

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Е.Н.Кроткова

« 29 » 2023 г.

Регистрационный № 078-0723

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ И
НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА COVID-19 НА ОСНОВАНИИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПЛЕКСА ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет»,
государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии
НАН Беларуси», учреждение здравоохранения «Гродненская областная
инфекционная клиническая больница»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Матиевская Н.В., Кузнецова Е.В.,
к.б.н., доцент Морозик П.М., д.м.н., доцент Козловский В.И.,
Горчакова О.В., Красько Ю.П.

Гродно, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод прогнозирования тяжелого течения и неблагоприятного исхода COVID-19 на основании определения комплекса генетических маркеров, что позволит персонифицировать медицинскую профилактику и лечение COVID-19.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-инфекционистов, врачей-терапевтов, врачей общей практики, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с SARS CoV-2-инфекцией в условиях стационара и/или амбулаторных условиях.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Наличие хотя бы одного из заболеваний/состояний, отнесенных к факторам риска тяжелого течения COVID-19 (в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.06.2022 № 841):

E10-E14. Сахарный диабет;

E65-E68. Ожирение (ИМТ > 30 кг/м²);

Z32.1. Беременность;

I50. Хронические заболевания сердца с сердечной недостаточностью;

хронические заболевания легких (J45. Бронхиальная астма, J44.

Хроническая обструктивная болезнь легких, J44.9.

Бронхоэктатическая болезнь и т.д.);

C00-C97. Злокачественные новообразования;

Z94.8. Трансплантация солидных органов или костного мозга;

A15-A19. Туберкулез;

M30-M36. Системные поражения соединительной ткани.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И ДР.

I. Молекулярно-генетические исследования:

1. Стандартное оборудование для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее – ДНК) из биологического материала человека (миницентрифуга, шейкер-инкубатор, автоматические дозаторы переменного объёма).

2. Оборудование для амплификации специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим разделением продуктов методом электрофореза или детекцией продуктов ПЦР в реальном времени.

3. Расходные материалы (пробирки для образцов крови с ЭДТА, пробирки с крышкой объёмом 1,5 мл, пробирки стрипованные низкопрофильные с крышками объёмом 0,2 мл, стерильные сменные наконечники для дозаторов различного объёма, перчатки медицинские).

4. Реагенты (набор реактивов для выделения ДНК, дезинфицирующие средства, буферный раствор для ПЦР, аллель-специфичные зонды, сверхчистая вода (Milli-Q)).

Дозаторы переменного объема должны пройти ежегодную поверку/аттестацию в аккредитованной организации.

Для предотвращения контаминации, в зоне постановки ПЦР должны быть обеспечены стерильные условия.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Проведение молекулярно-генетического тестирования.

1. В качестве биологического материала для молекулярно-генетического анализа используется ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови или буккального эпителия.

2. Получение, транспортировка и хранение материала, анализ данных осуществляется общепринятыми методами.

3. Выявление высокой вероятности тяжелого клинического течения коронавирусной инфекции осуществляется на основании выявления олигонуклеотидных полиморфизмов генов: ACE I/D rs4646994; ACE2 rs2074192, rs2285666 и rs413031713; AGT rs699; LZTFL1 rs10490770; IL6R rs2228145.

4. Для идентификации полиморфных вариантов генов используется амплификация специфических последовательностей ДНК

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией показателей флуоресценции в режиме реального времени.

Этап 2. Интерпретация результатов молекулярно-генетического тестирования.

Для выявления высокой вероятности тяжелого течения COVID-19 осуществляется генетическое тестирование по 5 полиморфным вариантам генов (таблица 1).

Таблица 1 – Гены для оценки вероятности тяжелого течения COVID-19

Ген	Вариант	Описание	Аллели	
<i>ACE2</i> (ген ангиотензин-превращающего фермента 2)	rs2285666	ACE2 – это мембраносвязанный рецептор, экспрессирующийся в легких, сердце, почках, эндотелии и желудочно-кишечном тракте. Он расщепляет ангиотензин II до ангиотензина 1-7. Аллель А связан с повышенной вероятностью тяжелого течения COVID-19 по сравнению с аллелем G	G	A
	rs2074192	Аллель А связан с повышенной вероятностью тяжелого течения COVID-19 по сравнению с аллелем G	G	A
<i>LZTFL1</i>	rs10490770	Ген экспрессируется в клетках легких человека и кодирует белок, участвующий в транспорте других белков к первичным ресничкам клеток мерцательного эпителия. Аллель С ассоциирован с повышенной вероятностью тяжелого течения COVID-19 по сравнению с аллелем Т	T	C
<i>AGT</i> (ген ангиотензиногена)	rs699	Ангиотензиноген является ранним предшественником ангиотензина II, играющего ключевую роль в регуляции артериального давления, почечной гемодинамики, водного и электролитного гомеостаза. Аллель А связан с повышенной вероятностью тяжелого течения COVID-19 по сравнению с аллелем G	C	A
<i>IL6R</i> (рецептор ИЛ6)	rs2228145	Через рецептор проявляет своё действие ИЛ-6, провоспалительный цитокин, один из основных компонентов агрессивного иммунного воспаления (цитокинового шторма) при COVID-19	A	C

Высокая вероятность тяжелого течения COVID-19 прогнозируется при выявлении следующих маркеров:

1. комбинации А-А локусов *ACE2* rs2074192 и rs2285666 (OR = 3,1, 95% ДИ 1,1-8,6, p=0,031);

2. носительства гетерозиготного генотипа *LZTFL1* rs10490770 Т/С (OR=2,8, 95% CI 1,5-5,2, p=0,005);

3. аллельной комбинации А-А-С между тремя локусами: *ACE2* rs2074192, *ACE2* rs2285666 и *AGT* rs699, соответственно (OR = 4,2, 95% ДИ 1,1-9,4, p < 0,0001);

4. аллельной комбинации I-C-G-A-T-C по локусам *ACE* I/D rs4646994, *LZTFL1* rs10490770, *ACE2* rs2074192, rs2285666 и rs413031713, *IL6R* rs2228145, соответственно – (OR = 6,4, 95% ДИ 1,1-37,0, p = 0,039).

Для выявления высокой вероятности неблагоприятного исхода COVID-19 осуществляется генетическое тестирование по 2 полиморфным вариантам генов *ACE2* rs2285666 и *LZTFL1* rs10490770 (таблица 2).

Таблица 2. – Гены для оценки вероятности неблагоприятного исхода COVID-19

Ген	Вариант	Описание	Аллели	
<i>ACE2</i> (ген ангиотензин-превращающего фермента 2)	rs2285666	<i>ACE2</i> – это мембраносвязанный рецептор, экспрессирующийся в легких, сердце, почках, эндотелии и желудочно-кишечном тракте, расщепляет ангиотензин II до ангиотензина 1-7. Аллель А связан с повышенной вероятностью неблагоприятного исхода COVID-19 по сравнению с аллелем G	G	A
<i>LZTFL1</i>	rs10490770	Ген экспрессируется в клетках легких человека и кодирует белок, участвующий в транспорте других белков к первичным ресничкам клеток мерцательного эпителия. Аллель С ассоциирован с повышенной вероятностью неблагоприятного исхода COVID-19 по сравнению с аллелем T	C	T

Высокая вероятность неблагоприятного исхода COVID-19 прогнозируется при выявлении следующих генетических маркеров:

1. носительство генотипов Т/С и С/С гена *LZTFL1* rs10490770 – (OR=3,2, 95% CI 1,3-9,0, p=0,016);

2. носительство гетерозиготного генотипа G/A и гомозиготного генотипа A/A для локуса гена *ACE2* rs2285666 – (OR=2,9, 95% CI 1,1-7,6, p=0,03).

Вероятность тяжелого течения коронавирусной инфекции повышена при наличии у пациентов любого из представленных генотипов /аллельных комбинаций.

Вероятность неблагоприятного исхода коронавирусной инфекции повышена при наличии у пациентов любого из представленных генотипов.

Если у пациента выявляется неполная аллельная комбинация, она не считается генетическим фактором риска тяжелого течения и неблагоприятного исхода COVID-19.

При выявлении неблагоприятных генетических маркеров течения и исхода COVID-19 пациенту показана вакцинация и ревакцинация от SARS CoV-2.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
<p>Нарушение этапов пробоподготовки:</p> <p>1. Взятие крови в пробирку с несоответствующей маркировкой с наполнителем;</p> <p>2. Нарушение режима центрифугирования образца;</p> <p>3. Неправильное хранение забранного биоматериала</p>	<p>1. Невнимательность медперсонала, заводской брак пробирки;</p> <p>2. Перед началом центрифугирования не было проверено соответствие установленной скорости и времени центрифугирования с указанными в инструкции параметрами для проведения исследования;</p> <p>3. Невнимательность медперсонала</p>	<p>1. Повторный забор крови в соответствующую пробирку;</p> <p>2. Корректировка времени и скорости центрифугирования, повторное выполнение данной процедуры;</p> <p>3. Повторный забор биоматериала с соблюдением всех этапов пробоподготовки и последующего хранения материала</p>

название

учреждения

Здравоохранения

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач

_____ И.О.Фамилия

_____ 20 _____

МП

А К Т

о внедрении результатов научных исследований в лечебную практику

1. Наименование предложения для внедрения: Метод прогнозирования тяжелого течения и неблагоприятного исхода COVID-19 на основании определения комплекса генетических маркеров (ACE rs4646994; ACE2 rs2074192, rs2285666 и rs413031713; AGT rs699; LZTFL1 rs10490770; IL6R rs2228145).

2. Кем предложена разработка: сотрудниками УО «Гродненский государственный медицинский университет»: д.м.н., профессором Н.В.Матиевской, ассистентом Е.В.Кузнецовой, доцентом В.И.Козловским, старшим научным сотрудником НИЛ НИЧ О.В.Горчаковой, к.б.н., доцентом, заместителем директора по научной работе ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» П.М.Морозиком, заместителем главного врача УЗ «Гродненская областная инфекционная клиническая больница» Ю.П.Красько.

3. Источник информации:

4. Краткая аннотация разработки:

5. Где внедрено:

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____

Общее количество наблюдений _____ .

Из них: положительные _____, отрицательные _____.

7. Эффективность внедрения (*восстановление трудоспособности, снижение заболеваемости, рациональное использование коечного фонда, врачей кадров и медицинской техники*)

8. Замечания, предложения _____

_____ 20 _____ Ответственные за внедрение

_____ Должность

_____ подпись

_____ И.О.Фамилия

Примечание: акт о внедрении направлять по адресу:
кафедра инфекционных болезней
УО «Гродненский государственный медицинский университет»ул.Горького, 80, 230009, г.Гродно