

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

 26.08.2020 г.

Регистрационный № 005-0220

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ
ИСТМИКО-ЦЕРВИКАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
У ПАЦИЕНТОВ С ДИСПЛАЗИЕЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Инструкция по применению

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

АВТОРЫ: Кононенко И.С., д.м.н., профессор Жукова Н.П.,
Яроцкая Н.Н.

Витебск, 2020

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику истмико-цервикальной недостаточности (далее – ИЦН) (МКБ10 – О34.3) у пациентов с дисплазией соединительной ткани (далее – ДСТ).

Метод предназначен для врачей-акушеров-гинекологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим ДСТ, в амбулаторных и/или стационарных условиях и/или в отделениях дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, РЕАКТИВОВ И Т.Д.

1. Стерильный ламинарный ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха.
2. Высокоскоростная термостатированная центрифуга (от 8000 до 16000 об./мин.) с ротором для пробирок типа «Эппендорф» по 1,5 мл.
3. Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10°C до $+99^{\circ}\text{C}$.
4. Микроцентрифуга-вортекс (от 1500 до 3000 об./мин.).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.
6. Амплификатор.
7. Камера для горизонтального электрофореза.
8. Видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным тубусом, подключенная к персональному компьютеру.
9. УФ-трансиллюминатор.

10. Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2°C до +8°C с морозильной камерой до -20°C.
11. СВЧ-печь.
12. Набор автоматических дозаторов переменного объема (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл).
13. Пробирки пластиковые типа «Эппендорф» по 1,5 мл.
14. Пробирки вакуумные с ЭДТА К3.
15. Штативы для микропробирок по 1,5 мл и наконечников.
16. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл.
17. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл.
18. Перечень праймеров в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Последовательность праймеров для анализа аллельного состояния полиморфных локусов A-8202G гена MMP9 и Arg25Pro гена TGFβ1

Ген	Последовательность праймеров	Длина фрагментов, п.н.
MMP9 rs11697325	[F] – 5'-AAGTTGCTGCTGTTTCAGCGGG-3' [R] – 5'-GTCCTCAGGGCACTGCFGGAT-3'	310 п.н. 489 п.н.
TGF1β rs1800471	[F] – 5'-GGCAGTTGGCGAGAACAGT-3' [R] – 5'-ACCCAGAACGGAAGGAGAGT-3'	111 п.н. 489 п.н.

19. Реактивы в соответствии с таблицами 2, 3.

Таблица 2 – Набор реактивов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Наименование реагента	Назначение реагента	Количество из расчета на 1 исследование
Тaq-полимераза	Фермент, осуществляющий синтез ДНК	1,5 ед.
10x буфер для Таq-	Смесь реактивов для создания	1,5 мкл

полимеразы	условий работы Taq-полимеразы	
MgCl ₂ mM	Донор ионов Mg ²⁺ , необходимых для работы Taq-полимеразы	0,9 мкл
Смесь dNTP 25 mM	Мономер для синтеза ДНК	1,8 мкл
Олигонуклеотидные праймеры 10 pM	«Затравка» для начала синтеза новой нити ДНК	По 0,75 мкл каждого
Полученный ДНК образец из лейкоцитов крови	Матрица для синтеза ДНК	1 мкл
Стерильная деионизованная вода, свободная от нуклеаз	Растворитель	7 мкл

Таблица 3 – Набор реактивов для проведения горизонтального агарозного гель-электрофореза

Наименование реагента/раствора	Количество
3% агароза	
Агароза	3 г
Дистиллированная вода	100 мл
Бромистый этидиум	До конечной концентрации 0,0001%
Трис-ацетатный (ТАЕ) буфер 50x	
Трис-основание	242 г
Ледяная уксусная кислота	57 мл
ЭДТА-Na ₂ 0,5 моль/л (pH 8,0)	100 мл
Дистиллированная вода	До 1 л

20. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
21. Емкость с дезинфицирующим раствором.
22. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

ДСТ.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в данной инструкции, реализуется поэтапно.

1. Получение биологического материала, пробоподготовка и выделение геномной ДНК

1.1. Получение биологического материала (венозной крови) осуществляют из локтевой вены в вакуумную пробирку с ЭДТА в объеме 2 мл. После взятия кровь перемешивают, плавно переворачивая пробирку вверх дном. Неохлажденные пробы необходимо использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК или не более суток при хранении от +4°C до +8°C. Цельная кровь не подлежит заморозке.

1.2. Выделение геномной ДНК из крови проводят в соответствии с общепринятыми методами.

1.3. Полученный раствор ДНК используют для постановки реакции амплификации или хранят при температуре -18°C для последующего анализа.

2. Проведение ПЦР

2.1. Приготовление амплификационной смеси осуществляется в пробирке типа «Эпэндорф» 1,5 мл. Амплификационная смесь объемом 15 мкл должна содержать: 1,5 мкл 10x буфера, 7 мкл стерильной деионизованной воды, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пикомоль/мл), 0,7 мкл MgCl₂ (25mM), 1,5 мкл смеси dNTP (2,5mM), 1 мкл диметилсульфоксида (DMSO), 0,3 мкл (1,5 единицы) Taq-полимеразы.

