

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д. Л. Пиневич

« 08 » _____ 2014 г.

Регистрационный № 264-1213



**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ДИЛАТАЦИОННОЙ
КАРДИОМИОПАТИЕЙ**

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.

Минск, 2013

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

« 06 » 06 _____ 2014 г.

Регистрационный № 264-1213

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ДИЛАТАЦИОННОЙ
КАРДИОМИОПАТИЕЙ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д.м.н., профессор Амвросьева Т.В., к.б.н. Поклонская Н.В., Богуш З.Ф.

Минск, 2013

Настоящая инструкция по применению (далее - инструкция) предназначена для врачей-кардиологов, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, врачей-вирусологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики. Инструкция содержит описание методов, схемы и порядка проведения лабораторной диагностики вирусных инфекций, ассоциированных с развитием дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) у пациентов с данной патологией.

1 Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

- 1 автоклав;
- 2 автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5 – 10 мкл, 2мкл – 20мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл;
- 3 анализатор иммуноферментный;
- 4 вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз);
- 5 гомогенизатор механический;
- 6 ДНК-маркер 50-1000 пар оснований;
- 7 иономер;
- 8 источник тока для электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 9 изопропанол;
- 10 комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия);
- 11 камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 12 ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- 13 набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 14 набор для выделения РНК/ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе;

- 15 набор для выделения РНК/ДНК с помощью экстракции гуанидин-изотиоцианолом;
- 16 набор для обратной транскрипции;
- 17 набор реагентов для амплификации ДНК вирусов простого герпеса I и II типов;
- 18 набор реагентов для амплификации ДНК вирусов Варицелла Зостер;
- 19 набор реагентов для амплификации ДНК цитомегаловирусов;
- 20 набор реагентов для амплификации ДНК аденовирусов;
- 21 набор реагентов для амплификации кДНК энтеровирусов;
- 22 набор реагентов для амплификации ДНК вирусов Эпштейна Барр;
- 23 набор реагентов для амплификации ДНК парвовируса В 19;
- 24 набор реагентов для амплификации ДНК вирусов герпеса человека 6 типа;
- 25 наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой «RNase, DNase free») (0,5 – 10 мкл, 2 – 20мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл);
- 26 набор инструментов: ножницы, скальпель, пинцеты;
- 27 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»);
- 28 перекись водорода по ТУ 6-02-570-75 ОСЧ;
- 29 раствор для стабилизации РНК;
- 30 система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 31 система для автоматической промывки планшетов;
- 32 транспортная среда;
- 33 тест-система для выявления антител класса М к энтеровирусам методом ИФА;
- 34 тест-система для выявления антител класса М к вирусам Варицелла Зостер методом ИФА;
- 35 тест-система для выявления антител класса М к цитомегаловирусам

- методом ИФА;
- 36 тест-система для выявления антител класса М к вирусам Эпштейна Барр методом ИФА;
- 37 тест-система для выявления антител класса М к аденовирусам методом ИФА;
- 38 тест-система для выявления антител класса М к вирусам простого герпеса I и II типов методом ИФА;
- 39 тест-система для выявления антител класса М к вирусам герпеса человека 6 типа методом ИФА;
- 40 термостат, регулируемый до $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$;
- 41 термоциклер;
- 42 твердотельный термостат (для пробирок типа «Эппендорф»);
- 43 трансиллюминатор (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 44 хлороформ, х. ч. по ТУ 2631-02-11291058-96;
- 45 холодильник-морозильник (-20°C , $+4^{\circ}\text{C}$);
- 46 центрифуга рефрижераторная на 1-5 тыс. об./мин;
- 47 центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф, не менее 14000 об./мин);
- 48 центрифуга-вортекс;
- 49 этиловый спирт по ГОСТ 5962-67.

2 Показания к проведению вирусологического обследования пациентов с ДКМП и его предмет

Показаниями являются:

- наличие в анамнезе пациента с ДКМП клинических симптомов вирусной инфекции и данных эпидемиологического анализа,
- необходимость проведения трансплантации сердца.

3 Объекты исследований

Объектами исследований являются:

- кровь;

- клетки крови;
- сыворотка крови;
- носоглоточные смывы;
- фекалии;
- биоптаты/аутоптаты сердца.

