

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ И.В. Гаевский  
25.03.2014  
Регистрационный № 015-1213

**АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ ПЕРЕСАДКЕ ПОЧКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр  
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т.В. Амвросьева, канд. биол. наук Н.В. Поклонская,  
З.Ф. Богуш, Е.П. Кишкурно

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-трансплантологов, врачей-инфекционистов, врачей лабораторной диагностики. Инструкция содержит описание алгоритма лабораторной диагностики вирусных инфекций у доноров и реципиентов почки.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Автоклав.
- 2 Автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл.
3. Анализатор иммуноферментный или мультискан.
4. Вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз).
5. Гомогенизатор механический.
6. ДНК-маркер 50–1000 пар оснований.
7. Иономер.
8. Источник тока для электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
9. Изопропанол.
10. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия).
11. Камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
12. Ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой.
13. Набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
14. Набор для выделения ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе.
15. Набор для выделения ДНК с помощью экстракции гуанидин-изотиоцианолом.
16. Набор реагентов для амплификации ДНК вирусов простого герпеса I и II типов.
17. Набор реагентов для амплификации ДНК вируса варицелла-зостер.
18. Набор реагентов для амплификации ДНК цитомегаловируса.
19. Набор реагентов для амплификации ДНК аденовирусов.
20. Набор реагентов для амплификации ДНК БК-полиомавируса.
21. Набор реагентов для амплификации ДНК вируса Эпштейна–Барр.
22. Набор реагентов для амплификации ДНК парвовируса В 19.
23. Набор реагентов для амплификации ДНК вируса герпеса человека VI типа.
24. Наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой «RNAse, DNase free» (0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл).
25. Набор инструментов: ножницы, скальпель, пинцеты.
26. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки объемом 0,5; 0,2 мл с маркировкой «RNAse, DNase free»).

27. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ).
28. Система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
29. Система для автоматической промывки планшетов.
30. Транспортная среда.
31. Тест-система для выявления антител класса G к цитомегаловирусу методом ИФА.
32. Тест-система для выявления антител класса G к вирусу Эпштейна–Барр методом ИФА.
33. Тест-система для выявления антител класса G к вирусам простого герпеса I и II типов методом ИФА.
34. Термостат, регулируемый до  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
35. Термоциклер.
36. Трансиллюминатор (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
37. Хлороформ, х.ч. по ТУ 2631-02-11291058-96.
38. Центрифуга рефрижераторная на 1–5 тыс. об./мин.
39. Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф» не менее 14000 об./мин).
40. Центрифуга-вортекс.
41. Холодильник-морозильник ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$ ).
42. Этиловый спирт по ГОСТ 5962-67.

## **ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Объектами исследований являются:

- кровь;
- клетки крови;
- сыворотка крови;
- моча;
- биопсийный/аутопсийный материал.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Противопоказания для осуществления вирусологического обследования доноров и реципиентов с использованием в качестве клинического материала крови и мочи отсутствуют.

Противопоказания к проведению генодиагностики *in situ* соответствуют противопоказаниям для выполнения инвазивной процедуры забора биопсии почки.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **1. Порядок вирусологического обследования доноров и реципиентов почки**

Лабораторная диагностика вирусных инфекций у пациентов при пересадке почки осуществляется в отношении цитомегаловируса (ЦМВ), БК-полиомавируса (БКВ), вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирусов простого герпеса I и II типов (ВПГ I и II т.), вируса герпеса человека VI типа (ВГЧ VI), варицелла-зостер вируса (ВЗВ),

аденовирусов (АдВ), парвовируса В19 (ПВ В19), вируса гепатита В (ВГВ), вируса гепатита С (ВГС), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) по схеме, состоящей из 2 этапов (до и после трансплантации) и представленной на рисунке.

### *1.1. Обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации*

1.1.1. Серологическое обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации в отношении ЦМВ, ВЭБ, ВПГ I и II типов:

Цель — определить серологический статус в отношении ВПГ I и II типов, ЦМВ, ВЭБ и последующая оценка результатов серологического обследования для формирования пар донор/реципиент (Д/Р).

