

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 168-1218



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ:

Д.м.н., доцент С.М. Комиссарова, к.б.н. Н.Н. Чакова, С.С. Ниязова,
Е.Ю. Захарова

Минск, 2018

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия

ЛП – левое предсердие

ЛЖ – левый желудочек

МК – митральный клапан

ПСД – передне-систолическое движение

ТМЖП – толщина межжелудочковой перегородки

ГД ВТЛЖ – градиент давления в выносящем тракте левого
желудочка

NGS - высокопроизводительное секвенирование

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения вероятности развития гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинской профилактику ГКМП.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-кардиологов, врачей-терапевтов, врачей-кардиохирургов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ГКМП в амбулаторных и стационарных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ И МАТЕРИАЛОВ

1. ЭХО-кардиограф.
2. Электрокардиограф.
3. Аппарат для проведения суточного мониторирования ЭКГ (СМ ЭКГ).
4. Оборудование для генетических исследований: термостат, морозильная камера на -20°C , медицинская центрифуга, микроцентрифуга, флуориметр Quantus (Promega, США), амплификатор, камера для горизонтального электрофореза, трансиллюминатор, автоматические пипетки переменного объема; шейкер; секвенатор нового поколения, предназначенный для высокопроизводительного секвенирования (NGS).
5. Реактивы для проведения генетических исследований: выделение ДНК (трис-гидрохлорид (Tris-HCl), хлорид натрия (NaCl), дигидратдинатриевой соли (Na_2EDTA), гидроксид натрия (NaOH), неионное поверхностно активное вещество Triton X-100, хлорид магния

(MgCl₂), сахара, раствор SDS, протеиназа К, смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт, хлороформ, этиловый спирт, деионизированная вода); для измерения концентрации ДНК (набор реагентов QuantiFluor® ONE dsDNA System); для пробоподготовки и секвенирования (набор реагентов «TruSight™ Cardio Sequencing Panel», Illumina, США) или аналогичный, включающий праймеры для всех кодирующих последовательностей генов *MYH7*, *MYBPC3*, *ACTC1*, *MYL3*, *MYL2*, *TNNC1* и *TPM1*; для электрофореза (агароза, бромистый этидий, краситель для нанесения продукта на гель).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Гипертрофическая кардиомиопатия (142.1, 142.2).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острый инфаркт миокарда (121).

Острое нарушение мозгового кровообращения (163).

Тромбоэмболия легочной артерии (126).

Злокачественные новообразования (C00 – C97).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1 Этап - определение толщины стенки миокарда левого желудочка (ЛЖ) по результатам визуализирующих методик: эхокардиографии (ЭхоКГ), магнитно-резонансной томографии (МРТ) или компьютерной томографии сердца (КТ).

2 Этап – определение наличия мутации в одном из генов *MYH7*, *MYBPC3*, *ACTC1*, *MYL3*, *MYL2*, *TNNC1* и *TPM1*, кодирующих саркомерные белки, которые могут быть причиной ГКМП, методом высокопроизводительного секвенирования (NGS-технология).

Последовательность проведения генетического тестирования:

- провести забор венозной крови в объеме 2,0 мл в вакутайнер или в стерильную пробирку, содержащую цитрат натрия. На этикетке должны быть указаны шифр пациента и дата забора крови;
- выделить ДНК фенол-хлороформным методом с последующей очисткой ДНК спиртами согласно стандартному протоколу или любым другим способом с использованием готовых наборов реагентов для выделения ДНК;
- измерить концентрацию 2-цепочечной ДНК с использованием набора реагентов QuantiFluor® ONE dsDNA System на флуориметре Quantus (Promega, США) и довести концентрацию ДНК сначала до значения 10 мкг/мл, а затем – 5 мкг/мл;
- осуществить пробоподготовку с использованием набора «TruSight™ Cardio Sequencing Panel», включающую этапы тагментации, обогащения, амплификации и очистки геномной ДНК согласно протоколу производителя. Возможно использование аналогичных наборов реагентов, содержащих праймеры для экзонов генов *MYH7*, *MYBPC3*, *ACTC1*, *MYL3*, *MYL2*, *TNNC1* и *TPM1*;
- провести валидацию подготовленной библиотеки с использованием горизонтального электрофореза в 1,5-2% агарозном геле и измерения ее концентрации на флуориметре Quantus (Promega, США);
- разбавить библиотеку до концентрации 1,25 нМ, добавить контрольную библиотеку PhiX (2%), поместить в ячейку картриджа с реагентами для секвенирования;

- установить картридж в полногеномный секвенатор Miseq (Illumina, США), загрузить все данные об образцах в программное обеспечение секвенатора и запустить прогон секвенирования;
- проаннотировать полученные результаты секвенирования с использованием специального программного обеспечения ANNOVAR, позволяющего оценить патогенность выявленного генетического варианта на основе баз данных dbSNP, 1000genomes, GWAS, HGMD, и предсказательных модулей Polyphen2, SIFT и MutationTaster; установить мутацию, ответственную за развитие гипертрофической кардиомиопатии.

3 Этап – определение вероятности развития ГКМП

1. Высокая вероятность:

– толщина стенки миокарда ЛЖ ≥ 15 мм;

– наличие мутации в одном из генов *MYH7*, *MYBPC3*, *ACTC1*, *MYL3*, *MYL2*, *TNNC1* и *TPM1*, кодирующих саркомерные белки.

2. Низкая вероятность:

– толщина стенки миокарда ЛЖ < 15 мм;

– отсутствие патогенной мутации в генах *MYH7*, *MYBPC3*, *ACTC1*, *MYL3*, *MYL2*, *TNNC1* и *TPM1*, кодирующих саркомерные белки.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ

Нет