

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Е. Н. Кроткова

29.09.2023 г.

Регистрационный № 060-0623

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ИНГИБИТОРНОЙ ФОРМЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА С ТЯЖЕЛОЙ ГЕМОФИЛИЕЙ А

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»¹

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»²

Авторы: Дмитриев Е.В.¹, к.м.н., доцент Волкова Л.И.², Любушкин А.В.¹

Минск, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложена последовательность действий по выявлению пациентов детского возраста (далее – пациентов) с тяжелой гемофилией А, имеющих высокую вероятность появления патологических ингибиторов свертывания крови. Инструкция предназначена для использования в комплексе медицинских услуг, направленных на выявление ингибиторной формы заболевания среди пациентов с тяжелой гемофилией А.

Настоящая инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-гематологов, врачей-педиатров, а также для других врачей-специалистов, оказывающих специализированную медицинскую помощь пациентам с врожденным дефицитом фактора свертывания крови VIII в условиях организаций здравоохранения III и IV технологических уровней оказания медицинской помощи.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Врожденный дефицит фактора VIII (гемофилия А) (МКБ-10 D66) у пациентов с базовой активностью фактора VIII не более 0,02 МЕ/мл (2,0%), имеющих в анамнезе не более 50 дней введения препарата концентрата фактора свертывания крови VIII (КФСК VIII).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказаний к применению нет.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1: У пациентов с врожденным дефицитом фактора VIII (гемофилия А) (МКБ-10 D66) при показателе базовой активности фактора VIII не более 0,02 МЕ/мл (2,0%), имеющих в анамнезе не более

50 дней введения препарата концентрата фактора свертывания крови VIII (КФСК VIII) в соответствии с Приложением 1 к данной инструкции **выполняют молекулярно-генетическое исследование** гена фактора 8 (*F8*) с целью определения вероятности возникновения патологических ингибиторов свертывания крови. Исследование повторно не проводится при наличии у пациента результатов молекулярно-генетического анализа гена *F8*.

Этап 2: На основании результатов молекулярно-генетического исследования риск появления патологических ингибиторов свертывания крови определяют как **низкий** или **высокий** (низкая или высокая вероятность возникновения ингибиторов, соответственно):

1) К группе низкого риска возникновения ингибиторов относят пациентов с ненулевыми мутациями гена *F8*: миссенс-мутации, мутации в неконсервативных участках сайтов сплайсинга, небольшие делеции или инсерции внутри Poly-A регионов, при которых из-за синтеза некоторого количества белка возможно определение снижения активности фактора VIII в крови пациента.

2) К группе высокого риска возникновения ингибиторов относят пациентов с нулевыми мутациями *F8*: инверсия 22 и 1 интрона, большие делеции, нонсенс-мутации, небольшие делеции и инсерции вне Poly-A регионов, а также мутации в консервативных участках сайтов сплайсинга. У пациентов с перечисленными генетическими аномалиями активность фактора свертывания VIII в крови не достигает пороговой чувствительности метода определения.

Этап 3: Пациентам проводят медицинскую профилактику развития ингибиторной формы гемофилии А с использованием концентрата фактора свертывания крови VIII (КФСК VIII) в соответствии с инструкцией производителя КФСК VIII и постановлением

Министерства здравоохранения Республики Беларусь
от 29.07.2022 г. №80:

1) Пациентам **группы низкого риска** внутривенное введение КФСК VIII для медицинской профилактики развития ингибиторной формы гемофилии А осуществляется в однократной дозе 25-30 МЕ/кг еженедельно в течение 50 недель.

2) Пациентам **группы высокого риска** внутривенное введение КФСК VIII для медицинской профилактики развития ингибиторной формы гемофилии А осуществляется в однократной дозе *10-15 МЕ/кг еженедельно в течение первых 19 недель*. Начиная с 20-й недели введения, еженедельную дозу КФСК VIII увеличивают до 25-30 МЕ/кг и, при отсутствии осложнений, продолжают медицинскую профилактику до 50 недели включительно.

Для контроля медицинской профилактики ингибиторной формы гемофилии А и своевременного выявления возможных осложнений, у пациентов независимо от группы риска перед очередным введением КФСК VIII на 5, 10, 20, 30, 40 и 50-й неделе (фиксированные дни введения) медицинской профилактики пациенту проводят мониторинг остаточной активности фактора свертывания крови VIII и определяют титр ингибиторов к фактору свертывания крови VIII, определяют титр ингибиторов к фактору свертывания крови VIII и регистрируют показатель восстановления коагуляционной активности, равный отношению величины достигнутой коагуляционной активности крови пациента (%) к количеству введенного КФСК VIII на единицу массы тела (МЕ/кг).

Титр ингибиторов менее 0,6 БЕ/мл и увеличение показателя восстановления $1,5 \% / \text{МЕ} \cdot \text{кг}^{-1}$ и более свидетельствуют о соответствии коагуляционного ответа количеству введенного

КФСК VIII, что является основанием для продолжения медицинской профилактики ингибиторной формы заболевания в соответствии с группой риска развития ингибиторной формы.

Возможные осложнения и пути их устранения

1) В случае выявления (в фиксированные дни введения) ингибиторов к фактору свертывания крови VIII в титре 0,6 БЕ/мл и более, или в случае снижения показателя восстановления коагуляционной активности фактора VIII в крови пациента после введения очередной профилактической дозы до 1,4 % / МЕ кг⁻¹ и менее выполняют повторное определение титра ингибиторов и регистрацию прироста коагуляционной активности на очередное введение профилактической дозы КФСК VIII через 1 неделю, независимо от этапа медицинской профилактики.

2) Повторное выявление ингибиторов к фактору свертывания крови VIII в титре 0,6 БЕ/мл и более и/или снижение коагуляционного ответа до 1,4 % / МЕ· кг⁻¹ и менее является основанием для прекращения проведения медицинской профилактики. Пациента переводят на введение препаратов с шунтирующим механизмом действия и определяют дальнейшую тактику в соответствии с Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29.07.2022 г. №80.

Приложение 1

Проведение молекулярно-генетического исследования для определения вероятности развития ингибиторной формы заболевания у пациентов с тяжелой гемофилией А

Оборудование, расходные материалы и реагенты

I. Расходные материалы:

1. Перчатки резиновые/латексные.
2. Дезинфицирующий раствор.
3. Емкость для утилизации отходов и дезсредства.
4. Штатив для пробирок, охлаждающий штатив для пробирок объемом 1,5-2,0 мл и 0,2 мкл.
5. Дозаторы с переменным объемом 0,5 – 10 мкл, 5–50 мкл, 20 – 200 мкл.
6. Одноразовые наконечники с фильтром к дозаторам объемом 0,5 – 10 мкл, 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл.
7. Пробирки объемом 0,2 мл, 0,5 мл, 1,5 мл.
8. Дистиллированная вода/деионизированная вода.

II. Оборудование:

1. Термошейкер.
2. Центрифуга с охлаждением.
3. Центрифуга-вортекс для микропробирок.
4. Термоциклер.
5. Печь СВЧ.
6. Камера для горизонтального электрофореза и блок питания.
7. Система гель документирования.

III. Реагенты:

1. 10x буфер для полимеразы.
2. дНТФ 2 мМ.
3. Таq-полимераза горячего старта (5 ед/мкл).
4. 1x ТАЕ буфер.
5. Агароза для электрофореза.
6. Этидиум бромид.
7. Маркер молекулярных масс.
8. Специфические праймеры (таблица 1, таблица 4).
9. Лигаза T4 и буфер.
10. Рестриктаза VclI и буфер.
11. Диметилсульфоксид 10%

Материал для исследования

Материалом для исследования является периферическая кровь пациента в объеме 2–10 мл в пробирке с антикоагулянтом К2ЭДТА. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяют стандартным способом на градиенте плотности.

