

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения -

Главный государственный санитарный врач

Республики Беларусь

_____ И. В. Гаевский

_____ 2014 г.

_____ Регистрационный № 015-1213



АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ ПЕРЕСАДКЕ ПОЧКИ

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.,
Кишкурно Е. П.

Минск, 2013

Настоящая инструкция по применению (далее инструкция) предназначена для врачей-трансплантологов, врачей-инфекционистов, врачей лабораторной диагностики. Инструкция содержит описание алгоритма проведения лабораторной диагностики вирусных инфекций у доноров и реципиентов почки.

1 Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, 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 анализатор иммуноферментный или мультискан;
- 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 ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе;
- 15 набор для выделения ДНК с помощью экстракции гуанидин-изотиоцианолом;

- 16 набор реагентов для амплификации ДНК вирусов простого герпеса I и II типов;
- 17 набор реагентов для амплификации ДНК вируса варицелла-зостер;
- 18 набор реагентов для амплификации ДНК цитомегаловируса;
- 19 набор реагентов для амплификации ДНК аденовирусов;
- 20 набор реагентов для амплификации ДНК БК-полиомавируса;
- 21 набор реагентов для амплификации ДНК вируса Эпштейна Барр;
- 22 набор реагентов для амплификации ДНК парвовируса В 19;
- 23 набор реагентов для амплификации ДНК вируса герпеса человека 6 типа;
- 24 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);
- 25 набор инструментов: ножницы, скальпель, пинцеты;
- 26 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»);
- 27 перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ);
- 28 система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 29 система для автоматической промывки планшетов;
- 30 транспортная среда;
- 31 тест-система для выявления антител класса G к цитомегаловирусу методом ИФА;
- 32 тест-система для выявления антител класса G к вирусу Эпштейна Барр методом ИФА;
- 33 тест-система для выявления антител класса G к вирусам простого герпеса I и II типов методом ИФА;
- 34 термостат, регулируемый до $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- 35 термоциклер;

36 трансиллюминатор (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);

37 хлороформ, х.ч. по ТУ 2631-02-11291058-96;

38 центрифуга рефрижераторная на 1-5 тыс. об./мин;

39 центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф», не менее 14000 об./мин);

40 центрифуга-вортекс;

41 холодильник-морозильник (-20°C, +4°C);

42 этиловый спирт по ГОСТ 5962-67

2 Объекты исследований

Объектами исследований являются:

- кровь;
- клетки крови;
- сыворотка крови;
- моча;
- биопсийный/аутопсийный материал.

3 Порядок вирусологического обследования доноров и реципиентов почки

Лабораторная диагностика вирусных инфекций у пациентов при пересадке почки осуществляется в отношении цитомегаловируса (ЦМВ), БК-полиомавируса (БКВ), 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), вируса гепатита В (ВГВ), вируса гепатита С (ВГС), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) по схеме, состоящей из 2 этапов (до и после трансплантации) и представленной на рисунке 1.

3.1 Обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации

3.1.1 Серологическое обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации в отношении ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 т

