

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д. Л. Пиневиц
«» 2020 г.
Регистрационный № 134-1119

АЛГОРИТМ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С МИОКАРДИТАМИ
инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Амвросьева Т.В., Богуш З.Ф.,
к.б.н. Поклонская Н.В., Аринович А. С.

Минск, 2019

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д. Л. Пиневич

« 04 » июня 2020 г.

Регистрационный № 134-1119

АЛГОРИТМ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С МИОКАРДИТАМИ
инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Амвросьева Т.В., Богущ З.Ф.,
к.б.н. Поклонская Н.В., Аринович А. С.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм выявления маркеров вирусных инфекций у пациентов с миокардитами, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику вирусных инфекций у пациентов с миокардитами.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-кардиологов, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, врачей-вирусологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с миокардитами в стационарах, и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Наличие в анамнезе или выявление симптомов вирусной инфекции у пациентов с миокардитами.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ДР.

Изделия медицинской техники:

термоциклер с оптическим модулем для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР);

ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;

термостат твердотельный;

термостат, регулируемый до $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

микроцентрифуга (1000-14000 об/мин);

миницентрифуга-вортекс;

центрифуга настольная лабораторная (1000-5000 об/мин);
анализатор иммуноферментный или мультискан;
система для автоматической промывки планшетов;
гомогенизатор;
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).

Изделия медицинского назначения:

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 РНК/ДНК;

набор реагентов для обратной транскрипции;

наборы реагентов для выявления ДНК вирусов на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени: цитомегаловируса; вируса Эпштейна-Барр; вирусов простого герпеса 1 и 2 типов; варицелла-зостер вируса; аденовирусов, вируса герпеса человека 6 типа, парвовируса В19;

наборы реагентов для выявления РНК вирусов на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени: энтеровирусов, вируса гепатита С, вирусов гриппа А и В;

тест-системы для выявления антител класса М методом ИФА к цитомегаловирусу, вирусу Эпштейна-Барр, энтеровирусам, вирусам простого герпеса 1 и 2 типов;

реагент для транспортировки и хранения биологического материала.

Реактивы:

вода деионизированная, стерильная, свободная от нуклеаз;

изопропанол;

тризол;

97,4% хлороформ;

3% перекись водорода;

70% этиловый спирт.

ТЕХНОЛОГИЯ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

Алгоритм выявления маркеров вирусных инфекций у пациентов с миокардитами включает 3 этапа исследований, схематично представленных на рисунке. Исследования осуществляются в отношении 12 наиболее распространенных возбудителей вирусных инфекций: цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), варицелла-зостер вируса (ВЗВ), вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6), вирусов простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1,2), энтеровирусов (ЭВ), аденовирусов (АдВ), парвовируса В19 (ПВ В19), вирусов гриппа А и В, вируса гепатита С (ВГС).

До начала осуществления диагностических исследований изучаются данные анамнеза пациента с миокардитом (сведения о перенесенных или имеющихся сопутствующих вирусных инфекциях).