Метод выбора — ИФА.

Объект исследований — сыворотка крови.

Выявляемые маркеры — Ig G к ЦМВ, ВЭБ, ВПГ I и II т.

Периодичность исследований — однократно до взятия органа для трансплантации.

Возможные варианты серологического статуса пар Д/Р — Д+/Р+, Д-/Р+, Д-/Р-, Д+/Р-.

Далее по серостатусу обследуемых пар определяется принадлежность к одной из возможных групп риска возникновения и развития посттрансплантационных вирусных осложнений: для сероварианта Д-/Р- — группа минимального риска, для серовариантов Д+/Р+, Д-/Р+ — группа среднего риска, для сероварианта Д+/Р- — группа высокого риска. Данные о серостатусе пар Д/Р являются основой для планирования антивирусной профилактики и лечения реципиентов, а также для выработки рекомендаций по нецелесообразности использования почки от серопозитивного донора для пересадки серонегативному реципиенту.

1.1.2. Обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации в отношении БКВ-инфекции. Цель — выявление активной инфекции.

Метод выбора — качественная ПЦР.

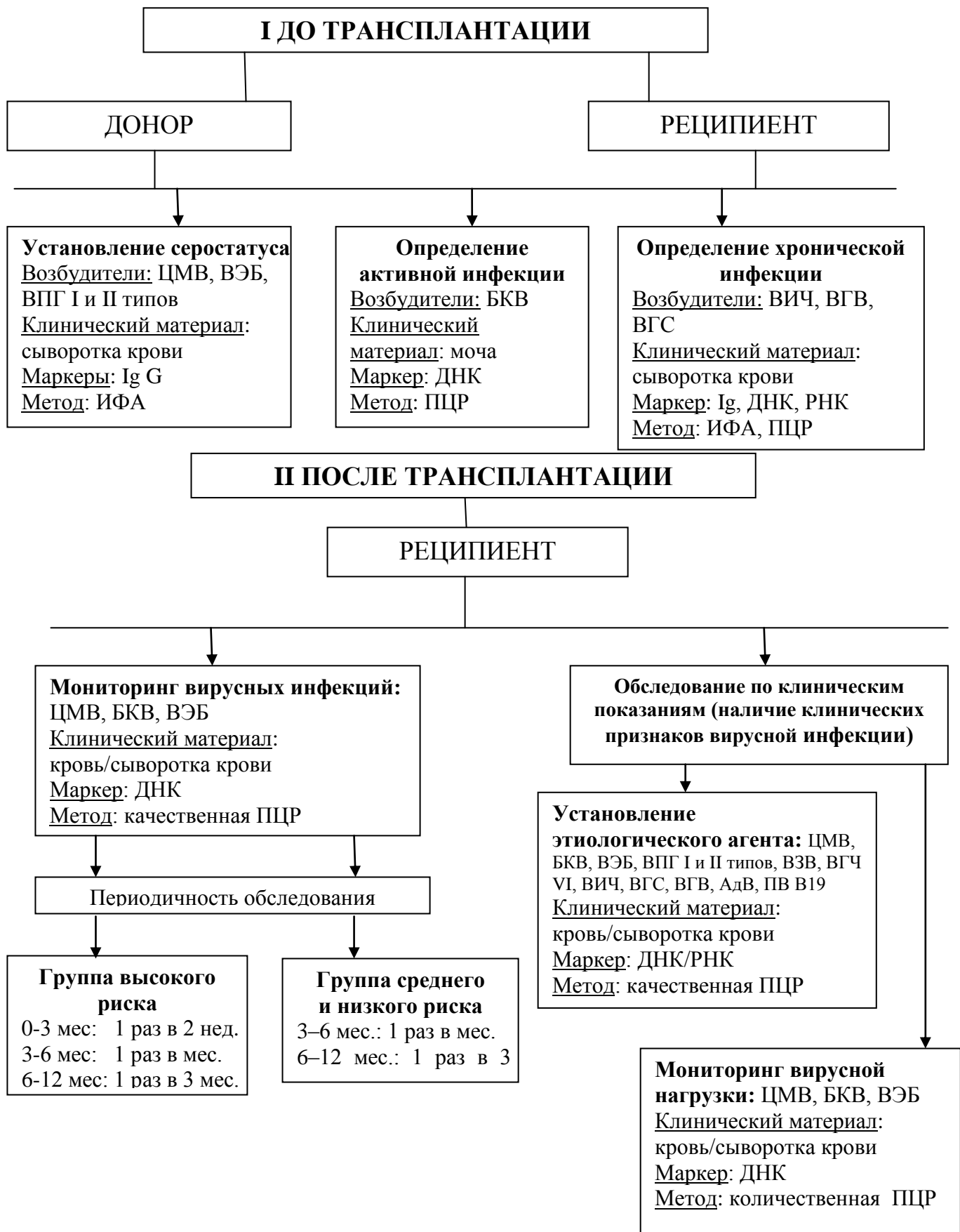
Объект исследований — моча.

