МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра – Главный государственный санитарный врач Республики Беларусь
_____ Н.П. Жукова
«19» декабря 2018 г.
Регистрационный № 024-1118

МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ, ЗАНЯТЫХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ФАКТОРА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-
РАЗРАБОТЧИКИ:
Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ:
канд. мед. наук А.В. Зеленко, Е.А. Семушина, Е.С. Щербинская, О.К. Синякова, канд.хим.наук А.С. Бабенко

Минск, 2018

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
19.12.2018
Регистрационный № 024-1118

МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ, ЗАНЯТЫХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ФАКТОРА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены», ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»

АВТОРЫ: канд. мед. наук А. В. Зеленко, Е. А. Семушина, Е. С. Щербинская, О. К. Синякова, канд. хим. наук А. С. Бабенко

Минск 2018

ГЛАВА 1
НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки риска развития заболеваний у работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, на основе гигиенических и молекулярно-биологических исследований. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику производственно обусловленных заболеваний у работников машиностроительной отрасли.

2. Инструкция предназначена для врачей-гигиенистов, осуществляющих государственный санитарный надзор, врачей-профпатологов и иных специалистов организаций здравоохранения, проводящих медицинскую профилактику в стационарах и (или) в амбулаторных условиях.

ГЛАВА 2
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В инструкции используются следующие термины и определения:

амплификация — процесс образования дополнительных копий участков хромосомной ДНК, как правило, содержащих определенные гены либо сегменты структурного гетерохроматина;

буккальный эпителий — эпителий внутренней стороны щеки;

буфер — раствор, применяемый для выделения и манипуляций с ДНК;

вредный производственный фактор — фактор производственной среды и (или) трудового процесса, воздействие которого в определенных условиях на организм работающего может сразу или впоследствии привести к заболеванию, в т. ч. смертельному, или отразиться на здоровье потомства пострадавшего, или в отдельных специфичных случаях перехода в опасный производственный фактор — вызвать травму;

заболевание — расстройство здоровья человека, нарушение нормальной жизнедеятельности его организма, в т. ч. в результате травм, ранений, увечий, контузий, врожденных дефектов и неотложных состояний;

интегральный показатель риска — количественный показатель, сформированный с учетом медико-биологических, гигиенических и генетических критериев, определяющий риск возникновения заболеваний у работника;

комплексный показатель риска — количественный показатель, отражающий риск возникновения заболеваний у работника, учитывающий медико-биологические и гигиенические критерии;

комплексная гигиеническая оценка условий труда (КГО) — итоговая гигиеническая оценка на рабочем месте всех факторов производственной среды и трудового процесса с установлением класса условий труда в соответствии с критериями «Гигиенической классификации условий труда»;

оценка риска — процесс анализа риска воздействия идентифицированных вредных и опасных производственных факторов на организм работающего для выработки решений по защите от данного риска;

полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе);

праймер — это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы (при репликации ДНК);

пробоподготовка — выделение общей фракции ДНК из забранных образцов (материала);

профессиональный риск — вероятность повреждения здоровья или утраты трудоспособности либо смерти работающего в результате воздействия вредных и (или) опасных производственных факторов;

секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности;

сорбент — твердые или жидкие вещества, избирательно поглощающие из окружающей среды газы, пары или растворенные соединения.

ГЛАВА 3
ХАРАКТЕРИСТИКА ГИГИЕНИЧЕСКИХ И МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ, ФОРМИРУЮЩИХ КОМПЛЕКСНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ РИСКА РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ФАКТОРА

1. Для оценки риска развития заболеваний у работников машиностроительной отрасли, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, необходимо изучить следующие критерии:

пол;

класс условий труда;

общий стаж работы;

стаж в условиях воздействия химического производственного фактора.

2. Риск развития заболеваний в условиях воздействия химического производственного фактора зависит от пола работника. Уровень риска оценивается по таблице 1.

Таблица 1. — Риск развития заболеваний в условиях воздействия химического производственного фактора в зависимости от пола

Пол	Риск развития заболеваний для работника	Уровень риска
Мужской	Риск развития заболеваний снижен по сравнению с женским полом	Средний
Женский	Риск развития заболеваний возрастает в 1,264 раз по сравнению с мужским полом	Высокий

3. Комплексная оценка условий труда по степени вредности и опасности проводится в соответствии с Гигиенической классификацией условий труда, Гигиеническими нормативами, регламентирующими уровни факторов производственной среды, тяжести и напряженности трудового процесса.

