

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2016 г.

ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ № 229-1215



**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕРПЕСВИ-  
РУСНОЙ ИНФЕКЦИИ 6 ТИПА**  
инструкция по применению

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

АВТОРЫ: к.б.н., доцент Орлова С.В., д.м.н., профессор Карпов И.А.,  
Штыров А.А., Савинова О.В., Рудько Г.Ф., Щерба В.В.

Минск 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
20.05.2016  
Регистрационный № 229-1215

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ 6 ТИПА**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доц. С.В. Орлова, д-р мед. наук, проф. И.А. Карпов,  
А.А. Штыров, О.В. Савинова, Г.Ф. Рудько, В.В. Щерба

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм диагностики инфекции вызванной вирусом герпеса человека 6 типа (далее — ВГЧ-6), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую диагностику ВГЧ-6 с дифференциацией на латентную и острую форму.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с вероятностью развития ВГЧ-6 инфекции.

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

- амплификатор для пробирок 0,5 или 0,2 мл;
- термоциклер для ПЦР в режиме реального времени;
- компьютер с программным обеспечением для управления амплификатором;
- ламинарный бокс;
- центрифуга – вортекс;
- микроцентрифуга с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф» не менее 13000 об./мин);
- анализатор иммуноферментный;
- холодильник с морозильной камерой (от +4 до +8°C, от -18 до -20°C);
- термостат;
- автоматические дозаторы переменного объема (от 0,1 до 10; от 20 до 200; от 100 до 1000 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром до 10; 100; 200; 1000 мкл;
- одноразовые пластиковые микропробирки на 0,2; 0,5; 1,5 мл;
- штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников;
- набор реагентов для выделения ДНК из клинических образцов;
- набор реагентов для амплификации ДНК вируса герпеса 6 типа;
- тест-система для выявления антител против вируса герпеса 6 типа;
- автоклав;
- перекись водорода (ТУ6-02-57075 ОСЧ);
- этиловый спирт по ГОСТ 5962-67.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Клинико-лабораторных и/или эпидемиологические данные о возможности развития герпесвирусной инфекция 6 типа (В34.9).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

#### **Объекты исследования**

Объектами исследований являются:

- сыворотка крови;
- лейкоциты крови;
- ликвор;
- слюна.

### **Взятие клинического материала для вирусологического исследования**

#### *1. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала*

1.1. Для получения лейкоцитов взятие крови производят натошак или через 3 ч после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или специальную вакуумную систему типа Vacutainer (с 6 % ЭДТА). При взятии в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом (6 % раствор ЭДТА в соотношении 1:20). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом, в противном случае кровь свернется, и выделение ДНК станет невозможным). Далее выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к набору.

1.2. Для получения сыворотки взятие крови проводят натошак или через 3 ч после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 3–5 мл или специальную вакуумную систему типа Vacutainer без антикоагулянта. При заборе в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую стеклянную пробирку. Для получения сыворотки пробирку с кровью отстаивают при комнатной температуре до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 3000 об./мин 10 мин при комнатной температуре. Переносят сыворотку осторожно в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

*Условия хранения:* образцы сыворотки хранят при температуре от +4 до +8°C в течение 24 ч, при температуре -20°C — в течение 1 года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала, поэтому образцы сыворотки для длительного хранения желательно разлить небольшими (0,1–0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5–2,0 мл. Образцы цельной крови хранят при температуре от +20 до +25°C в течение 2 ч; при температуре от +4 до +8°C — в течение 12 ч. Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

1.3. Слюна. Взятие слюны осуществляется в одноразовые стерильные пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл или стерильный пенициллиновые флаконы в количестве 0,2–1,0 мл. Производится трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором и вновь образовавшаяся слюна отсасывается со дна ротовой полости одноразовым шприцем и переносится в одноразовые стерильные сухие флаконы или выплевывается в них. Предобработка проб не требуется. При невозможности быстрой доставки материал замораживают при -20°C. Последующая транспортировка осуществляется в замороженном виде (в термосе со льдом).

*Условия хранения:* при температуре +4 до +8°C — в течение 6 ч, в замороженном виде — до момента исследования. Не рекомендуется размораживание более двух раз.

### Порядок вирусологической диагностики

Диагностика герпесвирусной инфекции 6 типа осуществляется с дифференциацией на латентную и острую форму в соответствии со схемой, представленной на рисунке.

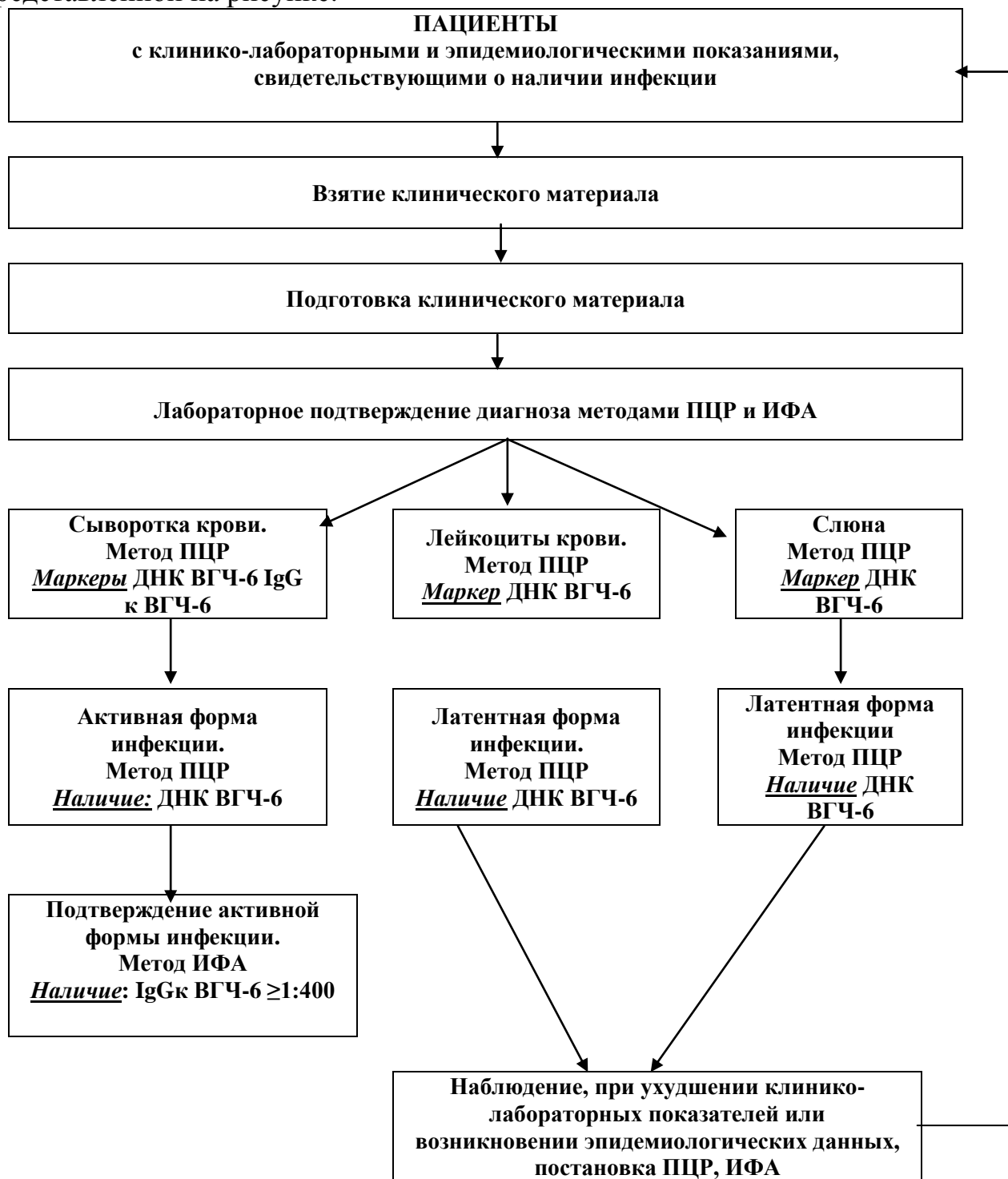


Рисунок — Алгоритм дифференциальной диагностики герпесвирусной инфекции 6 типа

## **Детекция маркеров вируса герпеса 6 типа**

Детекция ДНК ВГЧ-6 в образцах клинического материала (сыворотка крови, лейкоциты, ликвор, слюна) осуществляется методом качественной ПЦР.

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

Выделение ДНК из жидких образцов клинического материала 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 к набору.

### *2. Постановка ПЦР*

Постановка ПЦР (качественная) осуществляется с использованием диагностических наборов, зарегистрированных в установленном порядке. Наиболее эффективно использование наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

### *3. Постановка ИФА*

Постановка ИФА осуществляется с использованием диагностических наборов, зарегистрированных в установленном порядке.

## **Установление диагноза**

### *1. Детекция маркеров ВГЧ-6*

Наличие маркеров ВГЧ-6 инфекции при лабораторном подтверждении является основанием для постановки диагноза «герпесвирусная инфекция 6 типа».

### *2. Определение формы инфекции*

#### *2.1. Постановка диагноза активной формы*

Детекция ДНК ВГЧ -6 типа выделенная из сыворотки крови пациента, свидетельствует об активной форме инфекции. Если не амплифицируется ДНК внутреннего контроля, проводят дополнительное подтверждение активной формы инфекции в ИФА. Наличие IgG антител в титре 1:400 и выше позволяет подтвердить активную форму инфекции.

#### *2.2. Постановка диагноза латентной формы*

Детекция ДНК ВГЧ-6, выделенная из лейкоцитов крови, это маркер латентно/персистентной формы инфекции. В этом случае должна также амплифицироваться и ДНК внутреннего контроля.

Положительный контрольный образец — кривая флуоресценции должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Отрицательный контрольный образец — должна отсутствовать, кривая типичной формы и не пересекает пороговую линию.

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

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:*

- при проведении всех этапов 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.