

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«*Пиневиц*» 2015 г.

Регистрационный № 163-1115

## АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВК ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Амвросьева Т.В., к.б.н. Дедюля К.Л.,  
к.б.н. Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., к.м.н., доцент Кишкурно Е.П.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

23.12.2015

Регистрационный № 163-1115

**АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ВК ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

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 К.Л. Дедюля,  
канд. биол. наук Н.В. Поклонская, З.Ф. Богущ, канд. мед. наук Е.П. Кишкурно

Минск 2015

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-трансплантологов, врачей-инфекционистов, врачей лабораторной диагностики. Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику ВК вирусной инфекции.

## **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. Вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз).
4. Гомогенизатор механический.
5. Изопропанол.
6. Ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой.
7. Набор для выделения ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе.
8. Набор для выделения ДНК с помощью экстракции гуанидин-изотиоцианолом.
9. Набор реагентов для амплификации ДНК ВК полиомавируса.
10. 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).
11. Набор инструментов: ножницы, скальпель, пинцеты.
12. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки объемом 0,5 мл, 0,2 мл с маркировкой «RNase, DNase free»).
13. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ).
14. Транспортная среда.
15. Термоциклер с возможностью проведения ПЦР в режиме реального времени.
16. Хлороформ, х.ч. по ТУ 2631-02-11291058-96.
17. Центрифуга рефрижераторная на 1000–5000 об./мин.
18. Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф», не менее 14000 об./мин).
19. Центрифуга-вортекс.
20. Холодильник-морозильник (-20°C, +4°C).
21. Этиловый спирт по ГОСТ 5962-67.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

- трансплантация почки (отмирание и отторжение трансплантата почки);
- трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (отторжение трансплантата костного мозга);
- злокачественные новообразования (наличие симптомов лекарственно-подавленного иммунитета);
- ВИЧ-инфекция в стадии СПИДа (нефропатия);
- геморрагический цистит;

- стриктура уретры неуточненная;
- интерстициальный нефрит;
- беременность на разных сроках с впервые выявленной патологией мочевой системы (геморрагический цистит, интерстициальный нефрит);
- сахарный диабет (диабетическая нефропатия);
- асимптоматическая гематурия (рецидивирующая и устойчивая гематурия, неспецифическая гематурия).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Объекты исследований**

Объектами исследований являются:

- сыворотка крови;
- моча;
- биопсийный материал.

### **Порядок лабораторной диагностики**

Лабораторная диагностика ВК вирусной инфекции проводится в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1.

1. Скрининг на наличие ВК вирусной инфекции осуществляют 1 раз в 3 мес. Материалом для исследования является моча пациента, методом исследования — качественная ПЦР.

2. При получении положительного результата скрининга проводят исследование на ВК-виремию. Материал для исследования является сыворотка крови пациента, методом исследования — качественная ПЦР.

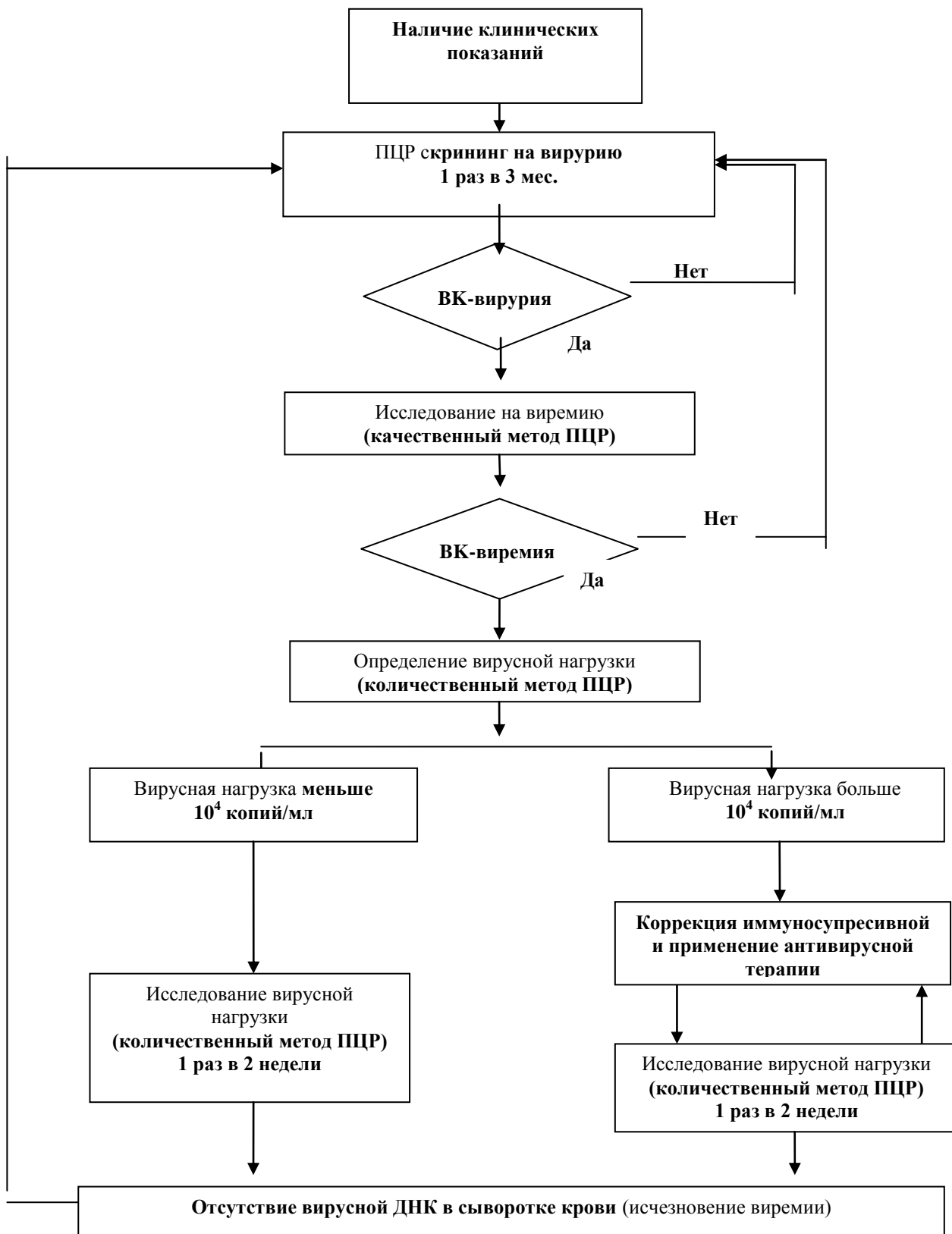
3. При отсутствии ВК-виремии продолжается мониторинг ВК-вируса в моче в соответствии с п. 1.

