

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Е.Л.Богдан
«14» _____ 2025 г.
Регистрационный № 042-0825



МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ СЕПСИСА У ДЕТЕЙ И МОЛОДЫХ ВЗРОСЛЫХ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: к.б.н., доцент Полякова Е.А., Мательский Н.А., к.м.н., доцент
Горбич О.А., к.т.н., доцент Красько О.В., д.м.н., профессор Солнцева А.В.

Минск, 2025

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

дНТФ – смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ);

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром;

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии;

ПЗТ – почечно-заместительная терапия;

ПК – периферическая кровь;

П.н – пары нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СА-ОПП – сепсис-ассоциированное острое почечное повреждение;

CD14 – мембранный гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок, экспрессированный на поверхности клеток миелоидного ряда;

NAVCR1 – ген, кодирующий Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен 1;

KIM-1 – молекула повреждения почек KIM-1 (от англ. (kidney injury molecule 1));

IL6 – ген, кодирующий цитокин интерлейкин – 6;

IL18 – ген, кодирующий цитокин интерлейкин – 18;

TLR4 – толл-подобный рецептор 4 (от англ. toll-like receptor 4);

TNF- α – фактор некроза опухоли (от англ. Tumor necrosis factor).

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод прогнозирования тяжелого течения сепсиса (шифр по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, десятого пересмотра – A40 Стрептококковый сепсис, A41 Другой сепсис, R57.2 Септический шок) у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, который может быть использован в рамках лечения пациентов с онкогематологическими заболеваниями и сопутствующими инфекционными осложнениями.

Справочно:

Суть метода, изложенного в настоящей инструкции, заключается в прогнозировании на основании выявления генетических изменений в последовательности ДНК генов врожденного иммунного ответа (TLR4, CD14), цитокинов (TNF- α , IL18) а также гена HAVCR1, кодирующего трансмембранный белок 1-го типа (KIM-1) для определения вероятности развития сепсис-индуцированного острого повреждения почек.

Для целей настоящей инструкции под тяжелым течением сепсиса понимают: септический шок, развитие тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), сепсис-ассоциированного острого почечного повреждения (СА-ОПП), развитие «хронического критического состояния» (длительность нахождения в ОРИТ ≥ 14 суток с наличием сопутствующей органной дисфункции (SOFA ≥ 2 баллов)), 28-дневная летальность, повторный эпизод сепсиса в течение года, требующий госпитализации в ОРИТ.

Настоящая инструкция предназначена для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-гематологов, врачей-анестезиологов-реаниматологов и иных врачей-специалистов, осуществляющих лечение пациентов с онкогематологическими заболеваниями и сопутствующими инфекционными осложнениями в стационарных условиях.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Онкогематологические заболевания (шифр по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, десятого пересмотра – C00 – D48– новообразования; D50 – D89 – болезни крови).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА, цитрат натрия).

Планшеты 96-луночные для секвенирования.

Аспиратор.

Камера для горизонтального электрофореза.

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза.

ПЦР-амплификатор.

Генетический анализатор для капиллярного секвенирования методом Сэнгера.

Набор реагентов для проведения ПЦР.

Набор реагентов для очистки продуктов ПЦР из агарозного геля.

Олигонуклеотиды.

ДНК-маркеры соответствующей молекулярной массы.

Набор реагентов для проведения реакции секвенирования.

Деионизированный формамид, используемый для ресуспендирования образцов ДНК перед электрокинетической инъекцией в системах капиллярного электрофореза.

Наборы реагентов, предназначенные для экстракции ДНК из цельной периферической крови.

Наборы реагентов, предназначенные для экстракции ДНК из образцов буккального эпителия.

Наборы реагентов, предназначенные для очистки продуктов реакции секвенирования.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод включает следующие этапы:

1. Получение биологического материала и подготовка образцов ДНК для исследования (пробоподготовка)

Для взятия периферической крови используют пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА, цитрат натрия). Далее содержимое пробирки перемешивают путем покачивания.

Для взятия буккального эпителия используют стерильную ватную палочку, которой необходимо аккуратно потереть внутреннюю поверхность щеки, совершая круговые движения, чтобы собрать клетки эпителия.

1.1 Выделение ДНК из цельной периферической крови

Выделение ДНК осуществляется методом фенол-хлороформной экстракции либо с использованием наборов реагентов, предназначенных для экстракции ДНК из периферической крови согласно инструкции производителя.

