

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 136-1118



**МЕТОД МЕДИЦИНСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ БРОНХОЛЁГОЧНОЙ
ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЁННЫХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии»
Национальной Академии наук Беларуси,
Учреждение здравоохранения «Клинический родильный дом Минской области».

АВТОРЫ:

Сухарева А.П., д. м. н., профессор Шишко Г.А., к.м.н. Артюшевская М.В.,
к.б.н. Михаленко Е.П., Малышева О.М., Мосько П.Л., д.б.н., академик НАН
Беларуси Кильчевский А.В.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич

30.11.2018

Регистрационный № 136-1118

**МЕТОД МЕДИЦИНСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ
ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГНУ «Институт генетики и цитологии» НАН Беларуси, УЗ «Клинический родильный дом Минской области»

АВТОРЫ: А. П. Сухарева, д-р мед. наук, проф. Г. А. Шишко, канд. мед. наук М. В. Артюшевская, канд. биол. наук Е. П. Михаленко, О. М. Малышева, П. Л. Мосько, д-р биол. наук, акад. НАН Беларуси А. В. Кильчевский

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод медицинской профилактики бронхолегочной дисплазии (БЛД) у недоношенных новорожденных.

Область применения: инструкция предназначена для врачей-педиатров-неонатологов, врачей-педиатров, врачей-анестезиологов-реаниматологов, врачей-генетиков.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Для забора биологического материала:

1. Вакутайнер для забора крови из вены.
2. Стерильный шприц для забора пуповинной крови.
3. Стерильные зонды в индивидуальной упаковке для забора буккального эпителия.

Для полимеразной цепной реакции с последующим определением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ):

1. ПЦР-бокс.
2. Амплификатор.
3. Термостат.
4. Вортекс.
5. Пробирки объемом 1,5 мл и 0,2 мл.
6. Автоматические пипетки переменного объема с наконечниками.
7. Реактивы: 2х ПЦР-буфер с Таq-полимеразой, праймеры, деионизированная вода, эндонуклеаза HруСН4Ш.
8. Последовательности праймеров для синтеза фрагмента гена SFTPВ: F — GGCCTTGTGTCCAGGGAC и R — CTCCCCATGGGTGGGCAC.

Для горизонтального фореа:

1. Камера для горизонтального электрофореза.
2. Трансиллюминатор, автоматические пипетки с наконечниками.
3. Реактивы: 0,5-кратный буфер для электрофореза, агароза, бромистый этидий.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Недоношенные новорожденные в сроке гестации 28-32 недели с синдромом дыхательных расстройств (P22.0), получившие лечение сурфактантом.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Оценка факторов риска развития БЛД у недоношенного новорожденного в сроке гестации 28–32 недели с синдромом дыхательных расстройств, получившего лечение сурфактантом.

Риск развития БЛД определяется при:

снижении концентрации кислорода во вдыхаемой газовой смеси (FiO_2) до 0,21–0,25 после лечения сурфактантом с последующим ее нарастанием в течение 1 сут;

сохранении кислородозависимости более 10 сут.

Данному пациенту необходимо выполнить молекулярно-генетический анализ для оценки полиморфных вариантов в локусе 1580 экзона 4 гена, кодирующего синтез сурфактантного белка В (SFTPВ).

Этап 2. Молекулярно-генетический анализ у недоношенного новорожденного в сроке гестации 28–32 недели с риском развития БЛД и интерпретация данных.

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови или буккального эпителия.

Методика забора биологического материала

Взять кровь в объеме 1,0 мл в вакутайнер или стерильную промаркированную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. На этикетке должны быть указаны имя и номер истории болезни пациента, дата забора и тип образца.

Образцы буккального эпителия следует забирать как минимум через 30 мин после кормления — стерильным зондом с внутренней поверхности обеих щек. Необходимо сделать 10–20 движений зондом, поворачивая его в ротовой полости. Продолжительность процедуры 30–45 с. До исследования образцы могут храниться и транспортироваться при 2–8 °С в течение 24 ч с момента забора; более длительное хранение — при -20 °С.

Методика определения полиморфных вариантов в локусе 1580 экзона 4 гена SFTPВ

ПЦР-ПДРФ:

1. Состав реакционной смеси в конечном объеме 8 мкл на один образец:

4,0 мкл 2-кратного ПЦР-буфера с Taq-полимеразой;

0,15 мкМ прямого и обратного праймеров;

50–100 нг геномной ДНК (1 мкл), выделенной из биологического материала.

2. ПЦР-пробирки помещают в амплификатор:

1-й шаг — 1 цикл (95 °С — 5 мин);

2-й шаг — 35 циклов (95 °С — 30 с, 65 °С — 30 с, 72 °С — 30 с);

3-й шаг — 1 цикл (72 °С — 7 мин).

3. Извлечение ПЦР-пробирок из амплификатора и добавление эндонуклеазы HруСН4Ш. Рестриктию производят согласно инструкции фирмы-производителя.

Горизонтальный форе́з:

1. Нанесение продуктов рестрикции на 2,2 % горизонтальный агарозный гель.

2. Визуализация результатов электрофоретического разделения фрагментов в ультрафиолетовом свете. Соответствие определенного генотипа варианту рестриктных фрагментов после обработки эндонуклеазой HруСН4Ш представлено в таблице 1.

Таблица 1. — Идентификация генотипов SFTPВ по длине рестриктных фрагментов

Генотип	Длина фрагментов, пн
1580Т/Т	265
1580С/Т	265+198+67
1580С/С	198+67

Интерпретация молекулярно-генетического анализа и дальнейшая тактика ведения пациента

При выявлении полиморфного варианта 1580С/С в экзоне 4 гена SFTPВ у новорожденного предполагается высокая вероятность развития бронхолегочной дисплазии. Для подтверждения или исключения изменений в легких необходимо произвести рентгенографию органов грудной клетки.

При выявлении полиморфных вариантов 1580С/Т, 1580Т/Т в экзоне 4 гена SFTPВ необходимо продолжить клиническое наблюдение за пациентом.

Алгоритм медицинской профилактики бронхолегочной дисплазии у недоношенных новорожденных со сроком гестации 28–32 недели, получивших лечение сурфактантом, представлен в приложении.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Таблица 2. — Возможные ошибки и затруднения при применении молекулярно-генетических методов

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложноположительные/ ложноотрицательные результаты	<ol style="list-style-type: none"> 1. Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом 2. Снижение (утрата) активности рестриктаз 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Соблюдать принципы зонирования лаборатории для молекулярно-генетических исследований 2. Использовать стерильную одноразовую посуду, расходные материалы и растворы 3. Включать в каждую серию исследований пробу с реакционной смесью, но не содержащую ДНК (отрицательный контроль) Включать в каждую серию исследований пробу с известным генотипом (положительный контроль)

Алгоритм медицинской профилактики бронхолегочной дисплазии у недоношенных новорожденных в сроке гестации 28–32 недели, получивших лечение сурфактантом

