

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д. Л. Пиневиц

18.03.2016

Регистрационный № 151-1115

**АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ПОЛИОМАВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

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. Поклонская Н.В., Богуш З.Ф.,
к.б.н. Дедюля К. Л., к.м.н. Кишкурно Е. П., к. м. н. Миланович Н. Ф.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен алгоритм диагностики полиомавирусной инфекции (ПВИ) при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику ПВИ с дифференциацией на ВК и JC вирусную инфекцию. Инструкция предназначена для врачей-трансплантологов, врачей-инфекционистов, врачей лабораторной диагностики.

1 Перечень необходимых реактивов, лекарственных средств, изделий медицинской техники

- 1 автоклав;
- 2 автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5 – 10 мкл, 2 – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл;
- 3 вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз);
- 4 ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- 5 набор для выделения ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе;
- 6 набор реагентов для амплификации ДНК ВК и JC полиомавирусов;
- 7 наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой «RNase, DNase free» (0,5 – 10 мкл, 2 – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл);
- 8 одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл с маркировкой «RNase, DNase free»);
- 9 перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ);
- 10 термоциклер с возможностью проведения ПЦР в режиме реального времени;
- 11 центрифуга рефрижераторная на 1-5 тыс. об./мин;

- 12 твердотельный термостат (для пробирок типа «Эппендорф»);
- 13 центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф», не менее 14000 об./мин);
- 14 центрифуга-вортекс;
- 15 холодильник-морозильник (от +4 °С до +8°С, от минус 18°С до минус 20°С);
- 16 этиловый спирт по ГОСТ 5962-67.

2 Показания к применению

- аллогенная ТГСК;
- использование режимов высокодозной полихимиотерапии с аутологичной ТГСК;
- геморрагический цистит у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК);
- асимптоматическая гематурия у реципиентов ГСК;
- энцефалиты, развившиеся на фоне применения иммуносупрессии у реципиентов ГСК.

3 Противопоказания для применения

Отсутствуют.

4 Объекты исследований

- сыворотка крови
- моча.

5 Порядок диагностики ПВИ

Лабораторная диагностика ПВИ у пациентов при ТГСК осуществляется в отношении двух наиболее клинически значимых ее возбудителей – ВК и JC вирусов. Она проводится до и после ТГСК в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1.

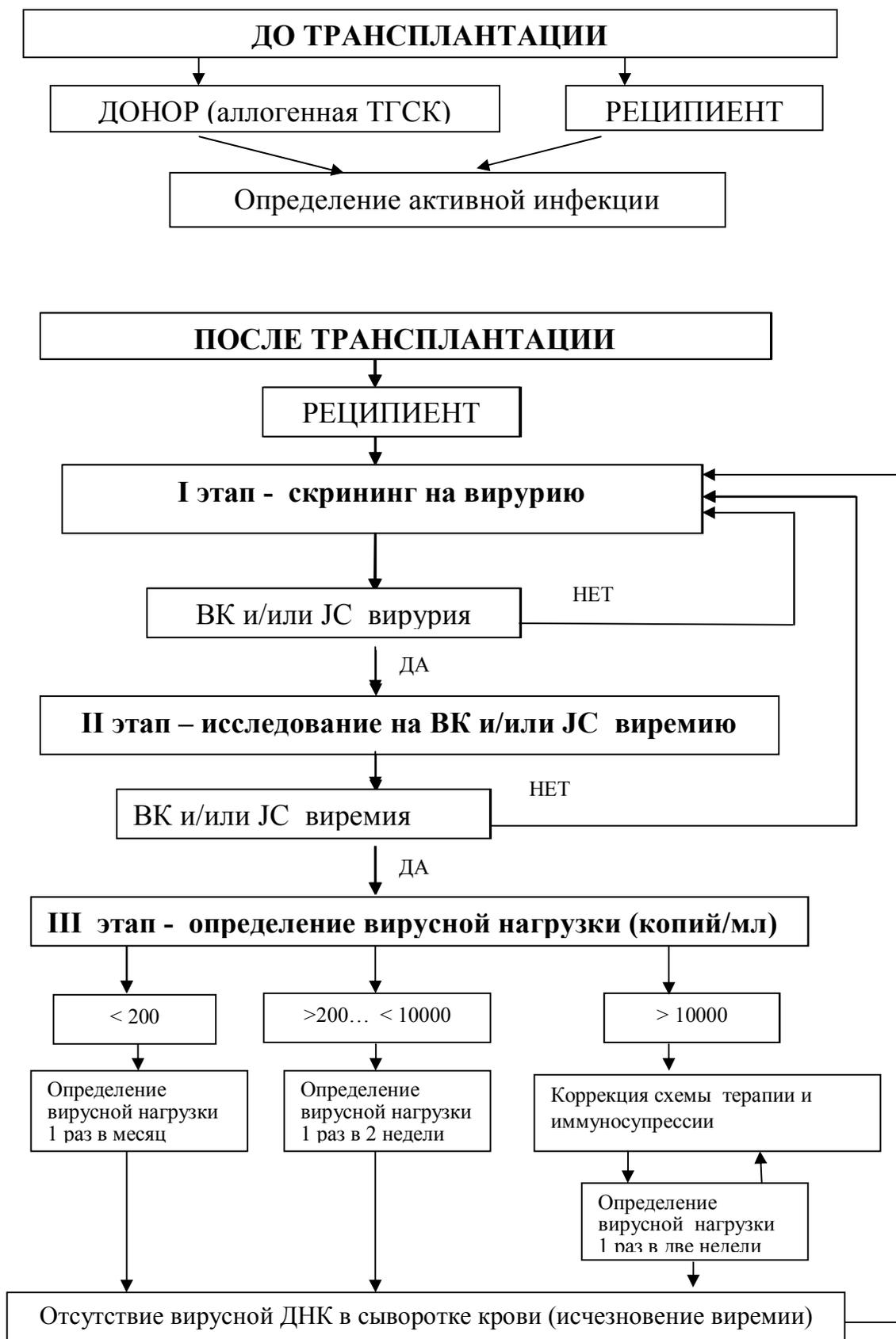


Рисунок 1 – Схема диагностики ПВИ у реципиентов ГСК

5.1 Диагностика ПВИ у доноров и реципиентов ГСК до трансплантации

Объект исследований: моча, сыворотка крови.

Метод выбора: качественная ПЦР.

Выявляемые маркеры: ДНК ВК вируса, ДНК JC вируса.

Периодичность исследований: однократно.

Варианты возможных пар Донор/Реципиент (Д/Р) при аллогенной ТГСК: Д+/Р+, Д-/Р+, Д-/Р-, Д+/Р-. На основании полученных данных проводится анализ статуса сформировавшихся пар Д/Р и их дифференциация по риску возникновения и развития посттрансплантационных полиомавирусных осложнений: для геноварианта Д-/Р- -- группа низкого риска, для геновариантов Д+/Р+, Д-/Р+, Д+/Р -- группа высокого риска.

Возможные геноварианты для реципиента при аутологичной ТГСК: Р- -- наличие низкого риска, Р+ -- наличие высокого риска.

5.2 Диагностика ПВИ у реципиентов ГСК после трансплантации

В отношении реципиентов ГСК осуществляется как регулярный мониторинг ПВИ (для предотвращения развития вирусных посттрансплантационных осложнений), так и их обследование по клиническим показаниям (при наличии у реципиентов клинических симптомов, указывающих на возможное развитие геморрагического цистита или других патологий мочевыводящей системы).

Порядок его проведения включает в себя три этапа.

5.2.1 I этап - скрининг на ВК и JC вирурию

Объект исследований: моча.

Метод выбора: качественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК ВК вируса, ДНК JC вируса.

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

Для реципиентов группы высокого риска 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 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 является основанием для осуществления мониторинга ВК и/или JC вiremии (выявления ВК и/или JC вируса в сыворотке крови).

5.2.2 II этап – исследование на ВК и/или JC вiremию

Объект исследований: сыворотка крови.

Метод выбора: качественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК ВК вируса, ДНК JC вируса.

Результаты исследований интерпретируются следующим образом.

А) При отсутствии лабораторного подтверждения ВК и/или JC вiremии продолжается мониторинг возбудителей ПВИ в моче согласно п. 4.2.1

Б) Лабораторное подтверждение ВК и/или JC вiremии у реципиента является основанием для осуществления III этапа обследования

5.2.3 III этап - исследование сыворотки крови пациента методом количественной ПЦР и определение вирусной нагрузки.

Объект исследований: сыворотка крови.

Метод выбора: количественная ПЦР.

Определяемый маркер: вирусная нагрузка ВК и/или JC вируса (копий/мл).

Результаты исследований интерпретируются следующим образом.

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

При показателе вирусной нагрузки в сыворотке крови в пределах от 200 копий/мл до 10000 копий/мл - 1 раз в 2 недели.

Показатель вирусной нагрузки в сыворотке крови больше 10000 копий/мл имеет важную предиктивную ценность и является показанием для снижения иммуносупрессии и начала специфической противовирусной терапии. В данных условиях мониторинг ВК и/или JC 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 ВК и/или JC вiremии в моче с периодичностью 1 раз в месяц. При получении отрицательного результата исследования мочи 2 раза подряд мониторинг осуществляется 1 раз в 3 месяца.

6 Взятие биологического материала для вирусологического исследования

Осуществляется стерильными одноразовыми инструментами в стерильные одноразовые пластиковые пробирки с закручивающимися крышками или пробирки объемом 1,5 мл с защелкой.

6.1 Кровь

Забор крови проводится рутинным методом.

Предварительная обработка проб.

Получение сыворотки крови проводится рутинным методом.

Условия хранения.

Образцы сыворотки крови хранятся при температуре 2-8°C в течение 5 суток, при температуре минус 20°C – длительно. Допускается только одноразовое 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.

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 суток.

6.2 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 минус 20°C – длительно.

Допускается только одноразовое 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 суток.

7 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.

8 Детекция ДНК ВК и JC вирусов и определение вирусной нагрузки

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

8.1 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.

8.2 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.

9 Установление диагноза

Лабораторное подтверждение ВК вирусной вирурии и/или виремии является основанием для постановки диагноза «ВК вирусная инфекция».

Лабораторное подтверждение JC вирусной вирурии и/или виремии является основанием для постановки диагноза «JC вирусная инфекция».

10 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:

- 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.

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.