

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Б.Н.Андросюк

09.11.2021 г.

Регистрационный № 098 – 0921

**МЕТОД МНОГОФАКТОРНОЙ ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Таганович А.Д., Хотько Е.А.,
к.м.н. Кадушкин А.С., Марчук С.И.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки вероятности развития хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) у мужчин и женщин на основании определения полиморфизмов rs1800795 гена интерлейкина IL6, rs1800896 гена IL10, rs1801275 гена интерлейкинового рецептора IL4R и rs2234693 гена эстрогенового рецептора ESR1, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику ХОБЛ.

Инструкция предназначена для врачей-пульмонологов, врачей-терапевтов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим ХОБЛ, на I-IV уровнях оказания медицинской помощи.

Организации здравоохранения должны иметь помещения, оснащенные согласно инструкции по применению «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)» №090-1008, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 13.11.2008).

Показания к применению метода.

- 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 согласно постановлению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29 июля 2019 г. № 74 (приложение 1).

Противопоказания к применению метода: нет.

Перечень необходимых медицинских изделий, расходных материалов и лекарственных средств.

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 оборотов/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. Деионизованная вода.
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 применения метода

Этап 1

Определение аллельных вариантов полиморфизмов rs1800795 гена IL6, rs1800896 гена IL10, rs1801275 гена IL4R и rs2234693 гена ESR1: выделение ДНК из биологического материала, подготовка рабочей амплификационной смеси, проведение реакции амплификации, определение вариантов генотипа – 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)»).

1.1. Выделение ДНК из биологического материала. Осуществляется общепринятыми методами. Полученные пробы ДНК хранить при температуре от 2°C до 8°C не более 1 недели или при температуре не более (-20°C) не более 6 мес. в аликвотах, избегая многократного размораживания.

1.2. Подготовка рабочей смеси для амплификации.

1.2.1 За 20–30 мин. до приготовления рабочей смеси для амплификации 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 с.

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

Для ПЦР используются праймеры и сигнальные зонды, с помощью которых амплифицируются участки генов IL6, IL10, IL4R и ESR1, содержащие соответствующие полиморфизмы (табл. 1).

Таблица 1 – Структура праймеров и зондов для определения полиморфизмов генов

Название полиморфизма	Нуклеотидная последовательность праймеров и сигнальных зондов
rs1800795 IL6	FJ 5'- GACCTAAGCTGCACTTTTC-3' RJ 5'- GGTTGAGACTCTAATATTGAGAC-3' FAM-tgtcTtGcCaTgCtaa-BHQ-1 VIC-tgtcTtGcGaTgCtaa-BHQ-2
rs1800896 IL10	FJ 5'- GGAAGAAGTTGAAATAACAAG-3' RJ 5'-CCAAGACAACACTACTAAG-3' FAM-acttcCccCtcCcaaa-BHQ-1 VIC-acttcCccTtcCcaaa-BHQ-2
rs1801275 IL4R	FJ 5'-GGAAGTAGAACCCGAGATG-3' RJ 5'-CCTTGTAACCAGCCTCTC-3' FAM-caaacTccTgaTagccac-BHQ-1 VIC-caaacTccCgaTagccac-BHQ-2
rs2234693 ESR1	FJ 5'-TGTCCATCAGTTCATCTG-3' RJ 5'-GAACCATTAGAGACCAATG-3' FAM-tgtcCcageTgtttTatg-BHQ-1 VIC-tgtcCcageCgtttTatg-BHQ-2

1.2.3 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

Полиморфизм	Реагенты	х1, мкл
rs1800896 IL10,	Деионизованная вода	6,9

rs1801275 IL4R, rs2234693 ESR1	ПЦР-смесь*	2,0
	Taq-полимераза, 1U/пробу	0,1
rs1800795 IL6	Деионизованная вода	6,8
	ПЦР-смесь*	2,0
	Taq-полимераза, 1U/пробу	0,2

Примечание: * - ПЦР-смесь, содержащая 10x буфер, праймеры, зонды (конечная концентрация - 400 нМ), дезоксинуклеозидтрифосфаты (конечная концентрация - 200 нМ), MgCl₂ (конечная концентрация – 1,0 мМ).

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

1.3. Проведение реакции амплификации.

1.3.1 Внести по 9 мкл рабочей смеси для амплификации в соответствующие лунки планшеты, находящейся на льду.

1.3.2 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.

1.3.3 Планшеты заклеить оптически прозрачной пленкой для планшетов и центрифугировать в течение 60 с при 1500–3000 оборотов/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 «по конечной точке» (табл. 3).

Таблица 3 – Температурно-временная программа для определения полиморфизмов

Полиморфизм	Протокол амплификации			
	Блок	Число циклов	Температурно-временная программа	Режим оптических измерений

IL10 rs1800896	денатурация	1	[95°C – 2:00]	
	элонгация	40	[94°C – 0:10]	FAM, VIC
			[58°C – 1:20]	
хранение	-	[10°C]		
IL4R rs1801275	денатурация	1	[95°C – 2:00]	
	элонгация	40	[94°C – 0:10]	FAM, VIC
			[62°C – 1:00]	
хранение	-	[10°C]		
IL6 rs1800795	денатурация	1	[95°C – 2:00]	
	элонгация	40	[94°C – 0:10]	FAM, VIC
			[60°C – 1:00]	
хранение	-	[10°C]		
ESR1 rs2234693	денатурация	1	[95°C – 2:00]	
	элонгация	40	[94°C – 0:10]	FAM, VIC
			[60°C – 1:00]	
хранение	-	[10°C]		

1.3.4 После окончания полимеразной цепной реакции планшет извлечь из амплификатора.

1.4. Определение вариантов генотипа

1.4.1 Заключение о генотипе осуществляется исходя из появления флуоресценции не позже 32 цикла амплификации и анализа полученных графиков согласно рис. 1 и рис. 2.

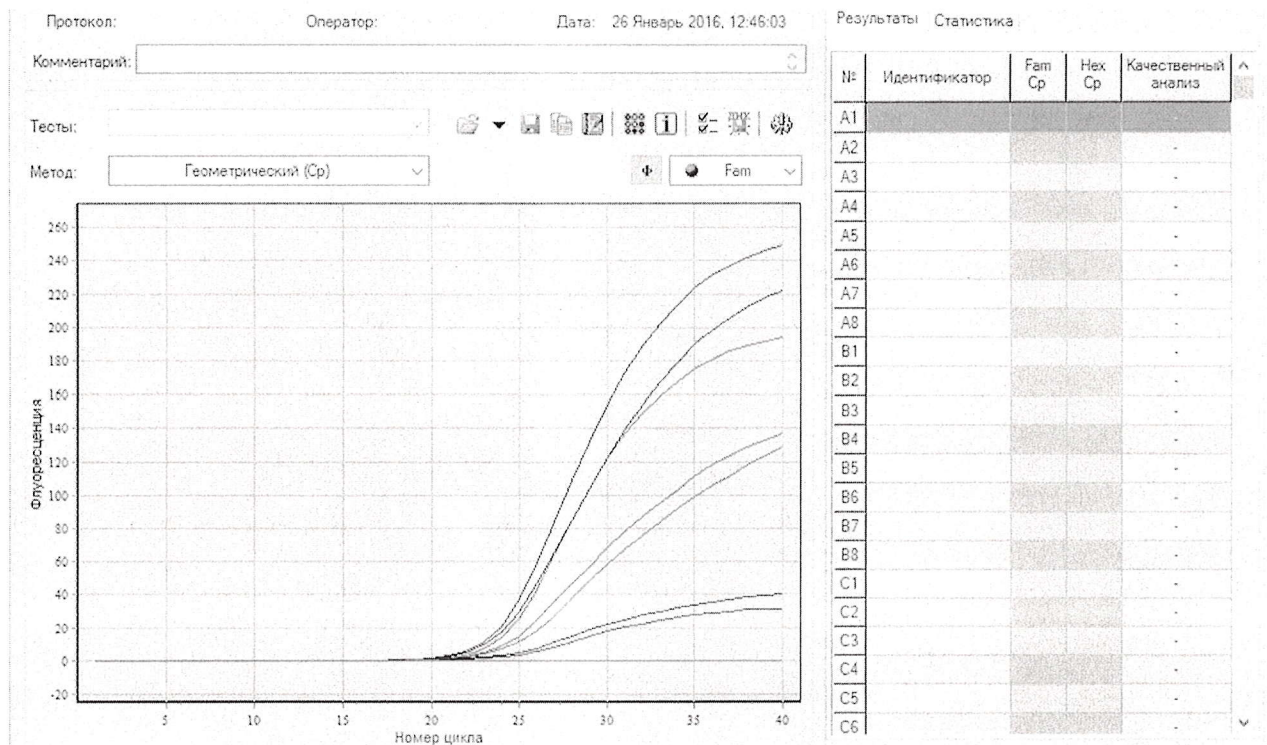


Рисунок 1 – Появление флуоресценции по каналу FAM, свидетельствующей о носительстве мажорной аллели

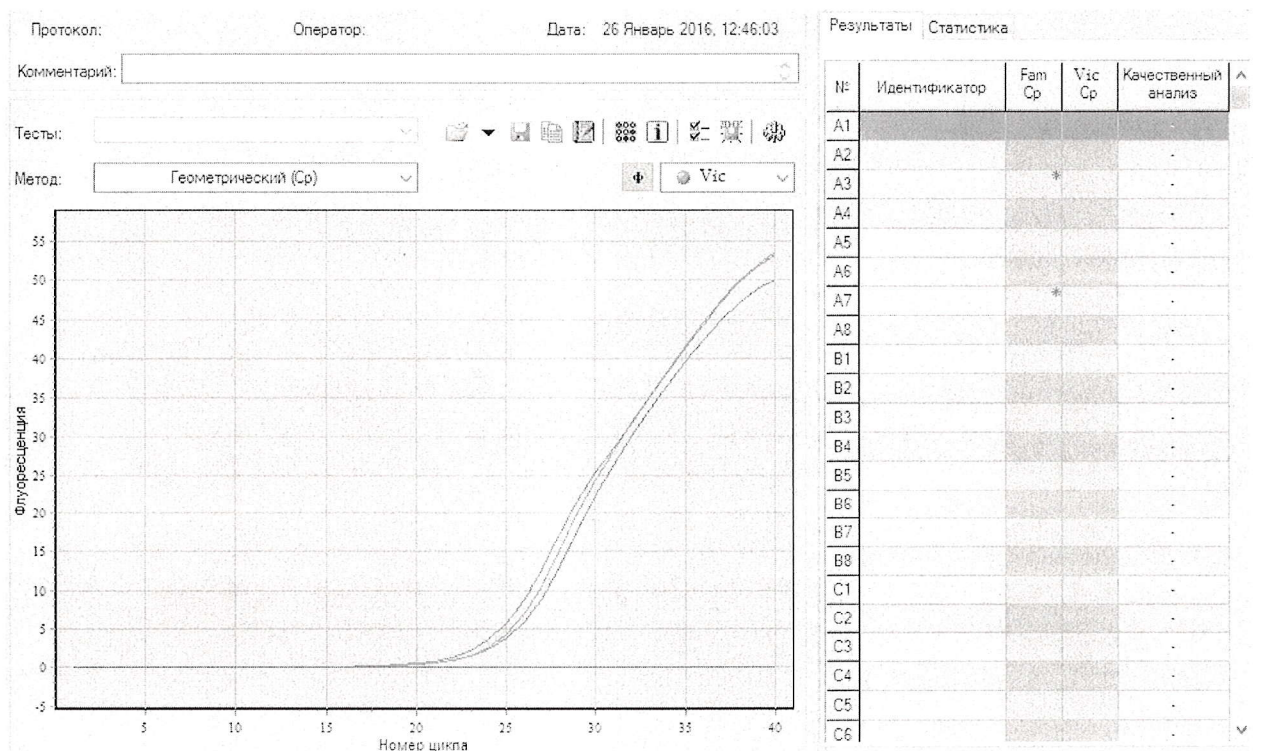


Рисунок 2 – Появление флуоресценции по каналу VIC, свидетельствующей о носительстве минорной аллели

1.4.2 Для обобщения интерпретации полученных данных использованы следующие обозначения:

При анализе rs1800896 гена IL10 буква А обозначает наличие мажорной аллели дикого типа у пациента, буква G – минорной аллели мутантного типа. Сочетание AA указывает на гомозиготный мажорный генотип по данному полиморфизму, AG – на гетерозиготный генотип, GG – на гомозиготный минорный генотип.

При анализе rs1801275 гена IL4R буква А обозначает наличие мажорной аллели дикого типа у пациента, буква G – минорной аллели мутантного типа. Сочетание AA указывает на гомозиготный мажорный генотип по данному полиморфизму, AG – на гетерозиготный генотип, GG – на гомозиготный минорный генотип.

При анализе rs1800795 гена IL6 буква С обозначает наличие минорной аллели мутантного типа у пациента, буква G – мажорной аллели дикого типа. Сочетание CC указывает на гомозиготный минорный генотип по данному полиморфизму, CG – на гетерозиготный генотип, GG – на гомозиготный мажорный генотип.

При анализе rs2234693 гена ESR1 буква Т обозначает наличие мажорной аллели дикого типа у пациента, буква С – минорной аллели мутантного типа. Сочетание TT указывает на гомозиготный мажорный генотип по данному полиморфизму, TC – на гетерозиготный генотип, CC – на гомозиготный минорный генотип.

Этап 2

Определение вероятности развития хронической обструктивной болезни легких у женщин осуществляется согласно оценке результатов определения комбинации полиморфизмов rs1800896 гена IL10, rs1800795 гена IL6 и rs2234693 гена ESR1, у мужчин – rs1801275 гена IL4R, rs1800896 гена IL10, rs1800795 гена IL6 и rs2234693 гена ESR1 (табл. 4).

Таблица 4 – Вероятность развития ХОБЛ в зависимости от сочетанного носительства вариантов генотипов rs1801275, rs1800896, rs1800795 и rs2234693 у лиц мужского и женского пола, подвергающихся воздействию факторов риска (см. показания к применению).

Сочетания генотипов полиморфных локусов rs1801275, rs2234693, rs1800896, rs1800795	Вероятность развития ХОБЛ
для мужчин	
AG (IL4R)/TT (ESR1)/AG (IL10)/GG (IL6)	высокая
AG (IL4R)/TC (ESR1)/AG (IL10)/CG (IL6)	
AG (IL4R)/TT (ESR1)/AA (IL10)/CG (IL6)	низкая
AA (IL4R)/TT (ESR1)/AG (IL10)/CG (IL6)	
AG (IL4R)/TT (ESR1)/AG (IL10)/CC (IL6)	
AA (IL4R)/TT (ESR1)/GG (IL10)/GG (IL6)	
AG (IL4R)/TT (ESR1)/GG (IL10)/CC (IL6)	
AG (IL4R)/TT (ESR1)/GG (IL10)/CG (IL6)	
AG (IL4R)/TT (ESR1)/GG (IL10)/GG (IL6)	
AA (IL4R)/TC (ESR1)/AA (IL10)/CC (IL6)	
AG (IL4R)/TC (ESR1)/AA (IL10)/CC (IL6)	
AA (IL4R)/TC (ESR1)/AG (IL10)/CG (IL6)	
AG (IL4R)/TC (ESR1)/GG (IL10)/CC (IL6)	
GG (IL4R)/TC (ESR1)/AG (IL10)/CG (IL6)	
AA (IL4R)/CC (ESR1)/GG (IL10)/CC (IL6)	
AG (IL4R)/CC (ESR1)/GG (IL10)/GG (IL6)	
для женщин	
TC (ESR1)/CG (IL6)/GG (IL10)	высокая
TC (ESR1)/GG (IL6)/GG (IL10)	
TT (ESR1)/CC (IL6)/AA (IL10)	низкая
TT (ESR1)/CC (IL6)/AG (IL10)	
TT (ESR1)/CG (IL6)/GG (IL10)	
TT (ESR1)/GG (IL6)/GG (IL10)	
TC (ESR1)/CC (IL6)/AG (IL10)	
TC (ESR1)/CC (IL6)/GG (IL10)	
CC (ESR1)/CC (IL6)/GG (IL10)	

Этап 3

Принятие управленческого решения. В случае высокой вероятности развития ХОБЛ, требует принятия управленческих решений с целью разработки дополнительных профилактических мероприятий.

Рекомендации лицу, подвергнутому воздействию факторов риска (см. показания к применению) и имеющему высокую вероятность развития ХОБЛ:

3.1 Отказ от курения.

3.2 Лечение астмы в соответствии с клиническим протоколом диагностики и лечения астмы от 05.07.2012 № 768.

3.3 Ограничить хроническое воздействие на дыхательные пути вредных и опасных производственных факторов (постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29 июля 2019 г. № 74, приложение 1):

азота неорганических соединений (аммиак, азотная кислота и прочее);
альдегидов алифатических (предельных, непредельных и ароматических);

амидов органических кислот, анилидов и прочих производных;

бериллия и его соединений;

бора и его соединений;

галогенов, фтора и его неорганических соединений;

кадмия и его неорганических соединений;

кислот органических (муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, валериановая, капроновая, щавелевая, адипиновая, акриловая, бензойная, нафтеновые, фталевая, терефталевая и другие);

галогенопроизводных органических кислот (хлоруксусная, трихлоруксусная, перфтормасляная, трихлорпропионовая и другие);

ангидридов органических кислот (хлорангидрид бензойной кислоты, фталевый ангидрид, малеиновый и меллиитиновый и другое);

кобальта, ванадия, молибдена, вольфрама, ниобия, тантала и их соединений;

органических соединений кремния;

марганца и его соединений;

металлов щелочных и их соединений;

озона;

окисей и перекисей органических;

селена, теллура и их соединений;

серы и ее соединений;

сурьмы и ее соединений;

изотиоцианатов;

углеводородов предельных и непредельных;

амино- и нитросоединений алифатических;

фенола и его производных;

фосфора и его соединений;

хрома, хромовой кислоты и ее солей;

эфиров уксусной кислоты, акриловой кислоты, фталевой и терефталевой кислот.

Перечень возможных осложнений при применении метода:
отсутствуют.

Контроль клинической эффективности: не требуется.