

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра



Д.Л. Пиневиц
2019 г.

Регистрационный № 090-0619

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ ПО
ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА CCL5**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»¹,
Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»²

АВТОРЫ: канд. мед. наук А.Г. Кадушкин¹, Е.А. Хотько¹, А.А. Мигас²,
д-р мед. наук, проф. А.Д. Таганович¹, С.И. Марчук¹

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки вероятности развития хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) на основании определения полиморфизма rs2280788 гена хемокина CCL5, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на профилактику и лечение ХОБЛ.

Инструкция предназначена для врачей-пульмонологов, врачей-терапевтов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим ХОБЛ.

Показания к применению

- курение табака более 10 пачка/лет;
- астма (J45);
- хронический бронхит (J41, J42);
- перенесенный туберкулез органов дыхания (A15, A16);
- хроническое воздействие вредных и (или) опасных производственных факторов на дыхательные пути;
- хронический контакт с продуктами сжигания биоорганического топлива.

Противопоказания к применению: нет.

Перечень необходимых лекарственных средств, медицинских изделий и др.

1. Вакутайнеры с ЭДТА и переходником для забора крови.
2. Набор для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из цельной крови человека.

3. Смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР), содержащая $MgCl_2$, дезоксинуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ), прямой праймер, обратный праймер, сигнальные зонды.
4. ПЦР-бокс с ультрафиолетовой лампой.
5. Пробирки типа «Эппендорф» 1,5 мл.
6. Штативы для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл.
7. Высокоскоростная центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл со скоростью вращения ротора 8–12000 об./мин.
8. Микроцентрифуга-вортекс со скоростью вращения ротора 1,5–3000 об./мин (или вортекс).
9. Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл, поддерживающий температуру до 99°C.
10. Пипетки-дозаторы переменного объема (0,5–10; 2–20; 20–200; 100–1000 мкл).
11. Одноразовые наконечники до 250 мкл и до 1000 мкл для пипеток с аэрозольным фильтром.
12. Пробирки для хранения аликвот ДНК 0,5 мл.
13. Центрифуга-вортекс для ПЦР планшетов.
14. Таq ДНК-полимераза (рекомбинантная).
15. Вода для молекулярно-биологических исследований, свободная от ДНКаз и РНКаз.
16. Программируемый термоциклер с оптическим блоком (амплификатор).
17. ПЦР-планшеты 96-луночные на 0,2 мл (или одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР на 0,2 мл).
18. Оптически прозрачная пленка для заклеивания планшетов.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этапы метода (выделение ДНК из биопроб, выполнение ПЦР, детекция продуктов амплификации) осуществляются в отдельных помещениях согласно основным принципам организации ПЦР-лабораторий и проведения молекулярно-биологической диагностики (инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.11.2008 № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)»).

1. Выделение ДНК из биопроб. Осуществляется общепринятыми методами. Полученные пробы ДНК хранить при температуре 2–8°C не более 1 недели или при температуре -20°C не более 6 месяцев в аликвотах, избегая многократного размораживания.

2. Подготовка рабочей амплификационной смеси.

Рабочие смеси следует готовить непосредственно перед амплификацией. После внесения образца планшет сразу помещается в амплификатор.

За 20–30 мин до приготовления реакционной ПЦР-смеси извлечь все реагенты и исследуемые образцы ДНК, кроме Taq ДНК-полимеразы, из морозильника, разморозить их содержимое на льду и встряхнуть на вортексе в течение 5 секунд.

Для ПЦР используются праймеры и сигнальные зонды, с помощью которых амплифицируются участки генов CCL5, содержащие соответствующие полиморфизмы (табл. 1).

Таблица 1 – Структура праймеров и зондов для определения полиморфизма генов CCL5

| Название полиморфизма | Нуклеотидная последовательность праймеров и сигнальных зондов |
|-----------------------|---|
| rs2280788 CCL5 | F5'-GGCAGTAGCAATGAGGATGACA-3' R5'-GAGAGAGCAGTGAGGGAGAGA-3' GCCCCTCAACTGG-FAM GCCCCTGAACTGG-HEX BHQ1-CCTATAAAGGGCCAGCC-P |

В отдельной пробирке вместимостью 1,5 мл (на льду) приготовить рабочую смесь для амплификации из расчета на N+m проб, где N – количество лунок с исследуемыми образцами плюс одна лунка для отрицательного контрольного образца, а m – 10% от общего количества лунок (табл. 2).

Таблица 2 – Компоненты рабочей смеси для амплификации из расчета на 1 образец

| Реагенты | x1, мкл |
|--------------------------|---------|
| Деионизованная вода | 3 |
| ПЦР-смесь* | 4 |
| Тaq-полимераза, 1U/проба | 2 |

Примечание: * - ПЦР-смесь, содержащая 10x буфер, праймеры, зонды (конечная концентрация – 400 нМ), дезоксинуклеозидтрифосфаты (конечная концентрация – 200 нМ), MgCl₂ (конечная концентрация – 1 мМ).