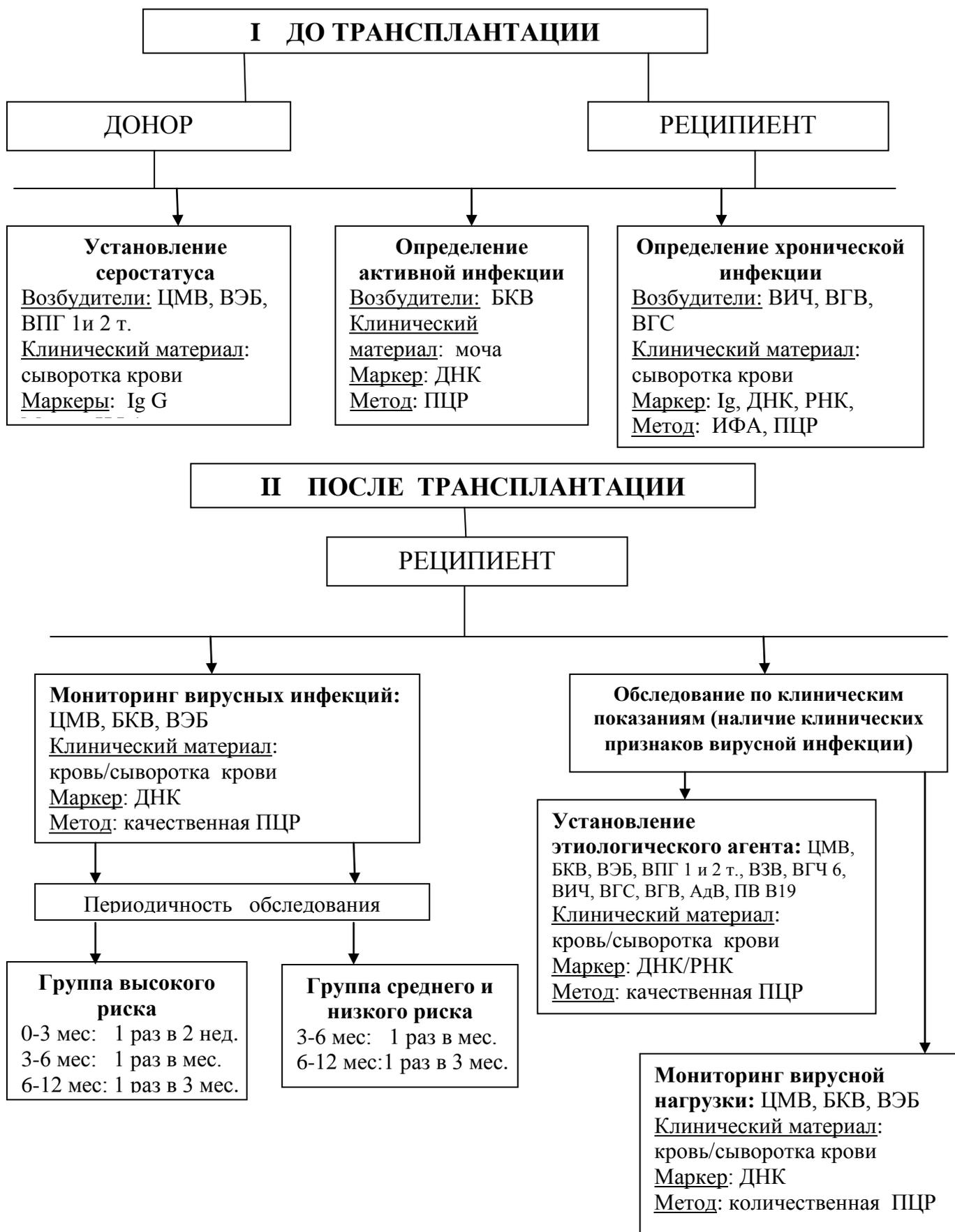


Рисунок 1 – Схема лабораторной диагностики вирусных инфекций при пересадке почки

Цель: определение серологического статуса в отношении ВПГ 1 и 2 т., ЦМВ, ВЭБ и последующая оценка результатов серологического обследования для формирования пар донор/реципиент (Д/Р).

Метод выбора: ИФА.

Объект исследований: сыворотка крови.

Выявляемые маркеры: Ig G к ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 т.

Периодичность исследований: единократно до взятия органа для трансплантации.

Возможные варианты серологического статуса пар Д/Р: Д+/Р+, Д-/Р+, Д-/Р-, Д+/Р-.

Далее по серостатусу обследуемых пар определяется принадлежность к одной из возможных групп риска возникновения и развития посттрансплантационных вирусных осложнений: для сероварианта Д-/Р- -- группа минимального риска, для серовариантов Д+/Р+, Д-/Р+ -- группа среднего риска, для сероварианта Д+/Р- -- группа высокого риска. Данные о серостатусе пар Д/Р являются основой для планирования антивирусной профилактики и антивирусного лечения реципиентов, а также для выработки рекомендаций по нецелесообразности использования почки от серопозитивного донора для пересадки серонегативному реципиенту.

3.1.2 Обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации в отношении БКВ инфекции

Цель: выявление активной инфекции.

Метод выбора: качественная ПЦР.

Объект исследований: моча.

Выявляемые маркеры: ДНК БКВ.

Периодичность исследований: единократно до взятия органа для трансплантации.

Возможные варианты пар Д/Р: Д+/Р+, Д-/Р+, Д-/Р-, Д+/Р-.

На основании полученных данных проводится анализ статуса пар Д/Р по риску возникновения и развития посттрансплантационных БКВ осложнений:

для геноварианта Д-/Р- -- группа минимального риска, для геновариантов Д+/Р+, Д-/Р+, Д+/Р- -- группа высокого риска.