4 Порядок вирусологического обследования пациентов с ДКМП

Лабораторная диагностика вирусных инфекций у пациентов с ДКМП осуществляется в отношении цитомегаловируса (ЦМВ), энтеровирусов (ЭВ), вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), вирусов простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1 и 2 т.), вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6), варицелла-зостер вируса (ВЗВ), аденовирусов (АдВ), парвовируса В19 (ПВ В19) по схеме, представленной на рисунке 1.

4.1 Проведение предварительной вирусологической диагностики (серодиагностики) – I этап обследования

Исследования желательно проводить в неэпидемический период для снижения вероятности получения данных, связанных с сезонными подъемами заболеваемости вирусными инфекциями.

Цель: выявление текущей и/или недавно перенесенной вирусной инфекции.

Метод исследований: ИФА.

Объект исследований: сыворотка крови.

Выявляемые маркеры: Ig M в отношении ЭВ, АдВ, ПВ-В19, ВПГ 1 и 2 т., ЦМВ, ВЭБ, ВЗВ, ВГЧ 6.

Оценка и интерпретация результатов исследования: положительный результат свидетельствует о текущей/недавно перенесенной инфекции и является показанием к повторному серологическому обследованию пациента. Положительный результат при повторном серологическом исследовании с интервалом > 2-6 месяцев указывает на наличие постоянного антигенного стимула и является показанием для проведения II этапа обследования.