Экстракция геномной ДНК

Геномную ДНК выделяют методом фенол-хлороформной экстракции из полученной суспензии мононуклеарных клеток.

Порядок проведения молекулярно-генетического анализа

У 45-50% пациентов с тяжелой формой гемофилии А выявляются инверсии 22 или 1 интронов гена *F8*. В связи с этим, всем пациентам с тяжелой формой гемофилии А выполняют предскрининг на наличие инверсии 22 и 1 интронов гена *F8* методом инвертированной ПЦР и мультиплексной ПЦР, соответственно.

Далее всем пациентам с тяжелой формой гемофилии А, в образцах крови которых методом мультиплексной ПЦР и методом инвертированной ПЦР инверсии 1 и 22 интронов гена *F8* не было выявлено, проводят исследование всех экзонов и прилегающих к ним регионов сплайс-сайтов гена *F8* методом капиллярного или, при наличии возможности, высокопроизводительного секвенирования.

1. Проведение мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления инверсий 1 интрона гена *F8*

Для выявления инверсий 1 интрона гена *F8* в мультиплексной ПЦР используют праймеры в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для скрининга инверсии 1 интрона гена *F8*

Название праймера	Последовательность праймера, 5' → 3'
Int1h-9F	GTTGTTGGGAATGGTTACGG
Int1h-2F	GGGAGGGATCTTGTGTTGGTAAA
Int1h-9cR	CTAGCTTGAGCTCCCTGTGG
Int1h-2R	TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA

Для проведения ПЦР готовят 2 ПЦР-смеси, для основного теста – Mix1, а для комплементарного – Mix2, в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 – Состав смесей для скрининга инверсии 1 интрона гена *F8*

Реагент	ПЦР-смесь Mix 1 на 1 реакцию (мкл)	ПЦР-смесь Mix 2 на 1 реакцию (мкл)
10X буфер для полимеразы	2,5	2,5
2 мМ дНТФ	2,5	2,5
Тақ-полимераза горячего старта	0,125	0,125
Праймер Int1h-9F	0,125	0,125
Праймер Int1h-2F	0,125	0,125
Праймер Int1h-9cR	0,125	—
Праймер Int1h-2R	—	0,125
диметилсульфоксид (10%)	1	1
деионизированная вода	17,5	17,5
V _{смеси}	24	19

В микропробирки раскапывают по 24 мкл каждой из ПЦР-смеси Mix1 и Mix2 и вносят по 1 мкл ДНК (C=100 нг/мкл), перемешивают и осаждают на центрифуге-ворстекс, пробирки ставят в амплификатор по следующей программе амплификации (таблица 3).

Таблица 3 – Программа амплификации для выявления инверсий 1 интрона гена *F8*

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °С	3 мин
35	95°С	30 сек
	65°С	30 сек
	72 °С	2 мин
1	72 С	5 мин
1	12°С	∞

Продукты амплификации визуализируют в 1,5%-ом агарозном геле и архивируют с помощью системы гель-документирования.

Интерпретация результатов ПЦР на инверсию 1 интрона *F8*

Интерпретация основана на наличии фрагментов определенной длины. Размер определяется с использованием стандартного маркера молекулярных масс.

При отсутствии в образце ДНК инверсии 1 интрона в основном ПЦР-тесте визуализируется фрагмент длиной 1,5 тыс.п.о. Наличие инверсии 1 интрона в гемизиготном состоянии в основном ПЦР-тесте подтверждается наличием фрагмента длиной – 1 тыс.п.о.

В комплементарном ПЦР-тесте наличие инверсии 1 интрона определяется фрагментом длиной – 1,5 тыс.п.о. Отсутствие перестройки подтверждается фрагментом длиной 1 тыс.п.о. (рисунок 1).