В последнюю очередь добавляется Таq ДНК-полимераза, после чего следует перемешать смесь пипетированием.

3. Проведение реакции амплификации.

Внести по 9 мкл рабочей амплификационной смеси в соответствующие лунки планшеты, находящейся на льду.

Добавить по 1 мкл (концентрация не менее 30 нг/мкл) исследуемых образцов ДНК из анализируемых проб во все лунки планшеты согласно нумерации. В качестве отрицательного контрольного образца вносится деионизованная вода в объеме 1 мкл.

Планшеты заклеить пленкой и центрифугировать в течение 60 секунд при 1500–3000 об./мин на центрифуге для осаждения капель со стенок лунок. Перенести планшет в программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по программе, выбранной для амплифицируемого участка, используя тип анализа «Анализ полиморфизмов, плавление» (табл. 3).

Таблица 3 – Температурно-временная программа для определения CCL5-полиморфизма

| № блока | t, °C | Время | | Число циклов | Режим оптических измерений | Δt, °C | Тип блока |
|---------|-------|----------|------|--------------|----------------------------|--------|---|
| | | мин. | сек. | | | | |
| 1 | 95 | 2 | 00 | 1 | | | цикл |
| 2 | 94 | 0 | 15 | 50 | FAM, HEX | | цикл |
| | 67 | 0 | 30 | | | | |
| 3 | 25 | 0 | 30 | 1 | | | цикл |
| 4 | 25 | 0 | 15 | 50 | FAM, HEX | 1,0 | «Кривая плавления», Δt = 1 °C; t _{кон} = 75 °C |
| 5 | 10 | Хранение | | | | | |

После окончания полимеразной цепной реакции планшет извлечь из амплификатора.

4. Определение аллельных вариантов генотипа

Заключение о генотипе осуществляется исходя из анализа полученных графиков согласно рис. 1 и рис. 2.

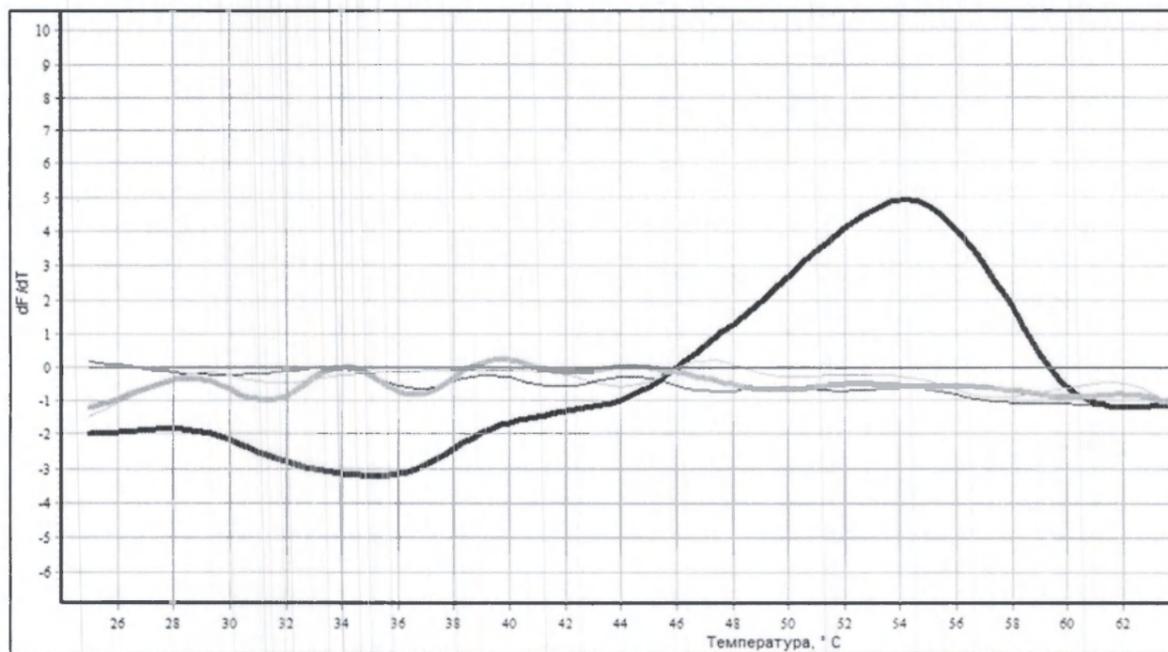


Рисунок 1 – Пик флюоресценции при плавлении только по каналу FAM, свидетельствующий о носительстве генотипа C/C

