

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д. Л. Пиневиц
«04» 08 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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
04.06.2020
Регистрационный № 134-1119

**АЛГОРИТМ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С МИОКАРДИТАМИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т. В. Амвросьева, З. Ф. Богуш, канд. биол. наук.
Н. В. Поклонская, А. С. Аринович

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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Изделия медицинской техники:

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

ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;

термостат твердотельный;

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

микроцентрифуга (1000–14 000 об/мин);

миницентрифуга-вортекс;

центрифуга настольная лабораторная (1000–5000 об/мин);

анализатор иммуноферментный или мультискан;

система для автоматической промывки планшетов;

гомогенизатор;

холодильник (от 2 до 8 $^\circ\text{C}$) с морозильной камерой (от -16 до -20 $^\circ\text{C}$);

дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1–10; 2–20; 20–200, 100–1000 мкл).

Изделия медицинского назначения:

пробирки пластиковые стерильные типа «эппендорф» (1,5 мл);

микропробирки для ПЦР, соответствующие типу используемого термоциклера (0,1 и 0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз;

наконечники полимерные для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз;

набор реагентов для выделения рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислоты (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 (ЦМВ), вируса Эпштейна – Барр (ВЭБ), вирусов простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1, 2), варицелла-зостер вируса (ВЗВ), аденовирусов (АдВ), вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6), парвовируса В19 (ПВ В19);

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

тест-системы для выявления антител класса М методом иммуноферментного анализ (ИФА) к ЦМВ; ВЭБ; ЭВ; ВПГ 1, 2; 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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

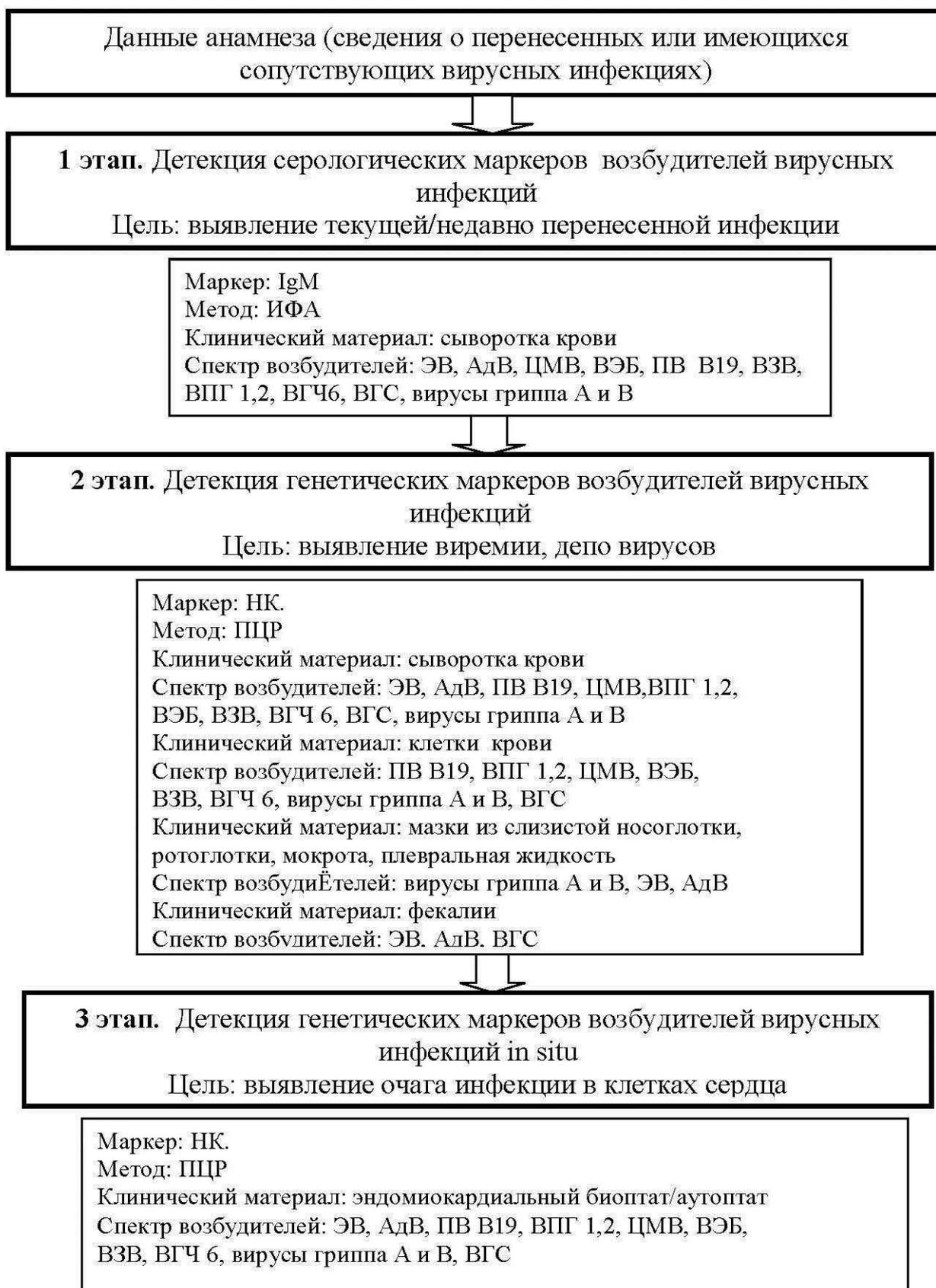
ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Алгоритм выявления маркеров вирусных инфекций у пациентов с миокардитами включает 3 этапа исследований (рисунок). Исследования осуществляются в отношении 12 наиболее распространенных возбудителей вирусных инфекций: ЦМВ; ВЭБ; ВЗВ; ВГЧ 6; ВПГ 1, 2; ЭВ; АдВ; ПВ В19; вирусов гриппа А и В; ВГС.

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

Этап I. 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 мес. указывает на наличие постоянного антигенного стимула и является показанием для этапа II обследования.

Этап II. 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; в клетках периферической крови, носоглоточных смывах и фекалиях указывает на наличие депо вирусов в организме пациента. Положительный результат этого этапа является показанием для следующего этапа III.

Этап II. 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 свидетельствуют о наличии у пациента с миокардитом вирусной инфекции сердца.

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 пробоподготовка проводятся 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 осуществляется при температуре 2–8 °С в течение 1 сут, при температуре -20 °С — длительно. Допускается только одноразовое замораживание/оттаивание материала.

Транспортировка биологических образцов осуществляется в термоконтейнерах с охлаждающими элементами в течение 1 сут.

Детекция серологических и генетических маркеров кардиотропных вирусов

Детекция серологических маркеров осуществляется 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.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные ошибки при постановке ПЦР

Молекулярно-генетическое исследование подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биологического материала, транспортировка, пробоподготовка и хранение; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов, а в дальнейшем 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.

Возможные ошибки при постановке ИФА

Причины ложноотрицательных результатов: нарушение технологии на этапах взятия биологического материала, транспортировки, пробоподготовки, хранения; приготовление 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.