2.2. В пробирку для амплификации вносится 14 мкл приготовленной амплификационной смеси и добавляется 1 мкл

полученной ДНК-пробы, после чего пробирку следует поместить в амплификатор.

2.3. Амплификация проводится при следующих условиях:

94° – Pause	} 35 циклов
93° – 1 минута	
93° – 10 секунд	
64° – 10 секунд	
72° – 20 секунд	
72° – 1 минута	
10° - Storage	

2.4. Для приготовления агарозного геля следует смешать необходимые объемы ТАЕ буфера 50x и дистиллированной воды (таблица 3) в термостойкой колбе. Смесь расплавляют в СВЧ-печи до полного растворения агарозы, после чего добавляют бромистый этидий. Расплавленную агарозу заливают в камеру с установленной гребенкой. Время до полного застывания геля составляет 60-80 минут. Полученный гель помещают в заполненную ТАЕ 1x буфером камеру для электрофореза.

2.5. Полученные продукты ПЦР вносят в лунки геля, используя индивидуальные наконечники для каждого образца. Электрофоретическое разделение полученных продуктов амплификации проводят при напряжении 100В в течение 60 минут с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете трансиллюминатора.

2.6. Полученная электрофореграмма документируется с помощью системы гель-документирования. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос. Аллели считаются информативными, если на электрофорезе все полосы четкие и одинаковой интенсивности.

3. Интерпретация результатов

3.1. Гомозиготный по аллели 1 генотип полиморфизма A-8202G

гена MMP9 определяется по наличию на электрофореграмме фрагмента аллели длиной 310 п.н., гомозиготный по аллели 2 генотип – по фрагменту только аллели длиной 489 п.н. Гетерозиготный генотип определяется по присутствию обоих фрагментов.

3.2. Гомозиготный по аллели 1 генотип полиморфизма Arg25Pro гена TGFβ1 определяется по наличию на электрофореграмме фрагмента аллели длиной 489 п.н., гомозиготный по аллели 2 генотип – по фрагменту только аллели длиной 111 п.н. Гетерозиготный генотип определяется по присутствию обоих фрагментов.

3.3. Варианты генотипов по полиморфизмам A-8202G гена MMP9, Arg25Pro гена TGFβ1 представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Варианты генотипов по полиморфизмам A-8202G гена MMP9, Arg25Pro гена TGFβ1

Ген	Полиморфизм	Генотип		
		Гомозигота по Аллели 1	Гетерозигота	Гомозигота по Аллели 2
MMP9	A-8202G (rs11697325)	A/A	A/G	G/G
TGFβ1	Arg25Pro (rs1800471)	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro

4. Определение вероятности формирования истмико-цервикальной недостаточности у пациентов с ДСТ

4.1. Определение вероятности формирования истмико-цервикальной недостаточности у пациентов с ДСТ осуществляют в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5 – Ассоциация генотипов полиморфизмов A-8202G гена MMP9, Arg25Pro гена TGFβ1 с вероятностью развития ИЦН

Генотип по полиморфизму A-8202G (rs11697325) гена MMP9	Генотип по полиморфизму A-8202G (rs11697325) гена MMP9	Вероятность формирования ИЦН
G/G A/G	Arg/Pro Arg/Pro	Очень высокая
A/A A/G A/G G/G G/G	Arg/Pro Pro/Pro Arg/Arg Arg/Arg Pro/Pro	Высокая
A/A A/A	Arg/Arg Pro/Pro	Низкая

5. Принятие управленческого решения

5.1. При определении вероятности развития ИЦН как «очень высокая» и «высокая» следует выполнить:

5.1.1. Трансвагинальную ультразвуковую цервикометрию в сроке беременности 11 0/7 – 13 6/7, 16 0/7, 18 0/7 – 21 6/7 недель.

5.1.2. Динамический контроль микробиологического отделяемого влагалища и цервикального канала в сроке беременности 11 0/7 – 13 6/7, 16 0/7, 18 0/7 – 21 6/7 недель с санацией при выявлении патологических изменений.

5.1.3. При выявлении ИЦН руководствоваться Приложением 3 Клинических протоколов «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам в акушерстве и гинекологии» от 19. 02. 2018.

5.2. При определении вероятности развития ИЦН как «низкая» наблюдение пациентов осуществлять в соответствии с Клиническими

протоколами «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам в акушерстве и гинекологии» от 19. 02. 2018.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

Причиной ошибочных результатов при исследовании может быть нарушение правил взятия, хранения и транспортировки биологических проб, использование реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся, загрязнение реагентов, погрешность пипетирования реагентов, перекрестная контаминация продуктов амплификации, присутствие в клиническом образце веществ, ингибирующих ПЦР, нарушение технологии лабораторного тестирования.

Путь устранения – соблюдение правил организации и проведения исследования в ПЦР-лаборатории.