

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

«26»

2025 г.

Регистрационный № 168-1224

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ
АСТМЫ У ДЕТЕЙ С БРОНХИТОМ В ВОЗРАСТЕ ДО 5 ЛЕТ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования «Витебский
государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Е.С. Минина, д.м.н., профессор И.И. Генералов,
д.м.н., доцент Н.Д. Титова, к.м.н. Д.В. Буза, к.х.н., доцент А.С. Бабенко,
А.В. Москалев, С.Е. Минин

Витебск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод прогнозирования развития бронхиальной астмы у пациентов в возрасте до 5 лет с бронхитом (шифр по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, десятого пересмотра – J40, далее – бронхит), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику бронхиальной астмы.

Инструкция предназначена для врачей-аллергологов-иммунологов, врачей-пульмонологов, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь детям в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) в условиях отделения дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Возраст пациентов до 5 лет включительно.

Диагноз: бронхит, не уточненный как острый или хронический (J40).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

1. Лабораторное оборудование и материалы:

1.1. ПЦР-бокс;

1.2. микроцентрифуга-вортекс не менее 500 × g;

1.3. высокоскоростная центрифуга для пробирок вместимостью 1,5-2,0 мл не менее 10000 × g;

1.4. автоматический ДНК-анализатор

- 1.5. камера для горизонтального электрофореза;
- 1.6. СВЧ-печь бытовая;
- 1.7. трансиллюминатор или система документирования гелей;
- 1.8. программируемый термоциклер для проведения ПЦР;
- 1.9. твердотельный термостат для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл с функцией охлаждения и нагрева (минус 10 °С ...+100 °С);
- 1.10. холодильник бытовой +2...+8 °С с морозильной камерой минус 12...минус 22 °С;
- 1.11. дозаторы переменного объема (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл);
- 1.12. штатив для пробирок вместимостью 0,2 мл;
- 1.13. штатив для пробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл;
- 1.14. емкость для сброса использованных наконечников;
- 1.15. пробирки для взятия образцов крови, содержащие этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), фиолетовый цветовой код, предназначенные для взятия 2-5 мл крови или тампон-зонды для взятия буккального эпителия;
- 1.16. пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл с оптическими крышками;
- 1.17. пробирки вместимостью 1,5 и 2,0 мл;
- 1.18. наконечники с фильтрами вместимостью до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;
- 1.19. неопудренные перчатки.
2. Наборы и реактивы:
 - 2.1. набор для выделения геномной ДНК;
 - 2.2. набор для проведения ПЦР;
 - 2.3. набор для секвенирования;
 - 2.4. набор для очистки продуктов ПЦР;

- 2.5. агароза для электрофореза;
- 2.6. буфер для загрузки продуктов ПЦР в агарозный гель;
- 2.7. вода для молекулярной биологии (свободная от РНКаз/ДНКаз), вода для ПЦР;
- 2.8. ДНК-маркер молекулярного веса 100-1000 пар оснований;
- 2.9. изопропиловый спирт;
- 2.10. трис-ацетатный буферный раствор для агарозного гельэлектрофореза, рН 8,5;
- 2.11. этиловый спирт ректифицированный.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется в несколько этапов в соответствие с алгоритмом, изложенным в приложении.

1. Сбор анамнеза заболевания осуществляется общепринятыми методами.

1.1. Оценка длительности симптомов (кашель, затрудненное дыхание, свистящие хрипы) в период заболевания бронхитом.

Если длительность симптомов более 10 дней, то проводится оценка частоты и времени возникновения симптомов в период заболевания бронхитом в течение 1 года.

1.2. Оценка частоты и времени возникновения симптомов (кашель, затрудненное дыхание, свистящие хрипы) в период заболевания бронхитом в течение 1 года.

Если частота возникновения симптомов более 3 в течение 1 года и (или) возникновение симптомов в ночное время, то проводится оценка наличия возникновения симптомов вне периода заболевания бронхитом.

1.3. Оценка возникновения симптомов (кашель, затрудненное дыхание, свистящие хрипы) вне периода заболевания бронхитом.

Если возникновение симптомов (кашель, затрудненное дыхание, свистящие хрипы) вне периода заболевания бронхитом, то проводится сбор анамнеза жизни.

2. Сбор анамнеза жизни (аллергологический анамнез и наследственный анамнез) осуществляется общепринятыми методами.

2.1. Оценка наличия аллергической сенсibilизации и (или) сопутствующих аллергических заболеваний в анамнезе (атопический дерматит и (или) пищевая аллергия).