1.2 Выделение ДНК из образцов буккального эпителия

При химиоиндуцированной цитопении с количеством лейкоцитов менее $1 \times 10^9/\text{л}$ выделение ДНК может быть проведено не из лейкоцитов ПК, а из буккального эпителия пациента с использованием наборов реагентов, предназначенных для экстракции ДНК из образцов буккального эпителия согласно инструкции производителя.

Внимание! Для пациентов со 100% донорским химеризмом после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и цитопенией должен быть использован биологический материал донора, чей трансплантат был использован для лечения пациента.

2 Проведение ПЦР-амплификации по заданному генетическому профилю

Для проведения ПЦР-амплификации используют наборы реагентов, предназначенных для ПЦР согласно инструкции производителя.

В реакционную смесь добавляют олигонуклеотиды, которые указаны в таблицах 1-6 в количестве и объеме, указанных в инструкции производителя соответствующих наборов.

Таблица 1 – Последовательности пар олигонуклеотидов для ПЦР-амплификации аллельных вариантов в кодирующей части гена *TLR4* (NM 138557.3): с.296A>G p.(Asp99Gly); с.596C>T p.(Thr199Ile)

Название мишени	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.
TLR4_Прямой	CCATCGTTTGGTTCTGGGAGA	61	507
TLR4_Обратный	AGTTGTTCTAAGCCCAAGAAGT		

Таблица 2 – Последовательности пар олигонуклеотидов для ПЦР-амплификации аллельных вариантов в некодирующей части гена *TLR4* (NM 138557.3): с.*1205G>A

Название мишени	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.
TLR4 (нес)Прямой	GTACCCTTCTCACTGCCAGG	61	207
TLR4(нес)Обратный	TCTGTTTCTGAGGAGGCTGG		

Таблица 3 – Последовательности пар олигонуклеотидов для ПЦР-амплификации аллельных вариантов гена *TNF-α* (NM 000594.4): -308G>A

Название мишени	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.
TNF-α_Прямой	CACAGACCTGGTCCCCAAAA	61	157
TNF-α_Обратный	AGGATACCCCTCACACTCCC		

Таблица 4 – Последовательности пар олигонуклеотидов для ПЦР-амплификации аллельных вариантов гена *HAVCR1* (NM_001173393.3): с.536T>C p.(Leu179Pro); с.619A>G p.(Thr207Ala)

Название мишени	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.
HAVCR1_Прямой	TCGAACGAGCACCCTGTTC	61	353

HAVCRI_Обратный	CCCAGGTAAGACCCCTCACT		
-----------------	----------------------	--	--

Таблица 5 – Последовательности пар олигонуклеотидов для ПЦР-амплификации аллельных вариантов гена *CD14* (NM 001562.4): -159C>T

Название мишени	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н
CD14_Прямой	TAAGGTAGGGGGATTGGGGG	61	357
CD_Обратный	CGGCTGCCTCTGACAGTTTA		

Таблица 6 – Последовательности пар олигонуклеотидов для ПЦР-амплификации аллельных вариантов гена *IL18* (NM 000591.4): -607C>A

Название мишени	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Температура отжига, °C	Длина ПЦР-продукта, п.н
IL18_Прямой	TTGGTATCCCTCTCCCAAG	61	618
IL18_Обратный	AACAGGCTCTTTCCTAGGGC		

ПЦР-амплификация проводится по протоколу, указанному в инструкции производителя, используемого набора.

2.1 Визуализация продуктов ПЦР-амплификации

По окончании амплификации ПЦР-продукты вносят в 1,5% агарозный гель в полном объеме и проводят гель-электрофорез при напряжении 170В и силе тока 230 мА в течение 30 мин.

Для визуализации результатов ПЦР-реакции после гель-электрофореза, положение ПЦР –продуктов в агарозном геле сравнивают с положением ДНК-маркера соответствующей молекулярной массы посредством использования камеры для гель-документирования.

2.2 Очистка ПЦР-продуктов из агарозного геля

Для очистки от неспецифичных продуктов амплификации ПЦР-продукты соответствующего размера (в соответствии с ДНК-маркером молекулярной массы) вырезают из агарозного геля пластиковым шпателем и помещают образец в пробирку объемом 0,5 мл. Затем к образцу ПЦР добавляют 50 мкл воды и элюируют в течение 1-1,5 часа при температуре +40°C.

Очистка ПЦР-продуктов также может быть проведена с применением наборов реагентов, используемых для данных целей, согласно инструкции производителя соответствующих наборов.

3 Секвенирование ДНК по заданному генетическому профилю

3.1 Проведение секвенирующей циклической ПЦР

Внесение в пробирки объемом 0,2 мл всех компонентов реакции и ПЦР-продуктов проводится на льду/с использованием штативов для пробирок, поддерживающих температуру от 0 до +4°C.

