

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Н.Кроткова

«24»

2022 г.

Регистрационный № 080-0622

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ РОЗЕОЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»,
государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: Е.В.Дивакова; д-р мед. наук, проф. О.Н.Романова; канд. мед. наук,
доц. Е.П.Кишкурно; д-р мед. наук, проф. Т.В. Амвросьева; Ю.А. Шилова; канд.
мед. наук, доц. А.П.Кудин.

Минск 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм диагностики розеоловирусной инфекции, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику розеоловирусной инфекции. Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей общей практики, врачей-педиатров, врачей-инфекционистов, врачей-анестезиологов-реаниматологов, врачей-неврологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь детям и взрослым в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГЧ-6А – вирус герпеса человека 6А типа;

ВГЧ-6В – вирус герпеса человека 6В типа;

ВГЧ-7 – вирус герпеса человека 7 типа;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ЦСЖ – цереброспинальная жидкость.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Заболевания или патологические состояния, сопровождающиеся симптомами, характерными для вирусных инфекций центральной нервной системы (A86-A89), воспалительных болезней центральной нервной системы (G03-G04), демиелинизирующих болезней центральной нервной системы (G35-G37), эпизодических и пароксизмальных расстройств (G40-G41, G46), судорог при лихорадке (R56.0), других и неуточненных судорог (R56.8), поражения отдельных нервов, нервных корешков и сплетений (G50-G59), полиневропатий и других поражений периферической нервной систем (G60-G64), вирусных

инфекций, характеризующихся поражением кожи и слизистых оболочек (B08.2, B09), инфекционного мононуклеоза (B27.8-B27.9).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания, соответствующие таковым для медицинского применения медицинских изделий, необходимых для реализации алгоритма, изложенного в настоящей инструкции.

ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ

Изделия медицинской техники:

- амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени;
- бокс лабораторный с УФ-лампой для проведения ПЦР-анализа;
- термостат твердотельный;
- микроцентрифуга (1000 - 14000 об/мин);
- миницентрифуга-вортекс;
- центрифуга настольная лабораторная (1000 - 5000 об/мин);
- холодильник (от +2°C до +8°C) с морозильной камерой (от -16°C до -20°C);
- дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1-10 мкл, 2 - 20 мкл, 20 - 200 мкл, 100 - 1000 мкл).

Медицинские изделия:

- пробирки пластиковые стерильные типа «Эппендорф» (1,5 мл);
- микропробирки для проведения ПЦР, соответствующие типу используемого термоциклера (0,1 мл, 0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз;
- наконечники полимерные для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз;
- набор реагентов для выделения ДНК;

- реагент «Гемолитик»;
- наборы для детекции ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В, ВГЧ-7 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени»;
- бумажный конверт;
- ножницы.

Реактивы:

- 3% перекись водорода.

ТЕХНОЛОГИЯ РЕАЛИЗАЦИИ АЛГОРИТМА

Алгоритм диагностики розеоловирусной инфекции, изложенный в настоящей инструкции, реализуется последовательно в соответствии с Приложением.

Диагностика розеоловирусной инфекции проводится в три этапа.

1. Первый этап включает клиническую диагностику розеоловирусной инфекции с целью установления предварительного диагноза. Реализация этапа осуществляется общепринятыми методами (анамнез заболевания, общее физикальное исследование, оценка показателей общего анализа крови, цереброспинальной жидкости).

Предварительный диагноз розеоловирусной инфекции устанавливается при наличии у пациента:

- в анамнезе заболевания: общеинфекционного, общемозгового, менингеального, респираторного синдромов, очаговых неврологических нарушений, судорог с фебрильной провокацией, пароксизмального двигательного приступа, экзантемы (пятнистой, папулезной и ее сочетаний), симптомов инфекционного мононуклеоза, кишечных симптомов;

- при общем физикальном исследовании: симптомов поражения ЦНС, очаговых неврологических нарушений, судорог с фебрильной провокацией, пароксизмального двигательного приступа, впервые возникшей фармакорезистентной эпилепсии;

- при оценке показателей общего анализа крови: лейкоцитоза в первые 3 дня, лейкопении, лимфоцитоза с 4-6 дня заболевания, тенденции к тромбоцитопении (на уровне $130-150 \cdot 10^9/\text{л}$);

- при оценке показателей цереброспинальной жидкости: лимфоцитарного плеоцитоза, увеличенного содержания белка.

2. Второй этап включает молекулярно-генетическое исследование с целью верификации диагноза.

2.1 Получение разных видов биологического материала, его хранение и пробоподготовка.

