

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель  
Министра здравоохранения  
Республики Беларусь  
Д.Л.Пиневиц  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.



Регистрационный № 018-0319

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С  
У ПАЦИЕНТА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ**  
инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:**

Государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

**АВТОРЫ:** д.м.н., доцент А.Е.Щерба, к.м.н., доцент С.В.Коротков, к.м.н. Д.Ю.Ефимов, О.А.Лебедь, А.А.Сыманович, А.И.Киреева, М.А.Фролова, д.м.н., проф., член-корр. НАН Беларуси О.О.Руммо.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

25.04.2019

Регистрационный № 018-0319

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С  
У ПАЦИЕНТА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. А. Е. Щерба, канд. мед. наук, доц. С. В. Коротков, канд. мед. наук Д. Ю. Ефимов, О. А. Лебедь, А. А. Сыманович, А. И. Киреева, М. А. Фролова, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси О. О. Руммо

Минск 2019

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью внедрения в клиническую практику диагностики вирусного гепатита С у пациентов, перенесших трансплантацию печени, а также оценки вероятности ранней реактивации вирусного гепатита С. Термин «ранняя реактивация вирусного гепатита С после трансплантации печени» соответствует коду В17.8 — другие уточненные острые вирусные гепатиты МКБ-10.

Метод может быть использован как в раннем послеоперационном периоде на стационарном этапе лечения, так и в отдаленном периоде после трансплантации печени у пациентов с клинико-лабораторными признаками дисфункции трансплантата, отторжения трансплантата и реактивации вирусного гепатита С. Инструкция рассчитана на врачей-хирургов отделений трансплантации, врачей-трансплантологов и врачей-гастроэнтерологов амбулаторных кабинетов, врачей-реаниматологов отделений реанимации и интенсивной терапии и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам после трансплантации печени.

Метод основан на оценке вероятности ранней реактивации вирусного гепатита С с помощью анализа однонуклеотидного полиморфизма рецепторов ТЛР-4 донора, а также результатах диагностики вирусного гепатита С посредством морфологического исследования биоптата трансплантата печени с иммуногистохимической окраской на экспрессию субъединицы М30 цитокератина 18.

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

1. Оптический микроскоп.
2. Микротом.
3. Программируемый нагревательный блок (амплификатор) для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).
4. ПЦР-бокс.
5. Гистопроцессор карусельного типа.
6. Одноразовые пробирки с антикоагулянтом.
7. Одноразовые пробирки для ПЦР-РВ объемом 0,2 мл.
8. Одноразовые сменные наконечники с фильтром и без фильтра.
9. Микропипетки.
10. Буферизованный формалин.
11. Парафин.
12. Моноклональные антитела для иммуногистохимической окраски М30.
13. Набор для выделения ДНК из крови.
14. Ортоксилол «ЧДА».
15. Спирт этиловый ректификованный.
16. Визуализирующая система EnVision+.
17. Реагенты для постановки и проведения ПЦР-РВ.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Ортотопическая трансплантация печени.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **1. Определение однонуклеотидного полиморфизма в последовательности rs913930 (T>C) в гене ТЛР-4 донора**

Полиморфизм в нуклеотидной последовательности rs913930 гена ТЛР-4 донора определяют согласно инструкции по применению «Метод оценки риска отторжения и ранней дисфункции трансплантатов печени» от 11.12.2015 № 181-1115.

### **2. Морфологическое исследование биоптата трансплантата печени с иммуногистохимической окраской на экспрессию субъединицы М30 цитокератина 18**

2.1. Для анализа иммуногистохимического профиля используют иммуногистохимическое окрашивание гистологических срезов с применением моноклональных антител anti-M30 в разведении 1:100.

2.2. Иммуногистохимическое исследование осуществляют по стандартной пероксидазно-антипероксидазной методике с использованием в качестве системы визуализации EnVision+.

2.3. С целью депарафинизации и обезвоживания готовые гистологические срезы помещают по 10 мин в две смены ксилола, затем проводят по трем 96° спиртам по 3 мин в каждом.