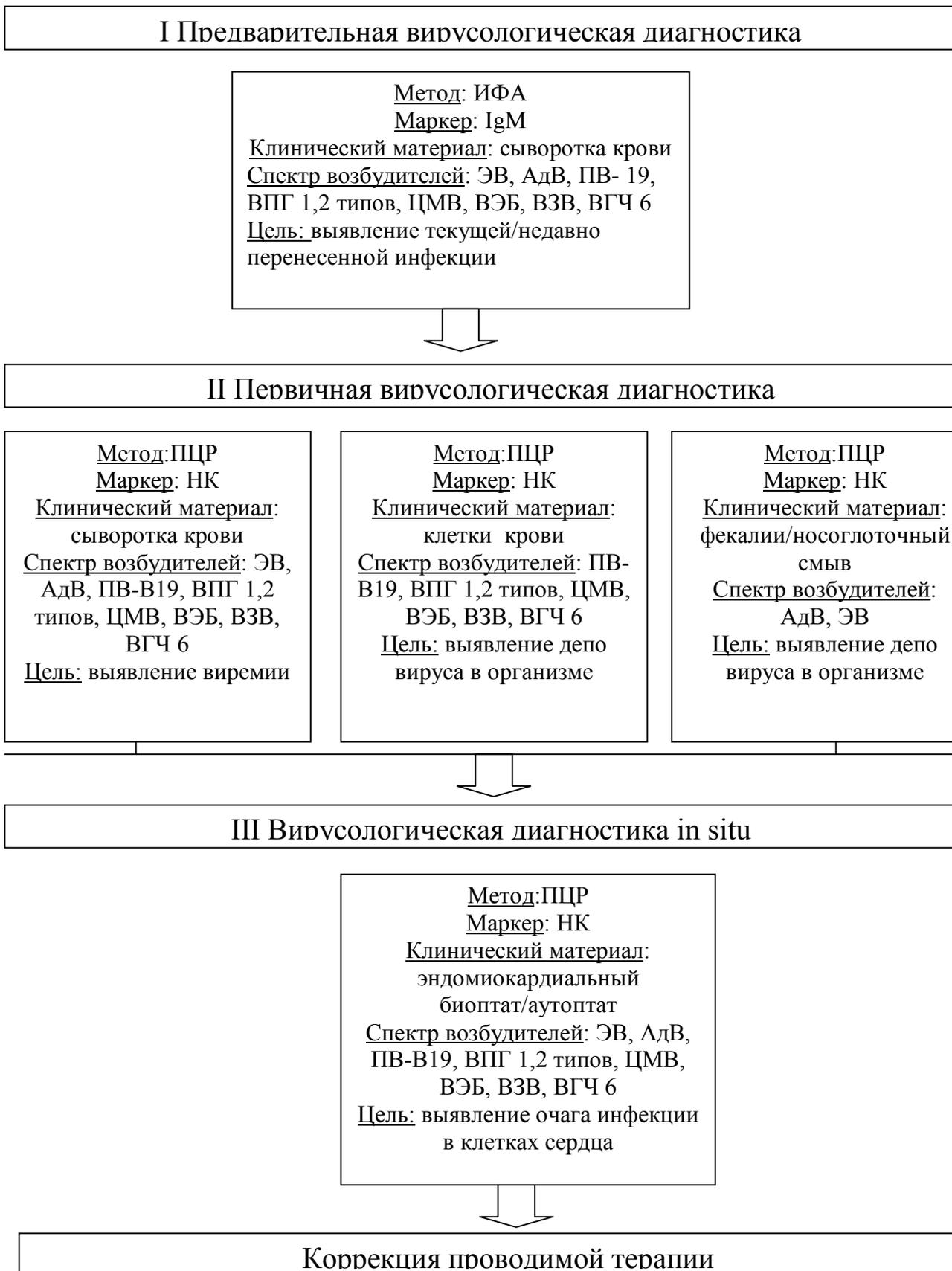


Рисунок 1 – Схема вирусологического обследования пациентов с ДКМП

4.2 Проведение первичной вирусологической диагностики (генодиагностики) – II этап обследования

Цель: выявление виремии или депо вируса в организме.

Метод исследований: ПЦР.

Объект исследований: сыворотка крови, клетки крови, носоглоточные смывы, фекалии.

Выявляемые маркеры: РНК ЭВ, ДНК АдВ, ДНК ПВ-В19, , ДНК ЦМВ, ДНК ВЭБ, ДНК ВЗВ, ДНК ВПГ 1 и 2 т., ДНК ВГЧ 6.

Оценка и интерпретация результатов исследований: положительный результат указывает на присутствие очага вирусной инфекции в организме пациента без установления локализации патологического процесса - обнаружение РНК/ДНК вирусных агентов в сыворотке крови свидетельствует о наличии виремии у пациента с ДКМП; обнаружение РНК/ДНК вирусных агентов в клетках периферической крови, носоглоточных смывах и фекалиях указывает на наличие депо вирусов в организме пациента. Положительный результат этого этапа обследования является показанием для проведения III этапа вирусологического обследования.

4.3 Проведение вирусологической диагностики in situ (генодиагностика) - III этап обследования

Цель: выявление очага инфекции в клетках сердца.

Метод исследований: ПЦР.

Объект исследований: эндомиокардиальный биоптат/аутоптат.

Выявляемые маркеры: РНК ЭВ, ДНК АдВ, ДНК ПВ-В19, ДНК ЦМВ, ДНК ВЭБ, ДНК ВЗВ, ДНК ВГЧ 6, ДНК ВПГ 1 и 2 т.

Оценка и интерпретация результатов исследований: положительный результат выявления РНК/ДНК вирусных патогенов in situ в клетках сердца свидетельствует об ассоциации ДКМП с вирусной инфекцией.

5 Тактика ведения пациентов с подтвержденной вирусной инфекцией сердца

При наличии у пациента с ДКМП вирусной инфекции, локализованной в клетках сердца, рекомендуется их совместное ведение врачом-кардиологом и врачом-инфекционистом для согласования и выработки адекватной стратегии терапии, направленной, в том числе, на коррекцию вирусиндуцированных поражений сердечных тканей.

5.1 Вирусологические критерии для определения тактики лечения пациентов с вирусассоциируемой ДКМП.

Обнаружение серологических маркеров вирусных патогенов при отсутствии манифестных проявлений инфекционного заболевания свидетельствует о недавно перенесенной пациентом с ДКМП вирусной инфекции, но не позволяет точно установить наличие инфекционного процесса в его организме в момент обследования. В случаях клинических проявлений хронического или острого вирусного заболевания, положительный результат серодиагностики расценивается как косвенное подтверждение диагноза сопутствующего вирусного заболевания, являющегося фактором риска развития ДКМП, что может служить основанием для применения индивидуальной антивирусной терапии. Выявление генетических маркеров возбудителей вирусных инфекции на этапах генодиагностики, при наличии анамнестических и клинических показаний, является основанием для включения в традиционную терапевтическую схему соответствующих антивирусных средств.

6 Забор биологического материала для вирусологического исследования

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

6.1 Кровь. Забор крови производится натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл. Забранная кровь переносится в пробирку без антикоагулянта.

Предварительная обработка проб. Для получения сыворотки крови образцы цельной крови инкубируются в течение 30 мин при температуре 37⁰С, а затем центрифугируются при 1500 об/мин в течение 10 мин, после чего сыворотка отбирается в стерильную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл. Клетки периферической крови в виде сгустка оставляются в исходной пробирке для забора крови.