3.1.3 Обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации в отношении ВГВ, ВГС и ВИЧ инфекций

Обследование пациентов на маркеры ВГС и ВГВ осуществляется в соответствии с действующим на территории Республики Беларусь СанПиН, регламентирующим требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов.

Обследование доноров и реципиентов почки до трансплантации в отношении ВИЧ осуществляется в соответствии с действующими на территории Республики Беларусь нормативными документами, регламентирующими проведение лабораторной диагностики ВИЧ инфекции. Наличие положительных результатов обследования на маркеры ВИЧ как у доноров, так и у реципиентов является противопоказанием для трансплантации почки.

3.2 Обследование реципиентов почки после трансплантации

В отношении реципиентов почки осуществляется регулярный мониторинг вирусных инфекций, вызываемых ЦМВ, БКВ и ВЭБ для предотвращения развития вирусных посттрансплантационных осложнений. Кроме того, при наличии у реципиентов клинических симптомов, указывающих на возможное развитие инфекций вирусной этиологии, проводится их обследование по клиническим показаниям в отношении следующих потенциальных возбудителей - ЦМВ, БКВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 т., ВЗВ, ВГЧ 6, ВИЧ, ВГС, ВГВ, АдВ, ПВ В19. Порядок его проведения описан в разделах 3.2.1 - 3.2.5 настоящей инструкции.

3.2.1 Посттрансплантационный мониторинг ЦМВ инфекции

ЦМВ инфекция относится к числу наиболее часто регистрируемых инфекционных осложнениям у реципиентов почки.

Метод выбора: качественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК ЦМВ.

Объект исследований: кровь/сыворотка крови.

Периодичность исследований: зависит от наличия/отсутствия профилактической терапии.

На фоне проводимой противовирусной профилактики (ганцикловиром или др. этиотропными препаратами):

- с 3 до 6 мес. - 1 раз в мес. (на 3, 4, 5, 6 мес. после трансплантации);
- с 6 до 12 мес. – 1 раз в 3 мес. (на 9, 12 мес. после трансплантации).

Без применения профилактической терапии:

- с 0 до 3 мес. - 1 раз в неделю;
- с 3 до 6 мес. – 1 раз в мес.;
- с 6 до 12 мес. – 1 раз в 3 мес.

Обследование реципиентов почки по клиническим показаниям. Наличие клинических признаков ЦМВ инфекции и лабораторно подтвержденной ЦМВ виремии (положительный результат качественной ПЦР) является основанием для мониторинга вирусной нагрузки.

Цель: выявление динамики вирусной нагрузки и назначение специфической терапии при достижении пороговых значений.

Метод выбора: количественная ПЦР.

Детектируемый маркер: ДНК ЦМВ (количество копий/мл).

Периодичность исследований: 1 раз в неделю.

Пороговые значения вирусной нагрузки для начала терапии:

- для реципиентов групп минимального (Д-/Р-) и среднего (Д+/Р+, Д-/Р+) риска диагностически значимым показателем является количество ДНК ЦМВ ≥ 2600 копий/мл;

- для реципиентов группы высокого риска (Д+/Р-) пороговое значение составляет ≥ 1000 копий/мл.

Оценка эффективности терапии. Для оценки результативности применяемой терапии мониторинг вирусной нагрузки осуществляется с периодичностью 1 раз в неделю в течение всего срока терапии.

В случае положительной динамики снижения вирусной нагрузки к концу терапии следует продолжить мониторинг ЦМВ инфекции согласно п. 3.2.1.

Отсутствие положительной динамики или увеличение вирусной нагрузки является показанием для определения резистентности ЦМВ к применяемому противовирусному средству и последующей коррекции антивирусной терапии.

3.2.2 Посттрансплантационный мониторинг БКВ инфекции

Метод выбора: качественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК БКВ.

Объект исследований: моча.

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

Для реципиентов группы высокого риска (Д+/Р+, Д-/Р+, Д+/Р-) 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 (Д-/Р-) 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, а также выявление у реципиента необъяснимого роста креатинина в сыворотке крови является основанием для осуществления мониторинга БКВ вiremии (выявления БКВ в сыворотке крови).

Мониторинг БКВ вiremии.

Метод выбора: качественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК БКВ.

Объект исследований: сыворотка крови.

Результаты исследований интерпретируются следующим образом.