4. По итогам комплексной гигиенической оценки условий труда либо данным аттестации рабочих мест, устанавливающих класс вредности и опасности воздействия на работника каждого производственного фактора в отдельности и общий класс труда на рабочем месте, проводится качественная оценка уровня риска влияния на здоровье производственных факторов согласно таблице 2.

Таблица 2. — Влияние класса условий труда на состояние здоровья работников

Класс условий труда	Характеристики состояния здоровья, прогноз для работника	Уровень риска
Допустимый (2)	Функциональные изменения организма восстанавливаются во время регламентированного отдыха или к началу следующей смены и не оказывают неблагоприятного действия на здоровье	Низкий
Вредный (3.1)	Функциональные изменения восстанавливаются, как правило, при более длительном, чем к началу следующей смены, прерывании контакта с вредными факторами и увеличивают риск повреждения здоровья	Средний
Вредный (3.2)	Стойкие функциональные изменения, приводящие к росту показателей временной нетрудоспособности, повышению уровня заболеваемости болезнями, которые отражают состояние наиболее уязвимых органов и систем для конкретных вредных факторов, появление начальных признаков профессиональных заболеваний, возникающих после продолжительной экспозиции (15 лет и более)	
Вредный (3.3)	Развитие, как правило, профессиональных болезней легкой и средней степени тяжести с потерей профессиональной трудоспособности, рост хронической производственно обусловленной патологии, повышенный уровень временной нетрудоспособности	Высокий
Вредный (3.4)	Тяжелые формы профессиональных заболеваний с потерей общей трудоспособности, значительный рост числа хронических заболеваний и высокие уровни временной нетрудоспособности	

5. Условия труда, которые классифицируются как «опасные» (класс 4), не принимаются в расчет, так как работа в таких условиях допустима только при ликвидации аварий, проведении работ для предотвращения аварийных ситуаций в соответствующих средствах индивидуальной защиты и при строгом соблюдении режимов труда, регламентированных для такого вида работ, обеспечивающих безопасность для здоровья.

6. Для определения влияния уровня риска, обусловленного общим стажем, на заболеваемость работников, необходимо оценить величину общего стажа согласно таблице 3.

Таблица 3. — Риск развития заболеваний у работников в зависимости от общего стажа работы

Общий стаж	Риск развития заболеваний для работника	Уровень риска
До 10 лет	Риск развития заболеваний минимальный	Низкий
10–20 лет	Риск развития заболеваний у работников возрастает в 1,393 раза	Средний
Более 20 лет	Риск развития заболеваний у работников возрастает в 1,628 раза	Высокий

Увеличение общего стажа повышает риск развития заболеваний у работников, занятых в условиях химического производственного фактора.

7. Риск развития заболеваний возрастает в зависимости от увеличения стажа работы в условиях воздействия химического производственного фактора (таблица 4).

Таблица 4. — Риск развития заболеваний в зависимости от стажа работы в условиях воздействия химического производственного фактора

Общий стаж	Риск развития заболеваний для работника	Уровень риска
До 1 года	Риск развития заболеваний минимальный	Низкий
1–10 лет	Риск развития заболеваний у работников возрастает в 2,014 раза	Средний
Более 10 лет	Риск развития заболеваний возрастает в 2,335 раза	Высокий

ГЛАВА 4
РАСЧЕТ РИСКА РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ФАКТОРА С УЧЕТОМ ГИГИЕНИЧЕСКИХ И МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ

1. Для выявления риска развития заболеваний у работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, с учетом гигиенических и медико-биологических критериев и его качественной характеристики используется балльная оценка.

2. Для каждого уровня риска, определяющего критерий, устанавливается балльная оценка согласно таблице 5.

Таблица 5. — Определение балльного значения выделенных критериев для расчета интегрального показателя риска

Уровень риска	Балльная оценка
Низкий	0,1
Средний	0,2
Высокий	0,3

3. Установленная балльная оценка для каждого уровня риска по медико-биологическим и гигиеническим критериям позволяет провести расчет комплексного показателя риска согласно формуле 1:

$$R = 1 – (1–A) \times (1–B) \times (1–C) \times (1–D), \quad (1)$$

где R — комплексный показатель риска;

A — балльная оценка уровня риска в зависимости от пола;

B — балльная оценка уровня риска в зависимости от класса условий труда;

C — балльная оценка уровня риска в зависимости от общего стажа;

D — балльная оценка уровня риска в зависимости от стажа в условиях воздействия химического производственного фактора.