Выявляемые маркеры — ДНК БКВ.

Периодичность исследований — однократно до взятия органа для трансплантации.

Возможные варианты пар Д/Р — Д+/Р+, Д-/Р+, Д-/Р-, Д+/Р-.

На основании полученных данных анализируется статус пар Д/Р по риску возникновения и развития посттрансплантационных БКВ осложнений: для геноварианта Д-/Р- — группа минимального риска, для геновариантов Д+/Р+, Д-/Р+, Д+/Р- — группа высокого риска.



**Рисунок — Схема лабораторной диагностики вирусных инфекций при пересадке почки**

1.1.3. Обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации в отношении ВГВ, ВГС и ВИЧ инфекций. Обследование пациентов на маркеры ВГС и ВГВ осуществляется в соответствии с действующим на территории Республики Беларусь СанПиН, регламентирующим требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов.

Обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации в отношении ВИЧ осуществляется в соответствии с действующими на территории Республики Беларусь нормативными документами, регламентирующими проведение лабораторной диагностики ВИЧ инфекции. Наличие положительных результатов обследования на маркеры ВИЧ как у доноров, так и у реципиентов является противопоказанием для трансплантации почки.

## *1.2. Обследование реципиентов почки после трансплантации*

В отношении реципиентов почки осуществляется регулярный мониторинг вирусных инфекций, вызываемых ЦМВ, БКВ и ВЭБ, для предотвращения развития вирусных посттрансплантационных осложнений. Кроме того, при наличии у реципиентов клинических симптомов, указывающих на возможное развитие инфекций вирусной этиологии, проводится их обследование по клиническим показаниям в отношении следующих потенциальных возбудителей: ЦМВ, БКВ, ВЭБ, ВПГ I и II типов, ВЗВ, ВГЧ VI, ВИЧ, ВГС, ВГВ, АдВ, ПВ В19. Порядок его проведения описан в разделах 1.2.1–1.2.5 настоящей инструкции.

1.2.1. Посттрансплантационный мониторинг ЦМВ-инфекции. ЦМВ-инфекция относится к числу наиболее часто регистрируемых инфекционных осложнений у реципиентов почки.

Метод выбора — качественная ПЦР.

Определяемый маркер — ДНК ЦМВ.

Объект исследований — кровь/сыворотка крови.

Периодичность исследований: зависит от наличия/отсутствия профилактической терапии.

На фоне антивирусной профилактики (ганцикловиром или другими этиотропными препаратами):

- с 3 до 6 мес. — 1 раз в мес. (на 3, 4, 5, 6-м мес. после трансплантации);

- с 6 до 12 мес. — 1 раз в 3 мес. (на 9, 12-м мес. после трансплантации).

Без применения профилактической терапии:

- с 0 до 3 мес. — 1 раз в неделю;

- с 3 до 6 мес. — 1 раз в мес.;

- с 6 до 12 мес. — 1 раз в 3 мес.

Обследование реципиентов почки по клиническим показаниям. Наличие клинических признаков ЦМВ-инфекции и лабораторно подтвержденной ЦМВ виремии (положительный результат качественной ПЦР) является основанием для мониторинга вирусной нагрузки.