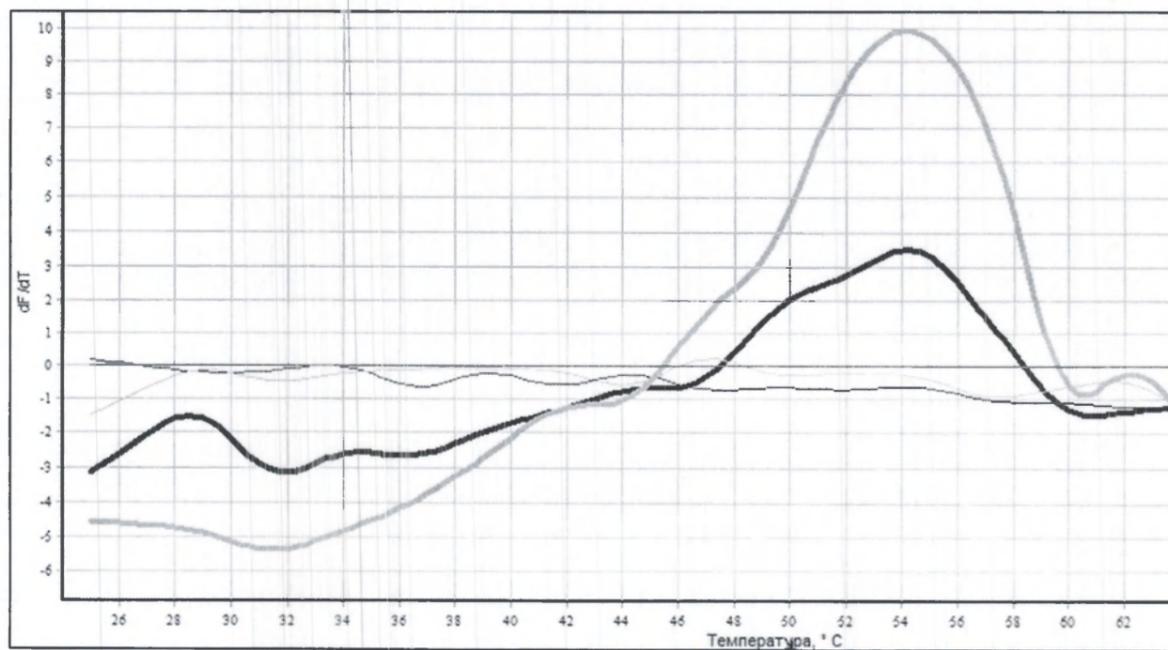


Рисунок 2 – Пики флюоресценции при плавлении по каналу FAM и каналу HEX, свидетельствующие о носительстве генотипа C/G

Для обобщения интерпретации полученных данных использованы следующие обозначения:

Буква С обозначает наличие аллели дикого (рецессивного) типа у пациента, буква G – аллели мутантного (доминантного) типа. Сочетание C/C указывает на гомозиготный генотип по данному полиморфизму, а C/G – на гетерозиготный генотип (одна аллель дикого типа, другая – мутантного).

5. Оценка результатов определения полиморфизма гена CCL5 (rs2280788) согласно таблице 5.

Таблица 5 – Вероятность развития ХОБЛ в зависимости от носительства варианта генотипа rs2280788 гена CCL5 у лиц, подвергающихся воздействию факторов риска (см. показания к применению)

| Генотип | Вероятность развития ХОБЛ |
|-------------|---------------------------|
| Генотип C/C | низкая |
| Генотип C/G | высокая |

УТВЕРЖДАЮ

руководитель учреждения, в котором

внедрен способ

20

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Название предложения для внедрения: Метод определения вероятности развития хронической обструктивной болезни легких по полиморфизму гена CCL5.

2. Кем предложено (наименование учреждений-разработчиков, авторы): Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», 220116, Минск, пр-т Дзержинского, 83; Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», 223053, Минская обл., Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43; канд.мед.наук А.Г. Кадушкин, Е.А. Хотько, А.А. Мигас, проф., д-р мед. наук А.Д. Таганович, С.И. Марчук.

3. Источник информации: инструкция по применению № _____ от _____ 2019.

4. Где и когда начато внедрение _____

наименование лечебного учреждения, дата внедрения

5. Общее количество наблюдений _____

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____

Носительство генотипа С/С (количество пациентов): _____

Носительство генотипа С/Г (количество пациентов): _____

7. Эффективность внедрения: _____

8. Замечания, предложения _____

Дата _____

Ответственные за внедрение

должность, Ф.И.О.

подпись

Примечание. Акт о внедрении направляется организации-разработчику (п. 2), п.п.