2.2. Оценка наличия бронхиальной астмы у родственников пациентов (1 и (или) 2 линии родства).

Если у пациента наличие подпункта 2.1 и (или) 2.2, то проводится молекулярно-генетическое исследование с определением генотипов полиморфных вариантов rs2305479 (ген GSDMB), rs11976862 (ген GLCCI1), rs4559 (ген STAT6).

3. Молекулярно-генетическое исследование с определением генотипов полиморфных вариантов rs2305479 (ген GSDMB), rs11976862 (ген GLCCI1), rs4559 (ген STAT6).

3.1. Взятие биологического материала проводится общепринятыми методами.

Взятие крови осуществляется в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (ЭДТА). Взятие буккального эпителия осуществляется тампон-зондами.

3.2. Выделение геномной ДНК из биологического материала (цельная кровь или буккальный эпителий).

Выделение геномной ДНК осуществляется согласно инструкции производителя набора реагентов. Допускается хранение полученных

образцов ДНК при температуре +2...+8 °С в течение 30 суток. Для длительного хранения (более 30 суток) допускается использование бытовых морозильных камер минус 12...минус 20 °С.

3.3. Определение генотипов rs2305479 (ген GSDMB), rs11976862 (ген GLCCI1), rs4559 (ген STAT6).

3.3.1. Генотипирование rs2305479 (ген GSDMB), rs11976862 (ген GLCCI1), rs4559 (ген STAT6) проводят с помощью метода секвенирования по Сэнгеру с использованием олигонуклеотидных праймеров представленных в таблице 1.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные последовательности праймеров, используемые для генотипирования rs2305479 (ген GSDMB), rs11976862 (ген GLCCI1), rs4559 (ген STAT6)

Код	Направление	Последовательность	Продукт
05479_F	Прямой	TGTGACTCCTGCTTCCCTCT	500 п.о.
05479_R	Обратный	AAGGAGGATATTCGGCAGGA	
76862_F	Прямой	TTTTCCTCTGTGCCCTTTTG	490 п.о.
76862_R	Обратный	GCTACACAGTTTTCCAGGGAGT	
4559_F	Прямой	CTTGGGCACAGTCAGACTCC	531 п.о.
4559_R	Обратный	CACAGGTTAGGGCATGGAAG	

3.3.2. ПЦР проводят с использованием готовой смеси для ПЦР или отдельных компонентов с соблюдением следующих требований: конечный объем реакционной смеси (в пробирке), включающей все компоненты для проведения ПЦР, а также ДНК-матрицу – 25 мкл; концентрация ионов магния в реакционной смеси 2 mM (2 миллимоль/литр); концентрация дНТФ в реакционной смеси 0,2 mM (миллимоль/литр) каждого (дА, дТ, дЦ и дГ); количество термостабильной Taq ДНК-полимеразы 1 единица активности (1 ед.); количество ДНК-

матрицы 100-500 нг; количество каждого олигонуклеотида 10 пикомоль (концентрация 400 наномоль/литр). При использовании растворов олигонуклеотидов с концентрацией 100 пикомоль/мкл требуется использовать 0,1 мкл раствора каждого олигонуклеотида. Рекомендуется готовить общую смесь всех 4 олигонуклеотидов и вносить по 0,2 мкл такого раствора для проведения единичного исследования (реакции).

Протоколы постановки ПЦР с использованием готовой смеси для ПЦР или отдельных компонентов для проведения ПЦР, соответственно, приводятся в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Протокол постановки ПЦР с использованием готовой смеси

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1.	Вода для ПЦР	7,3
2.	Готовая смесь для проведения ПЦР	12,5
3.	Смесь олигонуклеотидов	0,2
4.	ДНК-матрица	5

Таблица 3 – Протокол постановки ПЦР с использованием отдельных компонентов

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1.	Вода для ПЦР	15,85
2.	Раствор хлорида магния (50 мМ)	1
3.	Смесь дНТФ (10 мМ)	0,25
4.	Смесь олигонуклеотидов	0,2
5.	Буферный раствор 10x	2,5
6.	Раствор ДНК-полимеразы (5 ед/мкл)	0,2
4.	ДНК-матрица	5

3.3.3. Программа термоциклирования представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Программа термоциклирования

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	95	2 мин	1
Денатурация	95	5 сек	33
Отжиг	60	10 сек	
Элонгация	72	40 сек	
Финальная элонгация	72	5 мин	

3.3.4. Контроль наличия продуктов ПЦР выполняют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле при 115В в течение 30 минут. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. При наличии в дорожках геля соответствующей полосы ее вырезают и помещают в стерильную пробирку для последующей очистки.

