таблица 3

Результаты пренатального ПЦР-анализа и послеродового определения пола

Число опрошенных женщин	Срок беременности эмбриональный (нед)	Выявлен маркер Y	Всего несовпадений (n)	Несовпадений с данными родов (n)	Несовпадений в результате технических ошибок* (n)	Несовпадений среди выявленных (n)	Несовпадений среди невыявленных (n)
450	4-28	244	11	8	3	6	5
В том числе:							
44	4-6	27	2	1	1	0	2
217	6,5-8,5	119	4	3	1	3	1
150	9-12	78	4	3	1	2	2
39	13-28	20	1	1	0	1	0

**Примечание.** \* – Несовпадение имело место только при первичном ПЦР анализе; при повторном анализе того же образца результаты ПЦР анализа совпали с фенотипом пола после родов.

97,6%, хотя и более поздние сроки не гарантируют 100% совпадения результатов генетического анализа с фенотипической дифференциацией половых органов. Повторное определение пола плода с независимым забором крови с интервалом в несколько дней увеличивает диагностическую точность теста методом ПЦР практически до 100%, сводя к минимуму возможность ошибок.

Наиболее ранний срок беременности, позволяющий получить результат с высокой диагностической точностью, является 7-я неделя эмбрионального развития.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 5-14, 17-25  
см. REFERENCES)

4. Брызгунова О.Е., Лактионов П.П. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции. *Биомедицинская химия*. 2015; 61(4): 409-26.
15. Веропотвелян Н. П., Погуляй Ю.С. Неинвазивная пренатальная диагностика: истоки, реалии, ближайшие перспективы. *Здоровье женщины*. 2013; 77: 65-71.
16. Тороповский А.Н., Никитин А.Г., Жмырко Е.В., Скороходов Л.С., Беляков А.В., Викторов Д.А. Анализ показателей информативности наборов реагентов «ТЕСТ-SRY» и «ТЕСТ-RHD» при определении пола и резус-фактора плода. *Фундаментальные исследования*. 2014; 10: 1566-71.

REFERENCES

1. Finning K.M., Chitty L.S. Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin. Fetal Neonat. Med.* 2008; 13(2): 69-75.
2. Odeh M., Granin V., Kais M., Ophir E., Bornstein J. Sonographic fetal sex determination. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2009; 64(1): 50-7.
3. Lo Y.M.D., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W.G., Wainscoat J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350(9076):485-7.
4. Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Generation of blood circulating DNA: the sources, peculiarities of circulation and structure. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2015; 61(4): 409-26. (in Russian)
5. Hui L. Noninvasive Approaches to Prenatal Diagnosis: Historical Perspective and Future Directions. *Methods in Molecular Biology*. 2019; 1885: 45-58.
6. Guibert J., Benachi A., Grebille A.G., Ernault P., Zorn J.R., Costa J.M. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real-time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 2003; 18(8): 1733-6.
7. Rijnders R.J.P., Van Der Loo J.B., Peters E.D.J., Goeree J.K., Van Der Schoot C.E., Ploos Van Amstel J.K., Christiaens G.C. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 2003; 23: 1042-4.
8. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M.Z., Hjelm N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64: 218-24.

9. Hui L., Vaughan J.I., Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat. Diagn.* 2008; 28: 304-8.
10. Gratacos E., Nicolaides K. Clinical Perspective of Cell-Free DNA Testing for fetal aneuploidies. *Fetal Diagn. Ther.* 2014; 35(3): 151-228.
11. Chiu R.W., Lo Y.M. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma the coming of age. *Semin. Fetal Neonat. Med.* 2011; 16: 88-93.
12. Devaney S.A., Palomaki G.E., Scott J.A., Bianchi D.W. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011; 30(6): 627-36.
13. Wright C.F., Wei Y., Higgins J.P., Sagoo G.S. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res. Notes*. 2012; 5: 476.
14. Mackie F.L., Hemming K., Allen S., Morris R.K., Kilby M.D. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG*. 2017; 124(1): 32-46.
15. Veropotvelyan M.P., Pogulyay Y.S. Noninvasive prenatal diagnosis: origins, realities, immediate prospects. *Zdorov'e zhenshchiny*. 2013; 77: 65-71. (in Russian)
16. Toropovskiy A.N., Nikitin A.G., Zhmyrko E.V., Skorokhodov L.S., Belyakov A.V., Viktorov D.A. The analysis of indicators informativeness for the reagent kits «TEST-SRY» and «TEST-RHD» when determining sex and fetal rh factor. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 10: 1566-71. (in Russian)
17. Hughes I.A. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; 22: 119-34.
18. Kim K.S., Kim J. Disorders of sex development. *Korean J. Urol.* 2012; 53(1): 1-8.
19. Anik A., Catli G., Abaci A., Böber E. 46,XX male disorder of sexual development: a case report. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 2013; 5: 258-60.
20. Lonardo F., Cantalupo G., Ciavarella M., Monica M.D., Lombardi C., Maioli M., Masella L., Nazzaro A., Scarano G. Prenatal diagnosis of 46, XX testicular DSD. Molecular, cytogenetic, molecular-cytogenetic, and ultrasonographic evaluation. *Prenat. Diagn.* 2009; 29: 998-1001.
21. Zenteno J.C., Lopez M., Vera C., Mendez J.P., Kofman-Alfaro S. Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum. Genet.* 1997; 100: 606-10.
22. Zenteno-Ruiz J.C., Kofman-Alfaro S., Mendez J.P. 46, XX sex reversal. *Arch Med Res.* 2001; 32: 559-66.
23. Berglund A., Johannsen T.H., Stochholm K., Viuff M.H., Fedder J., Main K.M., Gravholt C.H. Incidence, prevalence, diagnostic delay, and clinical presentation of female 46,XY disorders of sex development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016; 101(12): 4532-40.
24. Jung E.J., Im D.H., Park Y.H., Byun J.M., Kim Y.N., Jeong D.H., Sung M.S., Kim K.T., An H.J., Jung S.J., Lee K.B. Female with 46, XY karyotype. *Obstet. Gynecol. Sci.* 2017; 60(4): 378-82.
25. Chapelle A., Hortling H., Niemi M., Wennström J. XX sex chromosomes in a human male. *Acta Med. Scand.* 1964; 175: 25-8.