4. При наличии ВК-виремии проводят определение вирусной нагрузки в сыворотке крови пациента методом количественной ПЦР.

5. При показателе вирусной нагрузки в сыворотке крови меньше 10000 копий/мл продолжают мониторинг ВК-виремии с периодичностью 1 раз в 2 недели.

6. Показатель вирусной нагрузки в сыворотке крови более 10000 копий/мл являются показанием для коррекции иммуносупрессивной и назначения противовирусной терапии. В данных условиях мониторинг ВК-виремии продолжают с периодичностью 1 раз в 2 недели.

7. При назначении пациенту специфической антивирусной терапии результаты мониторинга вирусной нагрузки используются для оценки ее эффективности.



**Рисунок — Алгоритм лабораторной диагностики ВК вирусной инфекции**

**Забор биологического материала для вирусологического исследования**

Забор образцов клинического материала осуществляется общепринятыми методами.

Упаковка, условия хранения и транспортирования клинического материала должны соответствовать требованиям руководства «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» № 11-7-13-2002 от 30.12.2002 и СП 17-129 РБ 2000 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами».

### ***Кровь***

Забор крови и получение сыворотки проводятся рутинными методами.

#### *Условия хранения*

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 пробу разделяют на аликвоты по 0,1–0,2 мл.

#### *Условия транспортировки*

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.

### ***Моча***

Отбор мочи проводится рутинным методом.

#### *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 транспортировки*

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

### ***Биопсийный материал***

Забор образцов осуществляется в пробирки, содержащие 250 мкл транспортной среды (саркозил 1%; ЭДТА 0,05 М; свободная от нуклеаз проназа Е 1 мг/мл). Исследуемый материал может храниться в транспортной среде при комнатной температуре в темном месте в течение 10 дней.

#### *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 транспортировки*

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

### **Подготовка образцов для исследования**

Сыворотка крови не требует предварительной пробоподготовки перед выделением ДНК ВК вируса.

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

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

### **Детекция генетических маркеров ВК вируса и определение вирусной нагрузки**

Детекция ДНК вирусов в образцах клинического материала (моча, сыворотка крови, биоптат) осуществляется методом качественной ПЦР. Определение вирусной нагрузки осуществляется методом количественной ПЦР.

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

Выделение ДНК из жидких образцов клинического материала (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.

#### ***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.

#### ***Постановка диагноза***

Лабораторное подтверждение ВК вирусной вирусии (наличия ВК-вируса в моче) и/или ВК вирусной виремии (наличия ВК-вируса в крови) является основанием для постановки диагноза «ВК вирусная инфекция».

#### ***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 исследования необходимо использовать одноразовую стерильную пластиковую посуду и наконечники 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.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель учреждения, в котором  
внедрена инструкция

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения

\_\_\_\_\_

2. Кем предложено (наименование учреждения разработчика, автор)

\_\_\_\_\_

3. Источник информации

\_\_\_\_\_

4. Где и когда начато внедрение

\_\_\_\_\_

наименование лечебного учреждения, дата внедрения

5. Общее количество наблюдений

\_\_\_\_\_

6. Результаты применения метода за период с \_\_\_\_\_ по \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

7. Эффективность внедрения:

\_\_\_\_\_

8. Замечания, предложения

\_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_ Ответственные за

внедрение \_\_\_\_\_

должность, Ф.И.О., кафедра, подпись

\_\_\_\_\_

должность, Ф.И.О., кафедра, подпись

Примечание: Акт внедрения направляется организации – разработчику (п.2), п.п. 4-8 заполняются организацией, внедрившей разработку.