1 этап. Детекция серологических маркеров возбудителей вирусных инфекции

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

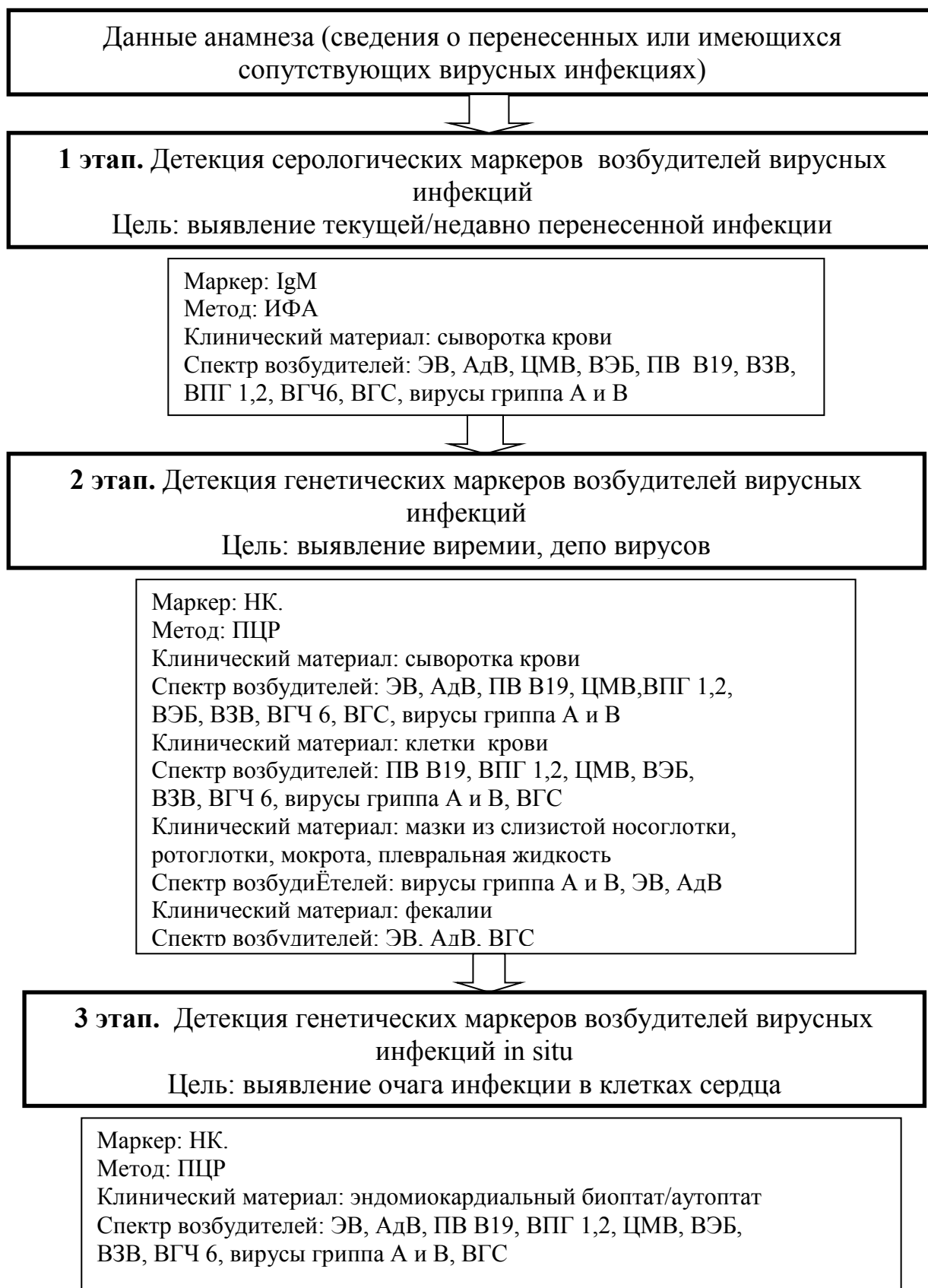


Рисунок – Схема выявления маркеров вирусных инфекций у
пациентов с миокардитами

Оценка и интерпретация результатов исследования: положительный результат свидетельствует о текущей/недавно перенесенной инфекции и является показанием к повторному серологическому обследованию. 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.

2 этап. Детекция генетических маркеров возбудителей вирусных инфекций

Оценка и интерпретация результатов исследований: положительный результат указывает на присутствие очага вирусной инфекции в организме пациента. Обнаружение РНК/ДНК вирусных агентов в сыворотке крови свидетельствует о наличии у пациента виремии. 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 является показанием для проведения следующего III этапа.

3 этап. Детекция генетических маркеров возбудителей вирусных инфекций *in situ*

Оценка и интерпретация результатов исследований: положительный результат выявления РНК/ДНК вирусных патогенов *in situ* в клетках сердца свидетельствует о наличии у пациента с миокардитом вирусной инфекции сердца.

4 ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение образцов биологического материала (кровь, сыворотка крови, клетки крови, мазки из слизистой носоглотки, ротоглотки, мокрота, плевральная жидкость, фекалии, эндомиокардиальный биоптат/аутоптат) и

их пробоподготовку проводят в соответствии с Методическими указаниями МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности»

Хранение биологического материала осуществляют при температуре 2-8°C в течение 1 суток, при температуре минус 20°C - длительно. Допускается только одноразовое замораживание-оттаивание материала.

Транспортирование биологических образцов осуществляют в термоконтейнерах с охлаждающими элементами в течение 1 суток.

5 ДЕТЕКЦИЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КАРДИОТРОПНЫХ ВИРУСОВ

Детекцию серологических маркеров осуществляют методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем согласно инструкциям по применению, генетических маркеров – методом ПЦР с использованием коммерческих наборов реагентов с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени согласно инструкциям по применению.

Для этих целей могут быть использованы любые диагностические наборы и тест-системы, зарегистрированные в установленном порядке на территории Республики Беларусь.

6 ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ПРИ ДЕТЕКЦИИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КАРДИОТРОПНЫХ ВИРУСОВ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

6.1 Возможные ошибки при постановке ПЦР

Проведение молекулярно-генетических исследований подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биологического материала, транспортирование, пробоподготовка и хранение; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной

ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что, в свою очередь, приводит к неверной интерпретации результатов.

Причины ложноположительных результатов: перекрестная контаминация от образца к образцу в процессе предварительной обработки и на стадии выделения ДНК; загрязненные в результате предыдущих исследований реагенты, необработанный инструментарий.

Причины ложноотрицательных результатов: деградация исследуемой ДНК/РНК, несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, несоблюдение технологии подготовки ПЦР смеси, наличие ингибиторов ПЦР, не соответствующий режим амплификации (неисправность оборудования).

Пути устранения: повторное выделение ДНК/РНК, использование на всех этапах исследования одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции, соблюдение холодной цепи.

6.2 Возможные ошибки при постановке ИФА

Причины ложноотрицательных результатов: нарушение технологии на этапах взятия биологического материала, транспортирования, пробоподготовки, хранения; приготовления анализируемых образцов; несоблюдение температурного режима помещений; неисправность лабораторного оборудования (системы для автоматической промывки планшетов, дозаторов, термостата, анализатора иммуноферментного), несоблюдение алгоритма постановки теста.

Причины ложноположительных результатов: перекрестная контаминация от образца к образцу в процессе пробоподготовки и приготовления анализируемых образцов; использование загрязненных реактивов и расходных материалов (лабораторная посуда, наконечники).

Пути устранения: повторное приготовление анализируемых образцов, использование на всех этапах исследования одноразовой чистой пластиковой посуды и наконечников, соблюдение температурного режима,

строгое соблюдение алгоритма выполнения лабораторных тестов согласно инструкциям по применению.