

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

2017 г.

Регистрационный № 127-1217



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ
АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент М. Н. Курбат, д.м.н., профессор В. М. Цыркунов,

к.м.н., доцент Е. Н. Кроткова

Гродно, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
22.12.2017
Регистрационный № 127-1217

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ
АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гродненский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. М.Н. Курбат, д-р мед. наук, проф.
В.М. Цыркунов, канд. мед. наук, доц. Е.Н. Кроткова

Гродно 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики вероятности развития токсического поражения печени (далее — ТПП) при проведении антиретровирусной терапии (далее — АРТ) пациентам с ВИЧ-инфекцией, основанный на определении полиморфизма гена, ответственного за синтез фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (далее — MTHFR), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику ТПП антиретровирусными лекарственными средствами.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-инфекционистов, врачей-терапевтов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ВИЧ-инфекцией.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Для получения стандартизированных результатов ПЦР предпочтительно использовать готовые коммерческие наборы реагентов для:

1.1 выделения геномной ДНК;

1.2 определения полиморфизма гена MTHFR C677T (Ala222Val, rs1801133).

Перечень набора основных реагентов для работы напрямую связан с выбором оригинальных методов анализа и приготовления собственных реакционных смесей или использования коммерческих наборов. Качество используемых реагентов, включая воду и солевые растворы, должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для молекулярно-генетических исследований.

2. Лабораторное оборудование и медицинские изделия для выделения геномной ДНК и проведения полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР) в реальном времени (Real Time ПЦР) в соответствии с таблицей.

Таблица — Набор оборудования для молекулярно-генетического анализа

Наименование оборудования и основные характеристики	К-во
<i>Выделение геномной ДНК из биологического материала</i>	
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, с диапазоном рабочих температур от 0 до +25°C	1
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур от -10 до +99°C)	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Насос с колбой-ловушкой	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл)	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4°C	1
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от -16 до -18°C)	1

<i>ПЦР-реакция</i>	
Амплификатор (термоциклер) с оптической системой, предназначенный для проведения ПЦР и детекции в режиме «реального времени»	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Твердотельный термостат (диапазон температур от -10 до +99°C)	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл)	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от 2 до 4°C	1
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от -16 до -18°C)	1

Также необходимы следующие расходные материалы: ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера), микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, наконечники с фильтром объемом 10; 20; 200; 1000 мкл, наконечники без фильтра, халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

ВИЧ-инфекция (код МКБ-10 В20–В24).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Соответствующие таковым к венепункции (при использовании лейкоцитов периферической крови для выделения из них ДНК для исследования).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод состоит из 3-х последовательных этапов:

1 этап — выделение геномной ДНК из биологического материала (лейкоциты периферической крови). Для выделения ДНК предпочтительно использовать готовые коммерческие наборы. Полученный раствор ДНК использовать для постановки реакции амплификации или хранить при температуре -20°C для последующего анализа.

2 этап — определение генотипа MTHFR C677T (Ala222Val). Для получения стандартизированных результатов ПЦР предпочтительно использовать готовые коммерческие наборы. Рабочую реакционную смесь готовят согласно инструкции производителя, исходя из количества исследуемых образцов, а также положительных и отрицательного контролей. Амплификацию исследуемого локуса ДНК проводят на амплификаторе с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Дискриминацию аллелей осуществляют средствами программного обеспечения амплификатора, в основе которых лежит зависимость интенсивности флуоресценции соответствующего красителя и количества копий исследуемого участка гена. В ходе анализа полученных результатов проверяют соответствие контрольных генотипов заявленным.

3 этап — интерпретация результатов. Возможно определение трех вариантов генотипа MTHFR C677T (Ala222Val): гомозигота СС либо ТТ,

и гетерозиготное носительство СТ. Носители генотипа СТ обладают высоким риском развития ТПП при проведении АРТ с использованием стандартных схем, сочетающих применение двух лекарственных средств из группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ), и третьего препарата одного из двух классов: ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) либо ингибиторов протеазы (ИП). Отношение шансов (ОР) развития у ВИЧ-инфицированных пациентов с вышеуказанным генотипом составляет 3,6 (95 % ДИ 1,20–10,80). Гомозиготное носительство СС или ТТ не ассоциировано с риском развития гепатотоксичности при проведении АРТ.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Использование методики ПЦР подразумевает строгое следование всем правилам организации и проведения исследования в ПЦР-лаборатории, несоблюдение которых приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Основной причиной ложноположительных результатов ПЦР является: ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб, загрязненными реагентами, инструментарием, перекрестной контаминацией (загрязнением) продуктами амплификации. Ложноотрицательные результаты возникают вследствие присутствия в клиническом образце веществ, которые ингибируют ПЦР.

название

учреждения

здравоохранения

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач

201____
МП

И.О.Фамилия

А К Т

учета практического использования инструкции по применению

1. Инструкция по применению: «Метод определения вероятности развития токсического поражения печени при проведении антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции».

2. Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
№. _____

3. Кем предложена разработка: сотрудниками учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»: к.м.н., доцентом М. Н. Курбатов, д.м.н., профессором В. М. Цыркуновым, к.м.н., доцентом Е. Н. Кротковой.

4. Материалы инструкции использованы для _____

5. Где внедрено: _____

_____ подразделение и название учреждения здравоохранения

6. Результаты применения метода за период с _____
по _____
общее кол-во наблюдений « _____ »
положительные « _____ »
отрицательные « _____ »

7. Эффективность внедрения (восстановление трудоспособности, снижение заболеваемости, рациональное использование коечного фонда, врачебных кадров и медицинской техники) _____

8. Замечания, предложения: _____

201____ Ответственные за внедрение:

Должность

подпись

И.О.Фамилия

Примечание:

акт о внедрении направлять по адресу:
кафедра инфекционных болезней
УО «Гродненский государственный медицинский университет»
ул. Горького, 80
230009, г.Гродно