Условия хранения. Образцы цельной крови хранятся при температуре 2-25⁰С в течение 12 ч, при температуре 2-8⁰С – в течение 1 суток. Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

Образцы сыворотки хранятся при температуре 2-8⁰С в течение 5 суток, при температуре минус 20⁰С – 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.

Образцы сгустков крови хранятся при температуре 2-8⁰С в течение 1 суток, при температуре минус 20⁰С – длительно. Допускается только одноразовое замораживание-оттаивание материала.

6.2 Биопсийный и аутопсийный материал. Забор образцов эндомикардиальных биоптатов/аутоптатов осуществляется в пробирки, содержащие 250 мкл специальной транспортной среды (см. п.6.5).

Условия хранения. При температуре 2-8⁰С биоптаты/аутоптаты хранятся в течение 1 суток, при температуре минус 20⁰С – длительно. Допускается только одноразовое замораживание-оттаивание материала.

6.3 Фекалии. Пробы в количестве (объемом) примерно 1 - 3 г (1 - 3 мл) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносятся в сухой стерильный флакон. Исследование мазков неинформативно из-за низкого содержания в них возбудителей.

Предварительная обработка проб. При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовится фекальная суспензия (при водянистой консистенции фекалий суспензия не готовится). Для этого в стерильную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл вносится 0,9 мл фосфатно-солевого буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида) и 0,1 г (0,1мл) фекалий, используя наконечник с аэрозольным барьером. Проба тщательно ресуспендируется на вортексе до образования гомогенной суспензии. При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к 10%-ной суспензии фекалий в фосфатном буфере (или стерильном изотоническом растворе натрия хлорида) добавляется глицерин в конечной концентрации 10-15%. Подготовленные таким образом пробы замораживаются только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30-40 мин.

Условия хранения. При температуре 2-8°C пробы хранятся в течение 1 суток, при температуре минус 20°C – длительно. Допускается только одноразовое замораживание-оттаивание материала.

6.4 Носоглоточные смывы. Слизь забирается с помощью сухих стерильных ватных тампонов. После взятия материала тампон помещается в одноразовую пробирку с 1 мл транспортной среды, вращается в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. После прижатия зонда к стенке пробирки и отжатия избытка жидкости, зонд удаляется, а пробирка герметично закрывается.

Условия хранения. При температуре 2-8°C материал хранится в течение 1 недели, при температуре минус 20°C – длительно. Допускается только одноразовое замораживание-оттаивание материала.

6.5 Условия транспортирования биологического материала. Транспортирование осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре 2-8°C в течение 1 суток, в замороженном виде – в течение 1 суток. С целью предотвращения повреждения РНК/ДНК-мишеней возможно использование

транспортных сред различного состава в зависимости от вида исследуемого материала. При необходимости длительного хранения и транспортирования, при отсутствии низкотемпературных холодильников используется специальная транспортная среда ESP. Исследуемый материал может храниться в среде ESP при комнатной температуре (20-30°C) в темном месте в течение 10 дней. Состав транспортной среды ESP: саркозил 1%; ЭДТА 0,05 М; свободная от нуклеаз проназа Е 1 мг/мл.

7 Подготовка образцов для исследования

7.1 Носоглоточный смыв, сыворотка крови и сгусток крови (клетки периферической крови) не требуют предварительной пробоподготовки перед выделением РНК/ДНК вирусных патогенов.

7.2 Эндомиокардиальный биоптат (пунктат) извлекается из транспортной среды и помещается в пробирку с лизирующим раствором, входящим в состав набора для выделения РНК/ДНК. Материал гомогенизируется с помощью механического гомогенизатора.

Образец секционного материала тканей сердца извлекается из пробирки с транспортной средой в стерильную чашку Петри и с помощью стерильных ножниц/скальпеля и пинцета отделяют фрагмент 5x5x2 мм (около 100 мг). Данный фрагмент помещается в пробирку с лизирующим раствором и гомогенизируется с помощью механического гомогенизатора.

7.3 Используются фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленная суспензия фекалий или суспензия, подвергавшаяся замораживанию с глицерином для приготовления осветленного экстракта фекалий. Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируется на вортексе. Полученная суспензия осветляется путем центрифугирования при 12000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант (0,1мл) смешивается с фосфатно-солевым буфером (или стерильным изотоническим раствором натрия хлорида) (0,1 мл) в соотношении 1:1 и используется непосредственно для выделения РНК/ДНК.

