

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

\_\_\_\_\_ 2016 г.

\_\_\_\_\_ Указанный № 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

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм диагностики инфекции вызванной вирусом герпеса человека 6 типа (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.

## 1 ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ И Т.Д.

- амплификатор для пробирок 0,5 мл или для пробирок 0,2 мл ;
- термоциклер для проведения ПЦР в режиме реального времени;
- компьютер с программным обеспечением для управления амплификатора;
- ламинарный бокс;
- центрифуга – вортекс;
- микроцентрифуга с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф» не менее 13 000 об/мин);
- анализатор иммуноферментный;
- холодильник с морозильной камерой (от +4°C до +8°C, от минус 18°C до минус 20°C);
- термостат;
- автоматические дозаторы переменного объема (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, 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.

## 2 ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Клинико-лабораторных и/или эпидемиологические данные о возможности развития герпесвирусной инфекция 6 типа (В 34.9).

## 3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

## 4 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований являются:

- сыворотка крови,
- лейкоциты крови,
- ликвор,
- слюна.

## 5 ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

*5.1.Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала.*

5.1.1. Для получения лейкоцитов взятие крови производят натошак или через 3 часа 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.

5.1.2. Для получения сыворотки взятие крови проводят натошак или через 3 часа 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 пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 3 тыс. 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°C до +8°C, в течение 24 часов, при температуре минус 20°C — в течение 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°C до + 25°C — в течение 2 часов; при температуре от +4°C до +8°C — в течение 12 часов. Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

5.1.3. 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 минус 20°C. Последующая транспортировка осуществляется в замороженном виде (в термосе со льдом).

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

## 6 ПОРЯДОК ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Диагностика герпесвирусной инфекции 6 типа осуществляется с дифференциацией на латентную и острую форму в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1.

## 7 ДЕТЕКЦИЯ МАРКЕРОВ ВИРУСА ГЕРПЕСА 6 ТИПА

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

### *7.1 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.

### *7.2 Постановка ПЦР*

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

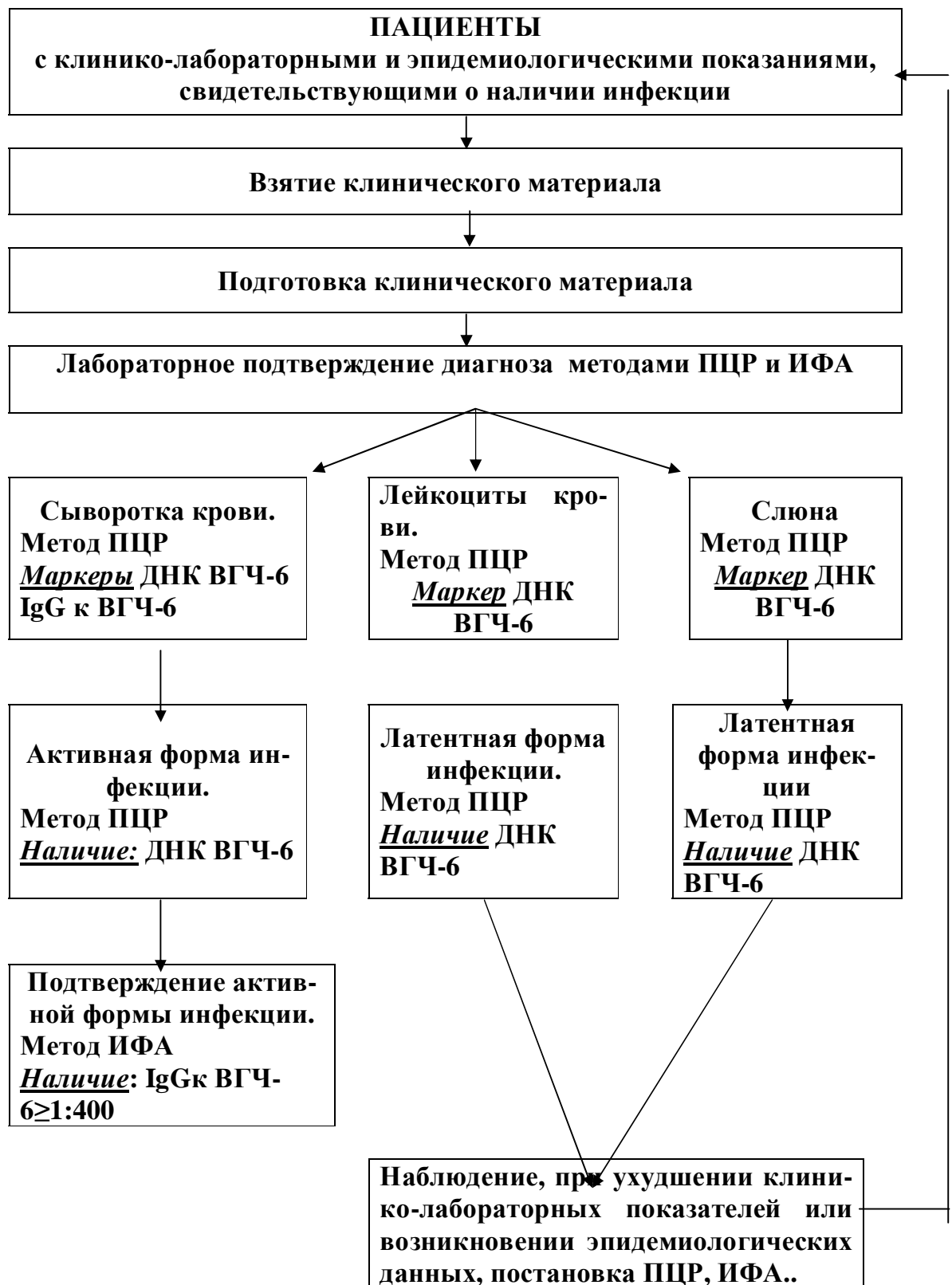


Рисунок 1 – Алгоритм дифференциальной диагностики герпесвирусной инфекции 6 типа

## *7.2 Постановка ИФА*

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

## 8 УСТАНОВЛЕНИЕ ДИАГНОЗА

### *8.1 Детекция маркеров ВГЧ-6*

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

### *8.2.Определение формы инфекции*

#### 8.2.1.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.

#### 8.2.2.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 (ПКО) - кривая флуоресценции должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) - должна отсутствовать, кривая типичной формы и не пересекает пороговую линию.

## 9 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.

## 10 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ

Противопоказания для проведения вирусологического обследования пациентов с использованием крови и слюны отсутствуют.