3.3.5. Очистка целевого фрагмента ДНК осуществляется согласно инструкции, предоставляемой производителем соответствующего набора реагентов. Постановка термоциклического секвенирования проводится согласно инструкции производителя соответствующего набора реагентов. Для каждой пробы проводят реакцию с прямым олигонуклеотидом, используемым для постановки ПЦР (таблица 1). В каждую пробирку с реакционной смесью вносят только один олигонуклеотидный праймер.

3.3.6. Очистка продуктов реакции термоциклического секвенирования осуществляется методом преципитации этанолом. Протокол очистки с помощью преципитации этанолом изложен в

инструкции к набору для секвенирования. Распознавание последовательности ДНК проводится в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора согласно инструкции к прибору, с использованием соответствующего программного обеспечения.

3.4. Определение генотипов.

Генотипирование rs2305479 (ген GSDMB). Возможные варианты генотипов: гомозигота CC или TT, гетерозигота CT. Наличие генотипа TT связано с высокой вероятностью развития бронхиальной астмы.

Генотипирование rs11976862 (ген GLCCI1). Возможные варианты генотипов: гомозигота AA или GG, гетерозигота AG. Наличие аллеля G связано с высокой вероятностью развития бронхиальной астмы.

Генотипирование rs4559 (ген STAT6). Возможные варианты генотипов: гомозигота CC или TT, гетерозигота CT. Наличие генотипа CC связано с высокой вероятностью развития бронхиальной астмы у детей в возрасте до 5 лет.

3.5. Интерпретация результатов состоит из 2 последовательных этапов.

3.5.1. На 1 этапе проводится учет результатов генотипирования rs2305479 (ген GSDMB) и rs11976862 (ген GLCCI1).

3.5.2. При выявлении генотипа TT rs2305479 (ген GSDMB) и (или) аллеля G rs11976862 (ген GLCCI1) проводится 2 этап с учетом результатов генотипирования rs4559 (ген STAT6).

3.5.3. При отсутствии выявленного генотипа TT rs2305479 (ген GSDMB) и (или) аллеля G rs11976862 (ген GLCCI1) не проводится 2 этап.

3.5.4. Заключение по интерпретации результатов 1 этапа приводится в таблице 5.

Таблица 5 – Заключение по интерпретации результатов 1 этапа

Варианты генотипов	Вероятность развития бронхиальной астмы	
	Высокая	Общепопу- ляционная
Генотип TT rs2305479 (ген GSDMB)	+	-
Аллель G rs11976862 (ген GLCCI1)		
Генотип TT rs2305479 (ген GSDMB)	+	-
Аллель G rs11976862 (ген GLCCI1)	+	-

3.5.5. На 2 этапе проводится учет результатов генотипирования rs4559 (ген STAT6). Наличие генотипа CC rs4559 (ген STAT6) связано с высокой вероятностью развития бронхиальной астмы у детей в возрасте до 5 лет.

3.6. После завершения молекулярно-генетического исследования необходимо принятие управленческого решения (таблица 6).

Таблица 6 – Принятие управленческого решения

Вероятность	Управленческое решение
Высокая вероятность развития бронхиальной астмы в возрасте до 5 лет	Выполнить объем обязательных и дополнительных исследований (по медицинским показаниям) при первичной диагностике бронхиальной астмы согласно клиническому протоколу «Диагностика и лечение пациентов (детское население) с бронхиальной астмой»
Высокая вероятность развития бронхиальной астмы или общепопуляционная вероятность развития бронхиальной астмы	Повторить пункты 1 и 2 через 1 год

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При использовании метода ПЦР для генотипирования основной причиной ошибок являются факторы, связанные с нарушением правил взятия, хранения и транспортировки проб, загрязненными реагентами, инструментарием, перекрестной контаминацией (загрязнением) продуктами амплификации.

Во избежание данных ошибок необходимо четкое соблюдение правил взятия, хранения и транспортировки образцов; выполнение процедур, связанных с проведением ПЦР-исследования.

Приложение
к инструкции по применению
«Метод прогнозирования развития
бронхиальной астмы у детей с
бронхитом в возрасте до 5 лет»
ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ

Алгоритм выполнения метода