Цель — выявление динамики вирусной нагрузки и назначение специфической терапии при достижении пороговых значений.

Метод выбора — количественная ПЦР.

Детектируемый маркер — ДНК ЦМВ (количество копий/мл).

Периодичность исследований — 1 раз в неделю.

Пороговые значения вирусной нагрузки для начала терапии:

- для реципиентов групп минимального (Д-/Р-) и среднего (Д+/Р+, Д-/Р+) риска диагностически значимым показателем является количество ДНК ЦМВ  $\geq 2600$  копий/мл;

- для реципиентов группы высокого риска (Д+/Р-) пороговое значение составляет  $\geq 1000$  копий/мл.

Оценка эффективности терапии. Для оценки результативности терапии мониторинг вирусной нагрузки осуществляется с периодичностью 1 раз в неделю в течение всего срока терапии.

В случае положительной динамики снижения вирусной нагрузки к концу терапии следует продолжить мониторинг ЦМВ-инфекции согласно п. 1.2.1.

Отсутствие положительной динамики или увеличение вирусной нагрузки является показанием для определения резистентности ЦМВ к применяемому противовирусному средству и последующей коррекции антивирусной терапии.

#### 1.2.2. Посттрансплантационный мониторинг БКВ-инфекции.

Метод выбора — качественная ПЦР.

Определяемый маркер — ДНК БКВ.

Объект исследований — моча.

Устанавливается следующая периодичность исследований в зависимости от результатов обследования до трансплантации.

Для реципиентов группы высокого риска (Д+/Р+, Д-/Р+, Д+/Р-) в периоды:

- с 0 до 3 мес. — 1 раз в 2 недели;

- с 3 до 6 мес. — 1 раз в мес.;

- с 6 до 12 мес. — 1 раз в 3 мес.

Для реципиентов группы низкого риска (Д-/Р-) в периоды:

- с 0 до 3 мес. — 1 раз в мес.;

- с 3 до 12 мес. — 1 раз в 3 мес.

Получение положительного результата при исследовании мочи, а также выявление у реципиента необъяснимого роста креатинина в сыворотке крови является основанием для осуществления мониторинга БКВ вiremии (выявления БКВ в сыворотке крови).

Мониторинг БКВ вiremии.

Метод выбора — качественная ПЦР.

Определяемый маркер — ДНК БКВ.

Объект исследований — сыворотка крови.

Результаты исследований интерпретируются следующим образом:

а) при отсутствии лабораторного подтверждения БКВ вiremии продолжается мониторинг БКВ в моче согласно п. 1.2.2;

б) лабораторное подтверждение БКВ вiremии у реципиента является основанием для исследования сыворотки крови пациента методом количественной ПЦР и определения вирусной нагрузки.

При показателе вирусной нагрузки в сыворотке крови меньше 200 копий/мл мониторинг БКВ вiremии продолжается с периодичностью 1 раз в месяц.

При показателе вирусной нагрузки в сыворотке крови в пределах от 200 до 10000 копий/мл продолжается мониторинг БКВ вiremии с периодичностью 1 раз в 2 недели.

Показатель вирусной нагрузки в сыворотке крови больше 10000 копий/мл и отсутствие признаков дисфункции аллографта являются показанием для снижения иммуносупрессии и начала специфической противовирусной терапии (например, применение лефлуномида, обладающего не только иммуносупрессивным, но и антивирусным действием). В данных условиях мониторинг БКВ вiremии продолжается с периодичностью 1 раз в 2 недели.

Показатель вирусной нагрузки больше 10000 копий/мл и наличие у реципиента признаков дисфункции аллографта либо показатель вирусной нагрузки больше 50000 копий/мл являются показанием для биопсии почки с целью выявления БКВ нефропатии и коррекции терапии по полученным результатам исследования биоптата. При этом мониторинг БКВ вiremии продолжается с периодичностью 1 раз в 2 недели.