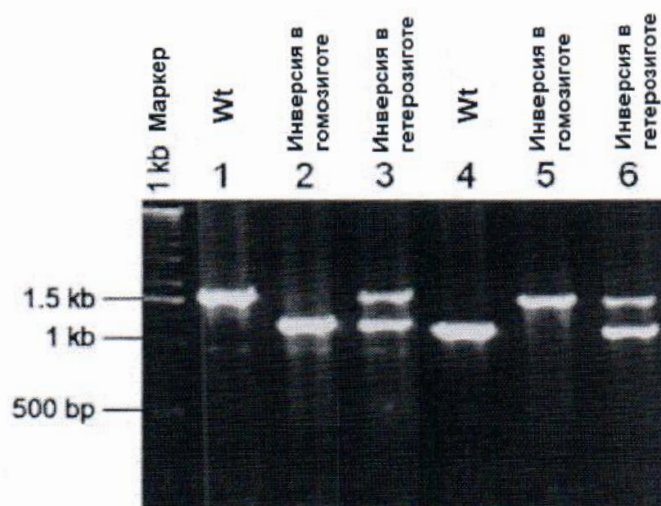


Рисунок 1 – Результат ПЦР при выявлении инверсии 1 интрона гена *F8*

2. Проведение инвертированной ПЦР для выявления инверсии 22 интрона гена *F8*

Геномную ДНК пациента подвергают рестрикции с рестриктазой *BclI* для получения «липких концов» с последующим лигированием T4 лигазой для получения кольцевых фрагментов. Далее проводят амплификацию кольцевых фрагментов с использованием праймеров в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4 – Последовательность праймеров для скрининга инверсии 22 интрона гена *F8*

Название праймера	Последовательность праймера, 5' → 3'
IU	ССТТТCAACTCCATCTCCAT
2U	ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC
3U	СТCACAТTGTGTTCTTGTAGTC
ID	ACATACGGTTTAGTCACAAGT
ED	TCCAGTCACTTAGGCTCAG

Для проведения ПЦР готовят 2 ПЦР-смеси, для основного теста – Mix1, а для комплементарного – Mix2, в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4 – Состав ПЦР-смесей для выявления инверсии 22 интрона гена *F8* методом инвертированной ПЦР

Реактив	ПЦР-смесь Mix 1 1 реакция (мкл)	ПЦР-смесь Mix 2 1 реакция (мкл)
10X буфер для полимеразы	2,5	2,5
2 mM дНТФ	2,5	2,5
Тақ-полимераза горячего старта	0,125	0,125
Праймер IU	0,125	0,125
Праймер 2U	0,125	0,125
Праймер 3U	0,125	0,125
Праймер ID	0,125	—
Праймер ED	—	0,125
диметилсульфоксид (10%)	1	1
деионизированная вода	12,375	12,375
V _{смеси}	19	19

В микропробирки раскапывают по 19 мкл каждой из ПЦР-смесей Mix1 и Mix2 и вносят по 6 мкл полученных кольцевых фрагментов

ДНК, перемешивают и осаждают на центрифуге-ворстекс, пробирки ставят в амплификатор по следующей программе амплификации (таблица 5):

Таблица 5 – Программа амплификации для выявления инверсии 22 интрона гена *F8* методом инвертированной ПЦР

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °С	3 мин
35	95°С	30 сек
	57°С	30 сек
	72 °С	1 мин
1	72 °С	5 мин
1	12 °С	∞

Продукты амплификации визуализируют в 1,5%-ом агарозном геле и архивируют с помощью системы гель-документирования.

Интерпретация результатов ПЦР на инверсию 22 интрона гена *F8*

Интерпретация основана на наличии фрагментов определенной длины. Размер определяется с использованием стандартного маркера молекулярных масс.