Секвенирующую реакцию циклической ПЦР проводят с использованием наборов реагентов, предназначенных для секвенирования, согласно инструкции производителя. Амплификацию проводят согласно

протоколу, указанному в инструкции производителя к используемым реагентам.

3.2 Очистка ПЦР-продуктов от красителей и терминаторов

Проводят очистку ПЦР-продуктов от не связавшихся флюоресцентно-меченных дНТФ с использованием наборов реагентов, предназначенных для очистки продуктов реакции секвенирования, согласно инструкции производителя. По окончании процесса очистки в каждую пробирку с ПЦР-продуктами добавляют 15 мкл формамида. Проводят денатурирование образцов ДНК при температуре +95°C в течение 5 минут с охлаждением до температуры +4°C в течение 1 минуты.

3.2 Капиллярный электрофорез

Образцы ПЦР-продуктов переносят в 96-луночный планшет для секвенирования. Помещают в генетический анализатор, предназначенный для капиллярного секвенирования по Сэнгеру. Задают программу согласно спектральной калибровке генетического анализатора для капиллярного секвенирования по Сэнгеру согласно инструкции производителя.

4. Определение вероятности тяжелого течения сепсиса

В случае:

наличия полиморфизма в гене *TLR4* (с.*1205G>A) определяется высокая вероятность развития септического шока;

наличия полиморфизма в гене *TLR4* p.(Asp99Gly); p.(Thr199Ile) определяется высокая вероятность развития повторного эпизода сепсиса, требующего госпитализации в ОРИТ;

наличия полиморфизма в гене *HAVCR1* p.(Leu179Pro) определяется высокая вероятность развития 28-дневной летальности;

отсутствия полиморфизма в гене *HAVCR1* p.(Thr207Ala) определяется высокая вероятность развития СА-ОПП;

наличия полиморфизма в гене *TNF-α* (-308G>A) определяется высокая вероятность развития СА-ОПП;

наличия полиморфизма в гене *CD14* (-159 C>T) определяется высокая вероятность развития «хроническое критическое состояние»;

наличия полиморфизма в гене *IL18*-607C>A определяется высокая вероятность развития тяжелого ОРДС.

5. Принятие управленческого решения

При высокой вероятности развития септического шока, необходимо принимать меры согласно пункту № 52 приложения 2 «Оказание медицинской помощи пациентам (взрослое население) с инфекционными и паразитарными заболеваниями в стационарных условиях» клинического протокола «Диагностика и лечение пациентов (взрослое население) с инфекционными и паразитарными заболеваниями», утвержденного постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь (далее – Минздрав) от 13.12.2018 № 94.

При высокой вероятности развития тяжелого ОРДС, необходимого принимать меры согласно приложению 1 клинического протокола «Ранняя диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома у пациентов с тяжелыми пневмониями вирусно- бактериальной этиологии», утвержденного постановлением Минздрава от 01.06.2017 № 48.

При высокой вероятности развития СА-ОПП, принимать меры согласно главе 4 и приложения 4 клинического протокола «Диагностика и лечение пациентов (взрослое население) с острым почечным повреждением», утвержденного постановлением Минздрава от 02.08.2021 № 93.

При высокой вероятности развития «хронического критического состояния», необходимо принимать меры по проведению дополнительного (по показаниям) мониторинга, указанного в пункте 9 главы 2 «Принципы интенсивной терапии критических состояний» клинического протокола «Оказание медицинской помощи пациентам в критических для жизни состояниях», утвержденного постановлением Минздрава от 23.08.2021 № 99.

При высокой вероятности развития 28-дневной летальности, принимать меры проведению дополнительной (по показаниям) диагностики, указанной согласно страницам 74-82 приложения 1 клинического протокола «Диагностика и лечение детей с инфекционными заболеваниями при оказании медицинской помощи в амбулаторных и стационарных условиях районных, областных и республиканских организаций здравоохранения Республики Беларусь», утвержденного постановлением Минздрава от 24.08.2012 № 961.

При отсутствии полиморфизмов наблюдается низкая вероятность тяжелого течения сепсиса. Лечение пациентов с онкогематологическими заболеваниями проводится в соответствии с клиническим протоколом «Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями» № 113 от 05.12.2022 г.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА

1. Использование реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: соблюдать условия хранения.

2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно поверять автоматические дозаторы переменного объема.

3. Отсутствие сигналов флуоресценции при секвенировании.

Устранение: соблюдать требования к объемам вносимых реагентов, количеству и концентрации ДНК-матрицы.