А) При отсутствии лабораторного подтверждения БКВ вiremии продолжается мониторинг БКВ в моче согласно п. 3.2.2

Б) Лабораторное подтверждение БКВ вiremии у реципиента является основанием для исследования сыворотки крови пациента методом количественной ПЦР и определения вирусной нагрузки.

При показателе вирусной нагрузки в сыворотке крови меньше 200 копий/мл мониторинг БКВ 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 продолжается мониторинг БКВ вiremии с периодичностью 1 раз в 2 недели.

Показатель вирусной нагрузки в сыворотке крови больше 10000 копий/мл и отсутствие признаков дисфункции аллографта являются показанием для снижения иммуносупрессии и начала специфической противовирусной терапии (например, применение лефлуномида, обладающего не только иммуносупрессивным, но и антивирусным действием). В данных условиях мониторинг БКВ вiremии продолжается с периодичностью 1 раз в 2 недели.

Показатель вирусной нагрузки больше 10000 копий/мл и наличие у реципиента признаков дисфункции аллографта, либо показатель вирусной нагрузки больше 50000 копий/мл являются показанием для проведения биопсии почки с целью выявления БКВ нефропатии и коррекции проводимой терапии по полученным результатам исследования биоптата. При этом мониторинг БКВ 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 БКВ в моче с периодичностью 1 раз в месяц. При получении отрицательного результата исследования мочи 2 раза подряд мониторинг осуществляется 1 раз в 3 месяца.

3.2.3 Посттрансплантационный мониторинг ВЭБ инфекции

Метод выбора: качественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК ВЭБ.

Объект исследований: кровь/сыворотка крови.

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

Для реципиентов группы высокого риска (Д+/Р-) 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 среднего риска (Д-/Р+, Д+/Р+) в периоды:

- с 0 до 3 мес. – 1 раз в мес.;
- с 3 до 12 мес. – 1 раз в 3 мес.

Для реципиентов группы низкого риска (Д-/Р-) рекомендуется проведение диагностики ВЭБ инфекции по клиническим показаниям.

Обследование реципиентов почки по клиническим показаниям.

Основанием для проведения обследования является наличие у пациента клинических признаков ВЭБ инфекции, наличие ВЭБ виремии (положительный результат качественной ПЦР), а также острое отторжение аллографта.

Цель: выявление динамики вирусной нагрузки и назначение специфической терапии при достижении пороговых значений.

Метод выбора: количественная ПЦР.

Детектируемый маркер: ДНК ВЭБ (количество копий/мл).

Объект исследований: кровь/сыворотка крови.

Периодичность исследований: 1 раз в 2 недели.

Интерпретация результатов количественной ПЦР.

Если при исследовании крови пациента 2 раза подряд с интервалом в 2 недели отмечается снижение вирусной нагрузки, это свидетельствует о транзиторной виремии и не требует терапевтического вмешательства. В этом случае необходимо продолжать мониторинг вирусной нагрузки с периодичностью 1 раз в 2 недели. После элиминации вируса мониторинг осуществляется согласно п. 3.2.3.

Сохранение вирусной нагрузки на том же уровне при повторном исследовании свидетельствует о персистентной виремии. В данном случае необходимо руководствоваться значениями вирусной нагрузки:

- при уровне вирусной нагрузки < 10000 копий/мл следует продолжать мониторинг с периодичностью 1 раз в 2 недели;

- при уровне вирусной нагрузки ≥ 10000 копий/мл и сохранении ее в течение 2 и более недель необходима коррекция терапии (снижение уровня иммуносупрессии и назначение противовирусных средств).

Оценка эффективности проводимой терапии осуществляется так же, как и в отношении ЦМВ (п. 3.2.1).

3.2.4 Посттрансплантационный мониторинг ВПГ 1 и 2 т., ВЗВ, ВГЧ 6 инфекций

Мониторинг ВЗВ, ВГЧ 6 инфекций осуществляется по клиническим показаниям.

Тактика осуществления мониторинга ВПГ 1 и 2 т. инфекции зависит от группы риска, к которой относятся реципиенты по серостатусу (см. п. 3.1.1).

В отношении реципиентов Д+/Р+, Д-/Р+, Д-/Р- вирусологическая диагностика осуществляется по клиническим показаниям.

В отношении реципиентов Д+/Р- мониторинг осуществляют следующим образом:

Метод выбора: качественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК ВПГ 1 и 2 т.

Объект исследований: кровь/сыворотка крови.

Периодичность исследований:

- с 0 до 3 мес – 1 раз в мес.;
- с 3 до 12 мес – 1 раз в 3 мес.