При назначении пациенту специфической антивирусной терапии результаты мониторинга вирусной нагрузки используются для оценки ее эффективности. Снижение уровня вирусной нагрузки на  $\geq 90\%$  через 10 недель после начала антивирусной терапии свидетельствует о хорошей ее эффективности. Снижение уровня вирусной нагрузки  $\leq 30\%$ , по сравнению с таковой до начала антивирусной терапии, свидетельствует об отсутствии ее эффективности и указывает на необходимость коррекции применяемой лечебной схемы путем смены антивирусного средства и/или изменения схемы иммуносупрессивной терапии.

В случае получения отрицательного результата при определении вирусной нагрузки в сыворотке крови проводится мониторинг БКВ в моче с периодичностью 1 раз в месяц. При получении отрицательного результата исследования мочи 2 раза подряд мониторинг осуществляется 1 раз в 3 месяца.

### 1.2.3. Посттрансплантационный мониторинг ВЭБ-инфекции.

Метод выбора — качественная ПЦР.

Определяемый маркер — ДНК ВЭБ.

Объект исследований — кровь/сыворотка крови.

Устанавливается следующая периодичность исследований в зависимости от результатов обследования до трансплантации:

а) для реципиентов группы высокого риска (Д+/Р-) в периоды:

- с 0 до 3 мес. — 1 раз в 2 недели;
- с 3 до 6 мес. — 1 раз в мес.;
- с 6 до 12 мес. — 1 раз в 3 мес.;

б) для реципиентов группы среднего риска (Д-/Р+, Д+/Р+) в периоды:

- с 0 до 3 мес. — 1 раз в мес.;
- с 3 до 12 мес. — 1 раз в 3 мес.

Для реципиентов группы низкого риска (Д-/Р-) рекомендуется диагностика ВЭБ инфекции по клиническим показаниям.



Обследование реципиентов почки по клиническим показаниям. Основанием для обследования является наличие клинических признаков ВЭБ инфекции, ВЭБ виремии (положительный результат качественной ПЦР), а также острое отторжение аллографта.

Цель — выявление динамики вирусной нагрузки и назначение специфической терапии при достижении пороговых значений.

Метод выбора — количественная ПЦР.

Детектируемый маркер — ДНК ВЭБ (количество копий/мл).

Объект исследований — кровь/сыворотка крови.

Периодичность исследований — 1 раз в 2 недели.

Интерпретация результатов количественной ПЦР. Если при исследовании крови пациента 2 раза подряд с интервалом в 2 недели отмечается снижение вирусной нагрузки, это свидетельствует о транзиторной виремии и не требует терапевтического вмешательства. В этом случае необходимо продолжать мониторинг вирусной нагрузки с периодичностью 1 раз в 2 недели. После элиминации вируса мониторинг осуществляется согласно п. 1.2.3.

Сохранение вирусной нагрузки на том же уровне при повторном исследовании свидетельствует о персистентной виремии. В данном случае необходимо руководствоваться значениями вирусной нагрузки:

- при уровне вирусной нагрузки  $<10000$  копий/мл следует продолжать мониторинг с периодичностью 1 раз в 2 недели;

- при уровне вирусной нагрузки  $\geq 10000$  копий/мл и сохранении ее в течение 2 и более недель необходима коррекция терапии (снижение уровня иммуносупрессии и назначение противовирусных средств).

Оценка эффективности проводимой терапии осуществляется так же, как и в отношении ЦМВ (п. 1.2.1).

1.2.4. Посттрансплантационный мониторинг ВПГ I и II типов, ВЗВ, ВГЧ VI инфекций. Мониторинг ВЗВ, ВГЧ 6 инфекций осуществляется по клиническим показаниям.

Тактика осуществления мониторинга ВПГ I и II типов зависит от группы риска, к которой относятся реципиенты по серостатусу (см. п. 1.1.1).

В отношении реципиентов Д+/P+, Д-/P+, Д-/P- вирусологическая диагностика осуществляется по клиническим показаниям.

В отношении реципиентов Д+/P- мониторинг осуществляют следующим образом.

Метод выбора — качественная ПЦР.

Определяемый маркер — ДНК ВПГ I и II типов.

Объект исследований — кровь/сыворотка крови.

Периодичность исследований:

- с 0 до 3 мес. — 1 раз в мес.;

- с 3 до 12 мес. — 1 раз в 3 мес.