Плазма периферической крови. Взятие периферической крови проводят утром натощак или не ранее, чем через 3 ч после приема пищи из локтевой вены в пробирку с 6 % раствором ЭДТА. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови отбирают плазму: предварительно центрифугируют 10 мин при 800-1600 об/мин, переносят в новую пробирку. Хранить плазму можно не более 5 суток при температуре от 2 до 8°C, не более 6 месяцев – при температуре не выше минус 16°C и длительно – при температуре не выше минус 68°C.

Образцы цельной крови. Взятые образцы крови обрабатываются «Гемолитиком», инкубируются при комнатной температуре 5 мин, перемешиваются и инкубируются ещё 5 мин. Образец центрифугируется на микроцентрифуге при 8 тыс. об/мин в течение 2 мин. Надосадочная жидкость отбирается, не задевая осадка, используя отдельный наконечник для каждой пробы. После отмывки осадок клеток должен быть белым,

допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку «Гемолитиком». Полученный осадок лейкоцитов немедленно лизируется или замораживается при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

Образцы волос. Волосы должны быть чистыми, сухими. Образец отбирают в чистых нитриловых перчатках. Выдергивают небольшой пучок волос (5-10 волос). Затем, оставив длину волос 3-5 см от корней, лишнее обрезают. Инструмент для разрезания волос (ножницы) должен иметь чистые режущие поверхности. Волосы пучком (толщиной 2-3 мм) помещают в чистый конверт. В зоне конверта, где расположен корневой конец пряди, на внешней его части делают надпись «корень». При отсутствии волос на голове (полная алопеция) исследуют волосы с других участков тела. Хранить не более месяца при температуре не выше 16°С. Непосредственно перед выделением ДНК осторожно, над стерильной 1,5 мл пробиркой типа Эппендорф, отрезают луковицы волос с 0,5-1 см стержня и помещают в пробирку.

Образцы ногтей. Забор материала у пациента проводят после тщательного мытья рук. Отбирают образец в чистых нитриловых перчатках. Инструмент для отрезания ногтя должен иметь чистые режущие поверхности. Срезанные ногти помещают в чистый конверт. Хранить не более месяца при температуре не выше 16°С. Непосредственно перед выделением ДНК обработку ногтя проводят в стерильных резиновых перчатках: ногтевую пластинку стерильными ножницами разделяют на крупные фрагменты; фрагменты ногтевой пластинки помещают в стерильную 1,5 мл пробирку типа Эппендорф.

Образцы ЦСЖ не требуют предварительной пробоподготовки. Хранить не более 6 месяцев – при температуре не выше минус 16°C и длительно – при температуре не выше минус 68°C.

2.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляют с помощью коммерческих наборов, предназначенных для выделения из данного вида биологического материала, в соответствии с инструкцией производителя.

2.3 Проведение количественной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Для детекции ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В, ВГЧ-7 используют коммерческие наборы для количественной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», содержащие эндогенный внутренний контроль к ДНК человека.

3 Третий этап включает интерпретацию полученных результатов.

3.1 Диагноз розеоловирусной инфекции устанавливается по обнаружению ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В, ВГЧ-7.

3.2 Форма розеоловирусной инфекции устанавливается на основании анализа вирусной нагрузки в разных биологических материалах.

Активная форма инфекции – при обнаружении:

- в ЦСЖ ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $\leq 10^4$ копий/мл, ДНК ВГЧ-7 в любой концентрации;
- в ЦСЖ ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $> 10^4$ копий/мл и исключении хромосомно-интегрированной формы инфекции;
- в сыворотке/плазме крови ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $\geq 10^2$, но $< 5 \cdot 10^5$ копий/мл, ДНК ВГЧ-7 в любой концентрации;
- в сыворотке/плазме крови ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $\geq 5 \cdot 10^5$ копий/мл и исключении хромосомно-интегрированной формы инфекции;

Латентная форма инфекции – при обнаружении:

- в сыворотке/плазме крови ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $< 10^2$ копий/мл;
- в клетках крови ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $< 5 \lg$ копий/ 10^5 клеток;
- в клетках крови ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $\geq 5 \lg$ копий/ 10^5 клеток и исключения хромосомно-интегрированной формы инфекции;
- в клетках крови ДНК ВГЧ-7 в любой концентрации;

Хромосомно-интегрированная форма ВГЧ-6А, ВГЧ-6В – при обнаружении:

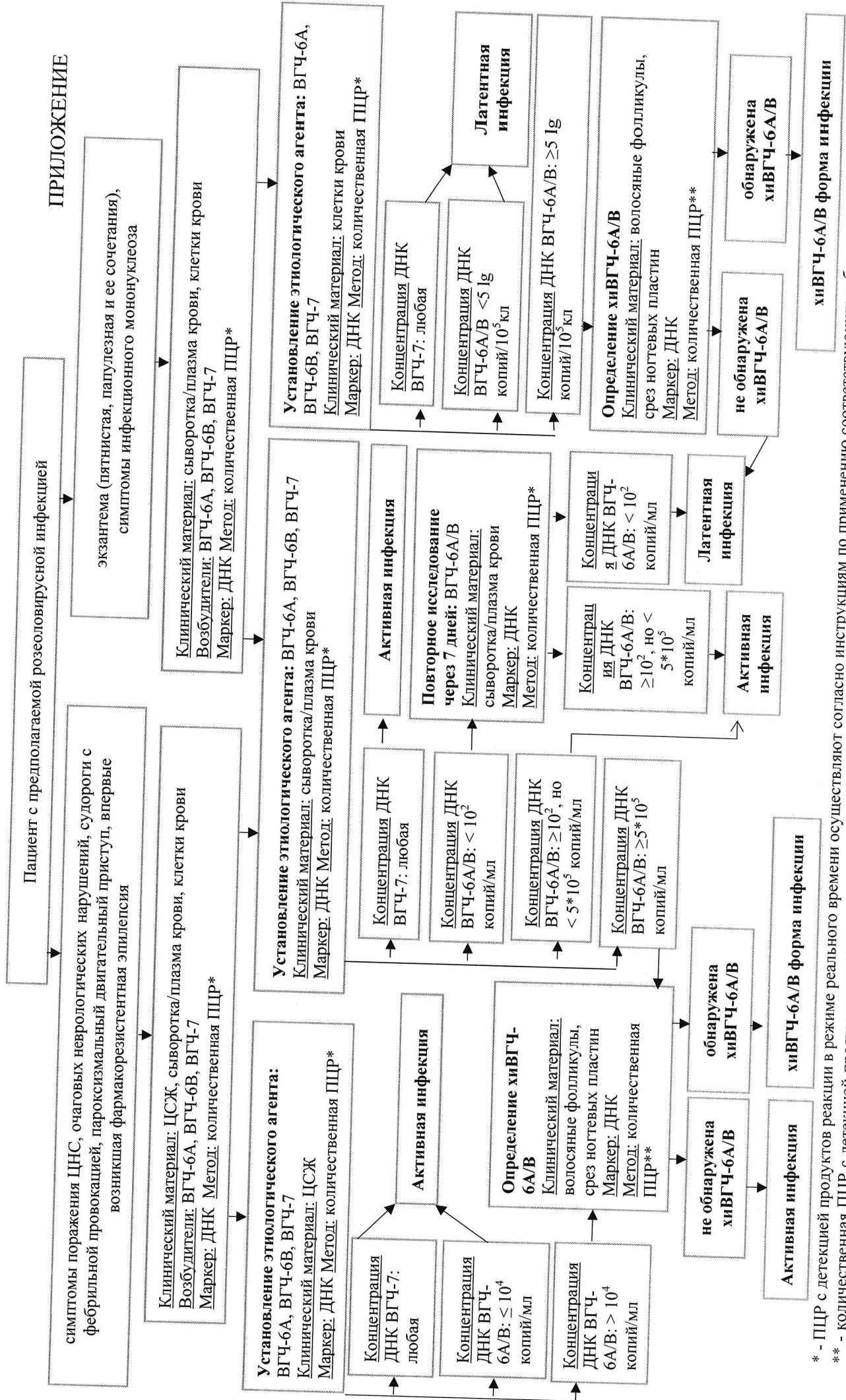
- в ЦСЖ ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $> 10^4$ копий/мл
и/или
в сыворотке/плазме крови ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $\geq 5 \cdot 10^5$ копий/мл
и/или
в клетках крови ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В в концентрации $\geq 5 \lg$ копий/ 10^5 клеток
и
в волосяных фолликулах, срезах ногтевых пластин ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В.

4 Перечень возможных ошибок и пути их устранения

Возможные проблемы при постановке ПЦР изложены в инструкциях по применению соответствующих тест-систем и наборов реагентов и устраняются рутинными мерами.

Контроль клинической эффективности не требуется.

ПРИЛОЖЕНИЕ



* - ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени осуществляются согласно инструкциям по применению соответствующих наборов;
 ** - количественная ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени осуществляются согласно инструкциям по применению соответствующих наборов для обнаружения ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В, ВГЧ-7, позволяющих в качестве эндогенного внутреннего контроля использовать ДНК человека;