Обследование реципиентов по клиническим показаниям. Основанием для проведения обследования в данном случае является наличие у пациента клинических проявлений вирусного заболевания и положительного результата качественной ПЦР. Рекомендуется назначение специфической противовирусной терапии.

Оценка эффективности применяемой терапии.

Метод выбора: количественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК ВПГ, ДНК ВЗВ, ДНК ВГЧ 6 (количество копий/мл).

Объект исследований: кровь/сыворотка крови.

Периодичность исследований: 1 раз в 2 недели.

Мониторинг проводимой терапии с периодичностью 1 раз в 2 недели осуществляется вплоть до получения отрицательного результата. При отсутствии положительной динамики снижения вирусной нагрузки целесообразно проведение лабораторной диагностики резистентности возбудителя к используемому препарату.

3.2.5 Посттрансплантационный мониторинг АдВ и ПВ В19 инфекций

Вирусологическая диагностика АдВ и ПВ В19 инфекций осуществляется по клиническим показаниям.

Метод выбора: качественная ПЦР.

Определяемый маркер: ДНК АдВ, ДНК ПВ В19.

Объект исследований: сыворотка крови.

Периодичность исследований: 1 раз в 2 недели.

При получении положительного результата качественной ПЦР необходимо рассмотреть возможность снижения уровня иммуносупрессии.

Повторные вирусологические исследования проводятся каждые 2 недели вплоть до получения отрицательного результата.

В случае длительной регистрации положительного результата качественной ПЦР и наличия признаков дисфункции аллографта целесообразно проведение биопсии почки.

4 Забор биологического материала для вирусологического исследования

Забор образцов клинического и секционного материала осуществляется стерильными одноразовыми инструментами в стерильные одноразовые пластиковые пробирки с закручивающимися крышками или пробирки объемом 1,5 мл с защелкой.

4.1 Кровь

Забор крови производится натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл. Для получения сыворотки крови 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 3000 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 крови 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 2-8°C в течение 1 суток, при температуре минус 20°C – длительно. Допускается только одноразовое замораживание-оттаивание материала.

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.

4.2 Моча

Для анализа отбирается первая порция утренней мочи в количестве 1 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

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.

4.3 Биопсийный и аутопсийный материал

Забор образцов осуществляется в пробирки, содержащие 250 мкл специальной транспортной среды (см. Примечание).

Условия хранения. При температуре 2-8°C биоптаты/аутоптаты хранятся в течение 1 суток, 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 не более 8 ч.

Примечание. 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 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.

5 Подготовка образцов для исследования

Сыворотка крови и сгусток крови (клетки периферической крови) не требуют предварительной пробоподготовки перед выделением ДНК вирусных патогенов.

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

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

Образец секционного материала тканей 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.

6 Детекция серологических маркеров вирусов

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

6.1 Возможные проблемы в прохождении реакции ИФА и меры их устранения.

Несоответствие показателей оптической плотности положительного и отрицательного контролей пороговым значениям, а также несоответствие соотношения показателей оптической плотности положительного и отрицательного контролей критериям, изложенным в инструкции на соответствующую тест-систему, свидетельствуют о невозможности учета результатов реакции.

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

7 Детекция генетических маркеров вирусов и определение вирусной нагрузки

Детекция ДНК вирусов в образцах клинического материала (цельная кровь, сыворотка крови, биопсийный и аутопсийный материал) осуществляется методом качественной ПЦР. Определение вирусной нагрузки осуществляется методом количественной ПЦР.

7.1 Выделение ДНК из проб клинического материала

Выделение ДНК из жидких образцов клинического материала (цельная кровь, 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.

Выделение ДНК из образцов тканей (биоптат/аутоптат (пунктат), секционный материал тканей, архивный материал) проводится с использованием диагностических наборов, основанных на экстракции ДНК гуанидин-изотиоцианолом и последующем осаждении изопропанолом, зарегистрированных в установленном порядке. Постановка реакции проводится в соответствии с инструкцией производителя.

7.2 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.

7.2.1 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.

8 Противопоказания для осуществления вирусологического обследования доноров и реципиентов

Противопоказания для осуществления вирусологического обследования доноров и реципиентов с использованием в качестве клинического материала крови и мочи отсутствуют.

Противопоказания к проведению генодиагностики *in situ* соответствуют противопоказаниям для выполнения инвазивной процедуры забора биопсии почки.

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.