4. Полученный комплексный показатель риска в зависимости от своего балльного значения сопоставляется с риском возникновения заболеваний у работников согласно таблице 6.

Таблица 6. — Качественная характеристика риска развития заболеваний в зависимости от значения интегрального показателя риска

Балльный диапазон	Уровень риска
Не более 0,42	Низкий
0,48–0,64	Средний
0,65 и выше	Высокий

ГЛАВА 5
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ, ЗАНЯТЫХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ФАКТОРА

1. При необходимости проведения углубленных исследований для оценки риска развития заболеваний у работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, рекомендовано выявление генетических критериев.

2. Для изучения генетических критериев необходимо использовать технологии ПЦР в режиме реального времени, указанные в приложении к инструкции.

Установление наличия генетических критериев возможно только после исследования последовательности образцов ДНК.

3. Перечень генетических критерий, обусловливающих риск развития заболеваний у работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, указан в таблице 7.

Таблица 7. — Характеристика генетических маркеров, увеличивающих риск развития заболеваний у работников

Критерий	Его характеристика	Уровень риска
Замена (SNP) rs1056827 (Ala119Ser) гена CYP1B1	Повышает риск развития хронических неинфекционных заболеваний	Высокий
Замена (SNP) rs10012 (Arg48Gly) гена CYP1B1	Повышает риск развития хронических неинфекционных заболеваний	Высокий
Гаплотип 2 гена CYP1B1, замены (SNP) rs10012 (Arg48Gly) и rs1056827 (Ala119Ser) в тандеме	Повышает риск развития заболеваний, связанных с контактом с полициклическими ароматическими углеводородами	Высокий

4. При выявлении аномалий нативной последовательности ДНК, т. е. одного или нескольких генетических критериев, риск развития заболевания у работника можно считать высоким вне зависимости от длительности стажа в условиях воздействия химического производственного фактора и других критериев, указанных в главе 3 настоящей инструкции.

5. При выявлении одного или нескольких генетических критериев риск развития заболеваний у работников машиностроительной отрасли, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, в количественной оценке выражается 0,9 балла. При отсутствии аномалий нативной последовательности ДНК риск выражается 0,1 балла.

ГЛАВА 6
ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ, ЗАНЯТЫХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ФАКТОРА НА ОСНОВЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ, ГИГИЕНИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ

1. Риск развития заболеваний у работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, определяется по значению интегрального показателя риска, который имеет количественное значение.

2. Интегральный показатель риска (ИПР) отображает индивидуальный уровень риска развития заболеваний у работника, занятого в условиях воздействия химического производственного фактора.

3. ИПР включает в себя медико-биологические, гигиенические и генетические критерии: пол, класс условий труда, общий стаж, стаж работы в условиях химического производственного фактора, наличие замены (SNP) rs1056827 (Ala119Ser) гена CYP1B1, наличие замены (SNP) rs10012 (Arg48Gly) гена CYP1B1, наличие гаплотипа 2 гена CYP1B1, замены (SNP) rs10012 (Arg48Gly) и rs1056827 (Ala119Ser) в тандеме.

4. Балльная шкала критериев риска развития заболеваний у работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора представлена в таблице 8.

Таблица 8. — Балльная шкала критериев риска развития заболеваний у работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, на основе гигиенических и молекулярно-генетических критериев

Критерий	Балльная оценка	Качественная характеристика риска
Пол: мужской женский	 0,2 0,3	 Средний Высокий
Класс условий труда: 2 3.1–3.2 3.3–3.4	 0,1 0,2 0,3	 Низкий Средний Высокий
Общий стаж, лет: <10 10–20 >20	 0,1 0,2 0,3	 Низкий Средний Высокий
Стаж в условиях воздействия химического производственного фактора, лет: <1 1–10 >10	 0,1 0,2 0,3	 Низкий Средний Высокий
Наличие аномалий нативной последовательности ДНК: нет есть	 0,1 0,9	 Низкий Абсолютный

5. ИПР рассчитывается по формуле 2:

$$ИПР = 1 – (1–A) \times (1–B) \times (1–C) \times (1–D) \times (1–E). \quad (2)$$

где A — балльная оценка уровня риска в зависимости от пола;

B — балльная оценка уровня риска в зависимости от класса условий труда;

C — балльная оценка уровня риска в зависимости от общего стажа;

D — балльная оценка уровня риска в зависимости от стажа в условиях воздействия химического производственного фактора;

E — балльная оценка уровня риска в зависимости от наличия аномалий нативной последовательности ДНК.

6. По полученному значению ИПР проводится оценка риска развития заболеваний у работника, занятого в условиях воздействия химического производственного фактора. Диапазон значений, определяющих уровень риска:

низкий: до 0,48 балла;

средний: 0,53–0,68 балла;

высокий: более 0,72 балла.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Забор материала

Материалом для исследования служат клетки внутренней поверхности щеки — буккальный эпителий (материал, биологический материал). Забор материала осуществляют с помощью специальных одноразовых приспособлений (зондов) на хлопчатобумажной или полимерной основе. Транспортировка, хранение материала осуществляется общепринятым способом.

Молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования по Сэнгеру

Перечень необходимых олигонуклеотидных праймеров приведен в таблице 9.

Таблица 9. — Перечень необходимых олигонуклеотидных праймеров (F — прямой, R — обратный):

Ген	Анализируемый участок	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
CYP1B1	1 экзон	TTTGACTCTGGAGTGGGAGTG CTCGGCAGACAGACTGACCT
CYP1B1	2 экзон, часть 1	GTGTCACGCCTTCTCCTCTC CGAAACACACGGCACTCAT
CYP1B1	2 экзон, часть 2	AACGTCATGAGTGCCGTGT TTTACCTGGTGAAGAGGAGGAG
CYP1B1	3 экзон, часть 1	GCTCACTTGCTTTTCTCTCTCC TCTTGGATTCCCACCAAAAA
CYP1B1	3 экзон, часть 2	TCTGAAGGTAGCATTCTTTGGAG CCACTAACTTCAACTGGAACTCAA
CYP1B1	3 экзон, часть 3	CCAAATTCATGGCATGCTTA GGCAAGCCTGCTTTGTGTAG
CYP1B1	3 экзон, часть 4	CAGGCTTGCCCAGTACATTT TTTTGGTAATGGTGTCCCAGT
CYP1A1	1 экзон	CGTACAAGCCCGCCTATAAA ATGGGCAAGTCCTCCTCTTC
CYP1A1	2 экзон	CCAATCTGACGGCTTGACTT CTGCCTTTCCCCAGACTGTA
CYP1A1	3–6 экзон	TGGGTTTGAGATCTTGCTCA CAGCCTTTCCTCTGCATCTC
CYP1A1	7 экзон	TCAGCTGTCTCCCTCTGGTT CACATTTTTGGATACCTGGGTTA

Амплификацию исследуемых участков ДНК методом ПЦР производят согласно изложенному ниже протоколу:

1. Приготовить необходимый объем амплификационной смеси из расчета 25 мкл на 1 реакцию (1хПЦР буфер, 2 мМ $MgCl_2$, 200 мкМ готовой смеси dNTP, по 10 пкМ праймеров, 1 ЕД полимеразы, 50-150 нг ДНК, довести H_2O), или же, при использовании готовых смесей для ПЦР, согласно протоколам производителя, но в объеме не менее 15 мкл на реакцию.

2. Пробирки поместить в амплификатор и выполнить ПЦР согласно следующей программе: 95 ºС в течение 3 мин (первичная денатурация, может включать дополнительные стадии в зависимости от требований инструкций

производителей различных смесей для ПЦР, далее циклирование 35 раз 95 ºС в течение 10 с, 60 ºС в течение 90 с, финальная элонгация 72 ºС в течение 5 мин.

После окончания ПЦР провести качественную оценку продукта в 2 % неденатурирующем агарозном геле с использованием ТАЕ буферного раствора.

Продукты амплификации разделяют в 2 % агарозном геле (5 мкл продукта, 120 В — 10 мин) и детектируют при помощи трансиллюминатора.

При получении гомогенного ПЦР-продукта, представленного только одной полосой, без шлейфа, возможно прямое осаждение в мягких условиях для очистки от праймеров и других компонентов ПЦР без использования коммерческих наборов. Состав смеси для очистки продуктов амплификации указан в таблице 10.

Таблица 10. — Смесь для очистки продуктов амплификации

Реактив	Количество на 1 пробу
Бидистиллированная вола	5 мкл
Ацетат аммония 5М	1,5 мкл
Этанол 96 %	44 мкл
Всего	49,5 мкл

Конечная концентрация ацетата аммония — 0,125 М, этанола — 70 %.

Очистка ПЦР-продуктов:

1. Смешать в чистой микропробирке объемом 1,5 мл 10 мкл ПЦР-продукта и 50 мкл смеси ацетата аммония с этанолом.
2. Перемешать с помощью вортекса. Допускается смешивание посредством переворотов пробирки.
3. Инкубировать при комнатной температуре в течение 20 мин.
4. Центрифугировать при 14 000 об/мин в течение 15 мин. Допускается центрифугирование при 12 000 об/мин. В течение 20 мин.
5. Удалить надосадочную жидкость.
6. Внести 500 мкл 70 % этанола (4 ºС). Перевернуть несколько раз для ополаскивания стенок пробирки.
7. Инкубировать в термостате при 65 ºС в течение 10–20 мин до полного высыхания осадка.
8. Растворить осадок в 20 мкл дистиллированной воде или 1х ТЕ буферном растворе. Допускается увеличение объема элюента до 100 мкл.
9. Произвести электрофорез аликвоты (5 мкл) полученного образца в 2 % агарозном геле.

Реакция секвенирования выполняется сразу после очистки продуктов ПЦР.

Для реакции секвенирования следует приготовить необходимый объем реакционной смеси из расчета 10 мкл на 1 реакцию секвенирования:

Big Dye Terminator kit v3.1 — 0,5–4 мкл;

буферный раствор для секвенирования — 2 мкл;

праймер — 0,3 мкл;

очищенный продукт амплификации — 1–5 мкл;

бидистиллированная вода до 10 мкл.

Реакция проводится отдельно с прямым и обратным праймерами.

Очистка продуктов реакции секвенирования производится при помощи коммерческих наборов согласно протоколам производителя или методом прямого осаждения. Состав смеси для очистки продуктов реакции секвенирования указан в таблице 11.

Таблица 11. — Смесь для очистки продуктов реакции секвенирования

Реактив	Количество на 1 пробу
ЭДТА 0,5М	2,5 мкл
Этанол 96 %	32 мкл
Всего	34,5 мкл

1. Добавить 10 мкл продукта реакции секвенирования к 34,5 мкл смеси ЭДТА с этанолом.
2. Перемешать с помощью вортекса. Допускается перемешивание посредством многократного переворачивания пробирки.
3. Инкубировать при -12–20 ºС в течение 1 ч. Допускается инкубация в течение 24 ч при условии соблюдения того же температурного режима.
4. Центрифугировать при 14 000 об/мин в течение 15 мин. Допускается центрифугирование при 12 000 об/мин в течение 20 мин.
5. Удалить надосадочную жидкость.
6. Внести 30 мкл 70 % этанола (4 ºС). Перевернуть несколько раз для ополаскивания стенок пробирки.
7. Инкубировать в термостате при 65 ºС в течение 10–20 мин до полного высыхания осадка. При отсутствии видимого фронта осадка — до полного высыхания стенок и дна пробирки.
8. Добавить 20 мкл Hi-Di формамида.
9. Денатурировать образцы при 95 ºС в течение 3 мин.
10. Инкубировать образцы, при -12–20 ºС в течение 5 мин.

Очищенные продукты реакции секвенирования загружаются в генетический анализатор, запрограммированный согласно используемым реагентам.

Полученные последовательности ДНК сравниваются с референсными, размещенными в электронной базе данных NCBI

Молекулярно-генетическое исследованием методом ПЦР в режиме реального времени (TaqMan)

Исследование генетического материала, содержащегося в полученных указанным выше способом образцах общей фракции ДНК, допускается проводить методом ПЦР в режиме реального времени.

В этом случае анализ выполняется на наиболее распространенный патологический гаплотип гена CYP1B1, а именно гаплотип 2, включающий SNP rs1056827 (Ala119Ser) и rs10012 (Arg48Gly) в тандеме.

Таблица 12. — Перечень необходимых праймеров

Наименование	Нуклеотидная последовательность 5’→3’
rs1056827F	AGGGCTCGGCCTTCG
rs1056827R	CCTTCCAGTGCTCCGAGTAG
rs1056827W	FAM-GCCGGCCTTCGCCTCCT-BHQ1
rs1056827M	ROX-G(LNA-C)CGTCCTTCGCCTCCT-BHQ2
rs10012F	GCTGGCCACTGTGCATGT
rs10012R	GAGCGAACGAGAGGTGAGC
rs10012W	FAM-C(LNA-G)(LNA-G)CAGCTCCGGTCC-BHQ1
rs10012M	ROX-C(LNA-G)(LNA-G)CAGCTCGGGTCC-BHQ2

1. Буферный раствор А для ПЦР.
2. Смесь дНТФ 50х.
3. Вода для ПЦР.
4. Термостабильная Taq ДНК-полимераза
5. Раствор хлорида магния 50 мМ.

Постановка ПЦР проводится согласно представленному ниже плану:

1. В чистом боксе подготовить пробирки (планшет, стрипы) объемом 0,2 мл с оптической крышкой из расчета 2 пробирки на 1 образец ДНК.

2. Рассчитать необходимый объем компонентов ПЦР, исходя из числа образцов, которые планируется проанализировать. Приготовить премикс, исходя из сделанного расчета, воспользовавшись таблицей 13.

Таблица 13. — Реакционная смесь реагентов для постановки ПЦР без учета ДНК-матрицы (5 мкл)

Компоненты	Количество на 1 пробу (мкл)
Вода для ПЦР	15
Смесь дНТФ	0,25
Хлорид магния	1
Смесь праймеров	1
Буфер А	2,5
Полимераза	0,25
*— N — количество образцов, включая ПКО, ОКО и один дополнительный образец на каждые 8 физически доступных образцов.	

1. Полученную смесь следует аликвотировать в пробирки по 20 мкл.

Объемы компонентов реакционной смеси, приведенные в таблице, включают 1 запасной образец. Это позволяет избежать ошибок пипетирования.

2. Внести по 5 мкл образца ДНК.
3. Закрыть пробирки.
4. Установить все пробирки в блок твердотельного амплификатора и провести ПЦР в режиме реального времени по следующей программе, приведенной в таблице 14 с учетом объема реакционной смеси, равного 25 мкл.

Таблица 14. — Программа амплификации

Температура,°С	Время		Число циклов
	мин	с	
95	3		
95	0	10	40
60*	0	59	
* — регистрация флуоресценции по каналам FAM (дикий тип) и ROX (мутантный тип).			

Анализ данных

После исследования последовательности образцов ДНК следует приступить к анализу полученных данных.

В случае использования «Молекулярно-генетического исследования методом секвенирования по Сэнгеру» следует проверить соответствие отсеквенированных последовательностей экзонов гена CYP1B1 референсным из международной базы данных Gene Bank.

В случае обнаружения аномалий нативной последовательности ДНК следует провести поиск соответствующих SNP в базе данных NCBI/SNP.

Особое внимание должно быть уделено участкам последовательности ДНК гена CYP1B1, в которых располагаются rs1056827 и rs10012, составляющие гаплотип 2.

В случае использования «Молекулярно-генетического исследования методом ПЦР в режиме реального времени (TaqMan)» следует оценить наличие гомозиготы дикого типа — рост флуоресценции по каналу FAM, гомозиготы мутанта — по каналу ROX, гетерозиготы — рост по каналу FAM и ROX.

В случае обнаружения rs1056827 и rs10012, составляющих гаплотип 2, рассматривать образец в контексте риска, связанного с его наличием.

В случае выявления отдельных SNP не в паре, рассматривать риск, связанный только с получением SNP.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Использование реагентов с истекшим сроком годности или реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: не использовать реагенты с истекшим сроком годности и соблюдать условия их хранения.

2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно поверять дозаторы переменного объема.

3. Нарушение в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

Приложение

Генетические исследования для оценки риска развития заболеваний у работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора, с использованием технологии полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Реактивы и расходные материалы

1. Набор реагентов для выделения ДНК (сорбционный принцип, включая мини-колонки или суспензию сорбента).

2. Набор реагентов для ПЦР в режиме реального времени, включая раствор хлорида магния (25–50 мМ), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (10–100 мМ), воду для ПЦР (или MillliQ воду), термостабильную Taq ДНК-полимеразу с 5’-3’экзонуклеазной активностью, соответствующий буферный раствор (обеспечивает работу полимеразы).

3. Олигонуклеотиды синтетические (праймеры).

4. Спирт этиловый 96 % (используется для выделения ДНК).

5. Микропробирки объемом 1,5 мл.

6. Микропробирки объемом 0,2 мл или микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, имеющие маркировку для ПЦР и оптические крышки к ним.

7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для дозаторов переменного объема 0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл.

8. Штативы полипропиленовые для пробирок 0,2 и 1,5 мл.

9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

11. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

12. Набор реагентов для реакции секвенирования.

13. Реагенты для гель-электрофореза с использованием агарозы.