2.4. Предобработку с целью демаскировки антигенов, направленную на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин, начинают с трехкратной промывки срезов в дистиллированной воде по 2 мин. Затем производят кипячение на водяной бане с демаскировочным буфером в течение 30 мин при температуре 98 °С для каждого маркера, за исключением белка S100 (без буфера).

2.5. После демаскировки, емкости со срезами при комнатной температуре выдерживают 15 мин. Стекла промывают в дистиллированной воде дважды по 5 мин. Срезы помещают в 3 % перекись водорода на 20 мин; после чего их промывают в дистиллированной воде три раза по 2 мин, затем инкубируют со специфическим первичным антителом. Первичные антитела наносят на срез и инкубируют при комнатной температуре 30 мин.

2.6. После инкубации с антителами срезы промывают в фосфатном буфере рН 7,4–7,5 дважды по 5 мин.

2.7. На срез наносят визуализирующую систему EnVision+ на 30 мин при комнатной температуре.

2.8. Затем срезы дважды по 5 мин промывают в фосфатном буфере и наносят раствор диаминобензидина (ДАБ). Длительность инкубации с ДАБ устанавливают для каждого маркера отдельно до появления ярко-золотисто-коричневого цвета окрашиваемых структур.

2.9. Затем проводят окрашивание ядер клеток гематоксилином Майера.

2.10. На последнем этапе срезы заключают под покрывное стекло с помощью бальзама.

2.11. В качестве контроля иммуногистохимической реакции используют внутренние структуры исследуемой ткани (для anti-M30 — колоректальный рак).

### **Управленческие решения**

1. Оценка вероятности ранней реактивации вирусного гепатита С после трансплантации печени.

Для установления вероятности ранней реактивации вирусного гепатита С после трансплантации печени оценивают полиморфизм rs913930 в гене ТЛР-4 донора. Генотип СС и/или ТТ rs913930 в гене ТЛР-4 донора свидетельствует о низкой вероятности и не требует дополнительных лечебных мероприятий (клинический протокол трансплантации печени: глава 4 приложения 6 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.01.2010 № 6). Генотип С/Т rs913930 в гене ТЛР-4 донора свидетельствует о высокой вероятности ранней реактивации вирусного гепатита С, что потребует лечения прямыми противовирусными агентами (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 24.01.2018 № 51) в первую неделю после трансплантации печени.

2. Диагностика вирусного гепатита С у пациента после трансплантации печени с клинико-лабораторными признаками дисфункции, отторжения трансплантата печени и реактивации вирусного гепатита С.

При наличии клинико-лабораторных данных холестатического гепатита после трансплантации пациенту будет выполнена пункционная биопсия трансплантата печени под УЗ-контролем с дальнейшей оценкой экспрессии субъединицы М30 цитокератина 18.

Наличие цитоплазматической экспрессии субъединицы М30 цитокератина 18 является диагностическим критерием вирусного гепатита С. Выявление данного критерия будет являться показанием к применению лечебных технологий, направленных на купирование дальнейшего развития данного осложнения.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

1. Забор крови в стерильный шприц и переливание ее в пробирки вызывает гемолиз и тромбообразование и тем самым не обеспечивает должного качества образца периферической крови, что может повлиять на результаты исследования. Существует большое разнообразие пробирок с уже внесенным антикоагулянтом, в т. ч. для гематологических исследований. Наиболее оправдано использование стерильных герметичных вакуумных пробирок небольшого объема (2–5 мл). Среди применяемых антикоагулянтов в гематологии стандартом служат соли этилендиаминтетрауксусной кислоты. Не рекомендуется хранить пробирки с образцами крови и антикоагулянтом в холодильнике или при постоянном помешивании во избежание гемолиза.

2. Пункционную биопсию трансплантата печени необходимо выполнять в условиях операционной при обязательном использовании ультразвуковой навигации.

3. При определении иммуногистохимической экспрессии M30 могут возникать ложноположительные реакции; во избежание этого требуется обязательное выполнение положительного теста-контроля.

#### **Меры предосторожности**

Все работы с биологическим материалом пациентов должны производиться с использованием одноразовых материалов и в соответствии с требованиями Санитарно-гигиенических правил, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь.