

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

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

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 – МТНFR), 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 НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И Т.Д.

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

1.1 выделения геномной ДНК;

1.2 определения полиморфизма гена МТНFR 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 (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 К ПРИМЕНЕНИЮ

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 (OR) 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

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

Научное издание

Курбат Михаил Николаевич
Цыркунов Владимир Максимович
Кроткова Елена Николаевна

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

Инструкция по применению

Компьютерная верстка И. И. Прецкайло

Подписано в печать 15.01.2018.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Ризография.
Усл. печ. л. **0,41**. Уч.-изд. л. **0,21**. Тираж **40** экз. Заказ **9**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет».

ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, Гродно