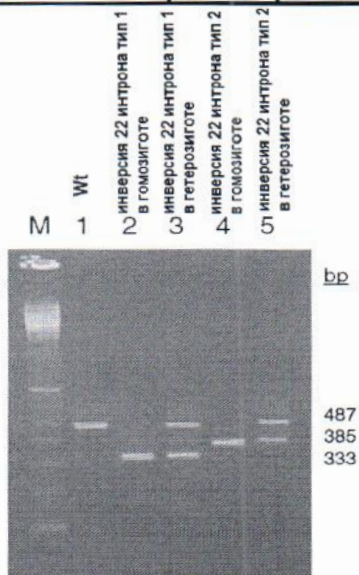
При отсутствии в образце ДНК инверсии 22 интрона в основном ПЦР-тесте визуализируется фрагмент длиной 487 п.о. При наличии инверсии 22 интрона 1 типа в гемизиготном состоянии определяется участок длиной 333 п.о. Наличие инверсии 22 интрона 2 типа диагностируется при наличии фрагмента размером 385 п.о. (рисунок 2А).

При наличии инверсии 22 интрона 1 типа в гемизиготном состоянии в комплементарном ПЦР-тесте визуализируются фрагмент длиной 559 п.о. и фрагмент – 457 п.о. При инверсии 22 интрона 2 типа определяется фрагмент длиной 559 п.о. и фрагмент – 405 п.о.

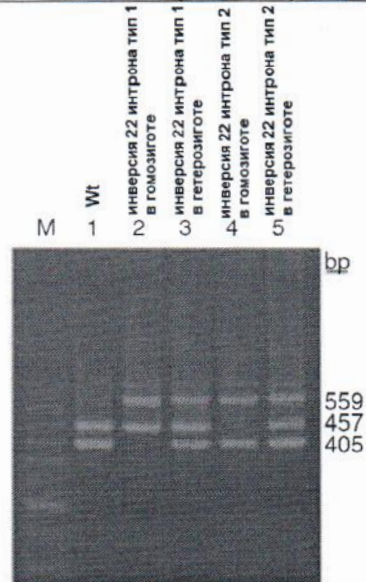
Отсутствие перестройки подтверждается фрагментами – 457 и 405 п.о. (рисунок 2Б).

Инверсия 22 интрона	Праймеры	IU	2U	3U
Основной ПЦР-тест	ID	487	385	333

Инверсия 22 интрона	Праймеры	IU	2U	3U
Комплементарный ПЦР-тест	ED	559	457	405



А



Б

А – Результаты основного ПЦР-теста;

Б – Результаты комплементарного ПЦР-теста

Рисунок 2 – Результат ПЦР при выявлении инверсии 22 интрона *F8*

3. Исследование экзонов и сплайс-сайтов гена *F8* методом секвенирования

Подбор праймеров к экзонам и сплайс-сайтам *F8* осуществляется с использованием программного обеспечения Primer3Plus или аналогов. В качестве референсных последовательностей используется сборка генома человека версии GRCh38.

В состав реакционной смеси для ПЦР входят: 10x буфер для полимеразы (2,5 мкл), 2 мМ дНТФ – 2,5 мкл, Taq-полимераза горячего старта (5 ед/мкл) – 0,125 мкл, праймеры – по 0,125 мкл, ДНК – 100 нг, вода – до конечного объема реакции 25 мкл. После амплификации проводят визуализацию ПЦР-продуктов с использованием электрофореза в агарозном геле и измерение концентрации – методом флуориметрии.

Секвенирование ПЦР-продуктов проводят на генетическом анализаторе капиллярного типа, при наличии возможности, анализатора для высокопроизводительного секвенирования, с использованием реагентов, предназначенных для конкретного прибора. Биоинформационный анализ олигонуклеотидных последовательностей экзонов и сплайс-сайтов гена *F8* проводят с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis 7.0, BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3, NCBI BLAST или их аналогов.

Интерпретация результатов секвенирования

Выявленные олигонуклеотидные отличия от референсной последовательности сравнивают с базами данных ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>), gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), EAHAD *F8* database (<https://f8-db.eahad.org/>) и CHAMP (CDC Haemophilia A Mutation Project, <https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>).