8 Детекция серологических маркеров вирусов

Детекция серологических маркеров в сыворотке крови осуществляется методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем, зарегистрированных в установленном порядке. Постановка реакции проводится в соответствии с инструкцией производителя.

8.1 Возможные проблемы в прохождении реакции ИФА и меры их устранения

А. Показатели оптической плотности положительного и отрицательного контроля ниже порогового уровня.

Б. Соотношение показателей оптической плотности отрицательного и положительного контролей ниже регламентируемого инструкцией по применению.

В. Не развивается окраска после добавления субстратно-индикаторного раствора.

Меры устранения: не допускается повторное использование одноразовых наконечников для автоматических пипеток, требуется строгое соблюдение технологии постановки ИФА, температурного и временного режимов прохождения реакции.

9 Детекция генетических маркеров вирусов

Детекция генетических маркеров в образцах клинического материала (сыворотка крови, клетки крови, осветленные экстракты фекалий, носоглоточные смывы, биопсийный материал) осуществляется методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем, зарегистрированных в установленном порядке. Постановка реакции проводится в соответствии с инструкцией производителя.

9.1 Исследование проб клинического материала методом ПЦР (ОТ-ПЦР)

9.1.1 Выделение РНК/ДНК из проб клинического материала

Рекомендуется использовать наборы для одновременного выделения РНК и ДНК из пробы клинического материала.

Выделение РНК/ДНК из жидких проб клинического материала (сыворотка крови, осветленные экстракты фекалий, носоглоточные смывы) осуществляется с использованием коммерческих наборов, основанных на адсорбции РНК/ДНК на силиконовом носителе с последующей элюцией в соответствии с инструкцией производителя.

Выделение РНК/ДНК из биоптатов сердца (эндомиокардиальные биоптаты (пунктаты), секционный материал тканей сердца) проводится с использованием коммерческих наборов, основанных на экстракции РНК/ДНК гуанидин-изотиоцианолом и последующем осаждении изопропанолом в соответствии с инструкцией производителя.

9.1.2 Постановка обратной транскрипции

Осуществляется для РНК-содержащих вирусов (ЭВ) с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией производителя.

9.1.3 Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Рекомендуется использовать наборы с гибридационно-флюоресцентной или электрофоретической детекцией продуктов реакции. Наиболее эффективно использование наборов с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Материалом для исследования в отношении ЭВ является кДНК, полученная на этапе 9.1.2.

Материалом для исследования в отношении ВПГ, ЦМВ, ВЗВ, ВЭВ, ВГЧ 6, АдВ, ПВ-В19 является ДНК, полученная на этапе 9.1.1.

9.1.4 Анализ ПЦР-амплифицированной ДНК (учет результатов)

При использовании наборов с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции учет результатов проводится с использованием специального оборудования в соответствии с инструкцией производителя.

При использовании наборов с электрофоретической детекцией продуктов реакции учет результатов проводится после постановки горизонтального электрофореза в агарозном геле.

9.1.5 Возможные проблемы при постановке ПЦР (ОТ-ПЦР) и их устранение

Отсутствие специфического сигнала в пробе положительного контроля или его наличие в пробе отрицательного контроля свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Отсутствие специфического сигнала в пробе положительного контроля указывает на возможную деградацию РНК/ДНК и/или внесение в реакционную смесь ингибиторов реакции. Пути устранения:

- при проведении данного этапа исследований необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников на всех стадиях постановки во избежание внесения ингибиторов реакции;

- для разведения выделенной РНК/ДНК применяется только РНК/ДНК-элюент, входящий в состав набора для выделения, или H₂O с маркировкой «для молекулярной биологии» во избежание загрязнения препарата РНКазы/ДНКазы.

Наличие специфического сигнала в образце отрицательного контроля свидетельствует о контаминации проб. Пути устранения:

- 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.

10 Противопоказания для осуществления вирусологического обследования пациентов с ДКМП

Противопоказания для осуществления предварительной и первичной вирусологической диагностики отсутствуют.

Противопоказанием к проведению генодиагностики *in situ* является состояние пациента, при котором противопоказано осуществление процедуры забора биоптата сердца.

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

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