Обследование реципиентов по клиническим показаниям. Основанием для обследования в данном случае является наличие клинических проявлений вирусного

заболевания и положительного результата качественной ПЦР. Рекомендуется назначение специфической противовирусной терапии.

Оценка эффективности применяемой терапии. Метод выбора — количественная ПЦР.

Определяемый маркер — ДНК ВПГ, ДНК ВЗВ, ДНК ВГЧ VI (количество копий/мл).

Объект исследований — кровь/сыворотка крови.

Периодичность исследований — 1 раз в 2 недели.

Мониторинг терапии с периодичностью 1 раз в 2 недели осуществляется вплоть до получения отрицательного результата. При отсутствии положительной динамики снижения вирусной нагрузки целесообразна лабораторная диагностика резистентности возбудителя к используемому препарату.

1.2.5. Посттрансплантационный мониторинг АдВ и ПВ В19 инфекций. Вирусологическая диагностика АдВ и ПВ В19 инфекций осуществляется по клиническим показаниям.

Метод выбора — качественная ПЦР.

Определяемый маркер — ДНК АдВ, ДНК ПВ В19.

Объект исследований — сыворотка крови.

Периодичность исследований — 1 раз в 2 недели.

При получении положительного результата качественной ПЦР необходимо рассмотреть возможность снижения уровня иммуносупрессии.

Повторные вирусологические исследования проводятся каждые 2 недели вплоть до получения отрицательного результата.

В случае длительной регистрации положительного результата качественной ПЦР и наличия признаков дисфункции аллографта целесообразна биопсия почки.

## **2. Забор биологического материала для вирусологического исследования**

Забор образцов клинического и секционного материала осуществляется стерильными одноразовыми инструментами в стерильные одноразовые пластиковые пробирки с закручивающимися крышками или пробирки объемом 1,5 мл с защелкой.

### *2.1. Кровь*

Забор крови производится натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл. Для получения сыворотки крови забранная кровь переносится в пробирку без антикоагулянта.

*Предварительная обработка проб* Для получения сыворотки крови образцы цельной крови инкубируются в течение 30 мин при температуре 37°C, а затем центрифугируются при 3000 об./мин в течение 10 мин, после чего сыворотка отбирается в стерильную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл. Клетки периферической крови в виде сгустка оставляются в исходной пробирке для забора крови.

*Условия хранения.* Образцы цельной крови хранятся при температуре 2–25°C в течение 12 ч, при температуре 2–8°C в течение 1 сут. Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

Образцы сыворотки крови хранятся при температуре 2–8°C в течение 5 сут, при температуре -20°C — длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для длительного хранения забранного материала его целесообразно разделить на аликвоты по 0,1–0,2 мл в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Образцы сгустков крови хранятся при температуре 2–8°C в течение 1 сут, при температуре -20°C — длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

*Условия транспортирования.* Транспортирование образцов крови осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре 2–8°C в течение не более 6 ч с момента взятия материала для количественного определения НК, в течение 12 ч — для качественного определения НК. Транспортирование образцов сыворотки крови при температуре 2–8°C осуществляется в течение не более 3 сут.

## *2.2. Моча*

Для анализа отбирается первая порция утренней мочи в количестве 1 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

*Предварительная обработка проб.* Не требуется.

*Условия хранения.* Образцы мочи хранятся при температуре 2–8°C в течение 1 недели, при температуре -20°C — длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

*Условия транспортирования.* Транспортирование осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре 2–8°C в течение 1 сут.

## *2.3. Биопсийный и аутопсийный материал*

Забор образцов осуществляется в пробирки, содержащие 250 мкл специальной транспортной среды (см. Примечание).

*Условия хранения.* При температуре 2–8°C биоптаты/аутоптаты хранятся в течение 1 сут, при температуре -20°C — длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

*Условия транспортирования.* Транспортирование осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре 2–8°C в течение не более 8 ч.

*Примечание.* С целью предотвращения повреждения РНК/ДНК-мишеней возможно использование транспортных сред различного состава в зависимости от вида исследуемого материала. При необходимости длительного хранения и транспортирования, при отсутствии низкотемпературных холодильников используется специальная транспортная среда ESP. Исследуемый материал может храниться в среде ESP при комнатной температуре в темном месте в течение 10 дней. Состав транспортной среды ESP: саркозил 1%; ЭДТА 0,05 М; свободная от нуклеаз проназа Е 1 мг/мл.

## **3. Подготовка образцов для исследования**

Сыворотка крови и сгусток крови (клетки периферической крови) не требуют предварительной пробоподготовки перед выделением ДНК вирусных патогенов.

Образцы мочи перед выделением ДНК пятикратно разводятся транспортной средой для проб клинического материала.

Подготовка биоптатов/аутоптатов для выявления вирусных агентов осуществляется следующим образом: биоптат/аутоптат (пунктат) извлекается из транспортной среды и помещается в пробирку с лизирующим раствором, входящим в состав набора для выделения ДНК. Материал гомогенизируется с помощью механического гомогенизатора.

Образец секционного материала тканей извлекается из пробирки с транспортной средой в стерильную чашку Петри и с помощью стерильных ножниц/скальпеля и пинцета отделяют фрагмент 5×5×2 мм (около 100 мг). Данный фрагмент помещается в пробирку с лизирующим раствором и гомогенизируется с помощью механического гомогенизатора.

#### **4. Детекция серологических маркеров вирусов**

Детекция серологических маркеров в сыворотке крови осуществляется методом ИФА с использованием диагностических тест-систем, зарегистрированных в установленном порядке. Постановка реакции проводится в соответствии с инструкцией производителя.

##### *Возможные проблемы в прохождении реакции ИФА и меры их устранения*

Несоответствие показателей оптической плотности положительного и отрицательного контролей пороговым значениям, а также несоответствие соотношения показателей оптической плотности положительного и отрицательного контролей критериям, изложенным в инструкции на соответствующую тест-систему, свидетельствуют о невозможности учета результатов реакции.

Меры устранения: не допускается повторное использование одноразовых наконечников для автоматических пипеток, требуется строгое соблюдение технологии постановки ИФА, температурного и временного режимов прохождения реакции.

#### **5. Детекция генетических маркеров вирусов и определение вирусной нагрузки**

Детекция ДНК вирусов в образцах клинического материала (цельная кровь, сыворотка крови, биопсийный и аутопсийный материал) осуществляется методом качественной ПЦР. Определение вирусной нагрузки осуществляется методом количественной ПЦР.

##### *5.1. Выделение ДНК из проб клинического материала*

Выделение ДНК из жидких образцов клинического материала (цельная кровь, сыворотка крови) осуществляется с использованием диагностических наборов, основанных на адсорбции ДНК на силиконовом носителе, с последующей элюцией, зарегистрированных в установленном порядке. Постановка реакции проводится в соответствии с инструкцией производителя.

Выделение ДНК из образцов тканей (биоптат/аутоптат (пунктат), секционный материал тканей, архивный материал) проводится с использованием диагностических наборов, основанных на экстракции ДНК гуанидин-изотиоцианолом и последующем осаждении изопропанолом, зарегистрированных в установленном порядке. Постановка реакции проводится в соответствии с инструкцией производителя.

##### *5.2. Постановка ПЦР*

Постановка ПЦР (качественной и/или количественной) осуществляется с использованием диагностических наборов, зарегистрированных в установленном порядке. Наиболее эффективно использование наборов с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Учет результатов проводится с использованием специального оборудования в соответствии с инструкцией производителя.

*Возможные проблемы при постановке ПЦР и их устранение*

Наличие ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов (в соответствии с критериями, изложенными в инструкции на соответствующую тест-систему) свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Пути устранения ложноотрицательных результатов:

- на всех этапах исследований необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции;

- для разведения выделенной ДНК применяется только соответствующий буфер, входящий в состав набора, во избежание загрязнения препарата нуклеазами.

Пути устранения ложноположительных результатов:

- соблюдение пространственного разделения рабочих зон, использование отдельных наборов посуды, пипеток и отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон;

- строгий запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую.