

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
здравоохранения Республики Беларусь

Е.Л. Богдан

« 22 » 07 2021 г.

Регистрационный № 065-0621



МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ
ОСЛОЖНЕНИЙ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ И АЛГОРИТМ ЛЕЧЕНИЯ ЦМВ-
ИНФЕКЦИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ – РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»,
государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»,

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Доценко М.Л.; к.б.н. Фомина Е.Г.; к.б.н.,
доцент Григорьева Е.Е.; Гуцалюк И.Я., Зверко В.В., Пехтерева Л.А.,
д.м.н., профессор Доценко Э.А.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки вероятности тромбоэмболических осложнений (ТЭО) ЦМВ-инфекции у иммунокомпетентных лиц и тактика терапии этой группы пациентов.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей-вирусологов, врачей лабораторной диагностики, и иных врачей специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с цитомегаловирусной инфекцией в стационарных и (или) амбулаторных условиях и (или) в условиях отделений дневного пребывания.

Область применения: инфекционные болезни, неврология, хирургия, терапия.

1. Показания к применению

Острая ЦМВ-инфекция (В 25).

2. Противопоказания для применения

Отсутствуют.

3. Перечень необходимых медицинских изделий, медицинской техники, реагентов и расходных материалов

3.1 Перечень изделий медицинского назначения и медицинской техники

1. ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха.
2. Амплификатор (термоциклер).
3. Миницентрифуга-вортекс.
4. Прибор для горизонтального гель электрофореза.
5. Трансиллюминатор.
6. Проточный цитофлуориметр.
7. Центрифуга настольная лабораторная (1000 – 5000 об/мин).
8. Дозаторы пипеточные механические переменного объема,

комплект (1 – 10 мкл, 2 – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 100 – 1000 мкл).

9. Холодильник (от +2°C до +8°C) с морозильной камерой (-20°C).
10. Твёрдотельный термостат.
11. Счетная камера Горяева.
12. Покровные стекла (притирочные).

3.2 Перечень необходимых реагентов

1. Набор для выделения РНК/ДНК из клинического материала
2. ПЦР-буфер (10х).
3. 50мМ MgCl₂.
4. Смесь дНТФ (10 мМ).
5. Праймеры (10мМ) (таблица 1).
6. Таq-полимераза.
7. Деионизированная вода, свободная от нуклеаз.
8. Лизирующий раствор (10× раствор, 100 мл): 8,99 г хлорида аммония, 1,0 г гидрокарбоната калия, 37,0 мг натриевой соли этилендиаминтрихлоруксусной кислоты, mQ-воды до 100 мл.
9. Фосфатный буферный раствор, не содержащий ионов двухвалентных металлов.
10. Моноклональные антитела к антигенам человека, меченные флюорохромами (Lin-маркеры, HLA-DR, CD15, CD33, CD11b, CD3, CD62L, CD45RA, CD25, CD4).

3.3 Перечень расходных материалов

1. Перчатки медицинские.
2. Шапочки медицинские.
3. Халаты медицинские.
4. Маски медицинские.
5. Емкости с дезинфицирующим средством для отработанного материала.

6. Наконечники для дозаторов с фильтром.
7. ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера).
8. Пробирки типа Эппендорф.
9. Пробирки центрифужные (15 мл).
10. Вакутайнеры с ЭДТА.
11. Штативы для пробирок.
12. Пробирки для цитометра (5 мл).

4. Технология использования метода оценки вероятности тромбозмболических осложнений

4.1 Получение биологического материала

Материалом для исследования является периферическая кровь. Забор венозной крови в количестве 5–10 мл проводят утром натощак из локтевой вены в асептических условиях в пробирку с антикоагулянтом (раствором гепарина или этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА)).

4.2 Правила транспортировки и хранения материала

Вакутайнеры с кровью доставляют в лабораторию непосредственно в день получения биологического материала. Кровь хранят до проведения исследования не более 24 часов при температуре от +18 до +25°C.

4.3 Определение мутаций в генах фактора Лейдена, протромбина с использованием ПЦР

Метод определения мутаций основан на аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) полиморфных аллелей в позиции 1691G/A гена фактора V и позиции 20210G/A гена протромбина.

Выделение ДНК из клеток крови осуществляют с использованием коммерческого набора в соответствии с инструкцией по применению.

АС-ПЦР проводят с использованием следующих пар праймеров в концентрации 20рМ на реакцию:

№	Название праймера ^Д	Нуклеотидная последовательность (5'→3')
1	FVLC	5'-GGACTACTTGACAATTAAGTGTCTCTTG-3'
2	FVLN	5'-GCAGATCCCTGGACAGACG-3'
3	FVLM	5'-GCAGATCCCTGGACAGACA-3'
4	PTHBC	5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGCAG-3'
5	PTHBN	5'-GCACTGGGAGCATTGAGGATC-3'
6	PTHBM	5'-GCACTGGGAGCATTGAGGATT-3'

Каждый анализируемый образец ДНК вносится в две пробирки. Первая пробирка содержит общий праймер (С) и праймер, специфичный для нормального аллеля (N). Вторая пробирка содержит общий праймер (С) и праймер, специфичный для мутантного аллеля (М).

Реакционная смесь включает следующие компоненты:

№	Название компонента	Количество для одной пробы
1	ПЦР-буфер 10х	5 мкл
2	MgCl ₂ 50мМ	2 мкл
3	дНТФ 25мМ	0,4 мкл
4	Праймер С (20рМ)	2 мкл
5	Праймер N (20рМ)	2 мкл
6	Праймер М (20рМ)	2 мкл
7	Taq-полимераза 5 ед/мкл	0,25 мкл
8	ДНК	2,5 мкл
9	Вода	34 мкл
Объем смеси на 1 пробу		50 мкл

Проводят амплификацию при следующих условиях:

95°C – 3:00 мин – 1 цикл; 94°C – 0:30 мин, 56°C для FVL (фактор Лейден) и 60 °C для PTHB (протромбин) – 0:30 мин, 72°C – 0:30 мин – x35 циклов; 72°C – 7:00 мин – 1 цикл.

Анализ продуктов амплификации проводят в 2,0 % агарозном геле. Для визуализации анализируемой ДНК гель окрашивают раствором бромистого этидия с последующим просмотром в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. Размер анализируемых амплификатов составляет 150 п.н. для гена фактора Лейдена, 340 п.н. для гена протромбина.

Интерпретация результатов:

Праймеры	Наличие амплификата	Состояние аллеля
C+N	+	Гетерозигота
C+M	+	
C+N	+	Гомозигота по нормальному аллелю
C+M	-	
C+N	-	Гомозигота по мутантному аллелю
C+M	+	

4.4 Определение клинико-лабораторных показателей вероятности тромбоэмболических осложнений у иммунокомпетентных лиц с ЦМВ-инфекцией

1) анамнез, клинические симптомы:

– наличие тромбозов в анамнезе;

2) общий анализ крови:

– содержание тромбоцитов;

3) коагулограмма:

– уровень Д-димеров.

4.5 Определение содержания клеток крови, характеризующих степень активации и истощения иммунной системы при острой ЦМВ инфекции

- гранулоцитарные миелоидные супрессорные клетки (Г-МЛСК) ($Lin^-HLA-DR^-CD33^+CD11b^+CD15^+$);

- $CD3^+$ Т-клетки различных стадий дифференцировки: «наивные» Т-клетки (naïve), Т-клетки центральной (TCM) и эффекторной (TEM) памяти, терминально-дифференцированные лимфоциты (TEMRA);

- регуляторные Т-клетки ($CD4^+CD25^+CD127^-$),

- активированные Т-клетки ($CD3^+HLA-DR^+$) с использованием моноклональных антител, меченных флуорохромами.

Учет результатов проводят методом проточной цитометрии. Полученные показатели сравнивают с нормативными значениями, которые составляют: Г-МЛСК 0-0,5%; активированные Т-клетки 3,5-12,4%, регуляторные Т-клетки 1,6-5,8%; TEM+TEMRA 9-25%.

4.6. Интерпретация данных

Признаками вероятности возникновения тромбозомболических осложнений при острой ЦМВ-инфекции являются:

1. Гомозиготное состояние по мутантному аллелю гена фактора Лейдена;

2. Гомозиготное состояние по мутантному аллелю гена протромбина;

4. Уровень Д-димеров выше 250 нг/мл;

5. Содержание Г-МЛСК, превышающее показатель верхней границы нормы более чем в 8 раз;

6. Превышение количества активированных Т-клеток в 7,5 раз и более относительно верхней границы нормы;

7. Снижение количества регуляторных Т-клеток более чем в 3 раза относительно нижней границы нормы;

8. Суммарное содержание клеточных субпопуляций TEM и TEMRA выше 59%.

Отсутствие этих признаков свидетельствует о низкой вероятности развития ТЭО.

Наличие одного или более признаков, свидетельствует о высокой вероятности развития ТЭО.

5. Алгоритм лечения острой ЦМВ:

5.1 - ганцикловир 5мг\кг внутривенно 2 раза в день или валганцикловир в таблетках 900мг 2 раза в день не менее 2х недель, в последующем- 900мг 1 раз в день в течении 3х месяцев.

5.2 при высокой вероятности развития ТЭО различной локализации добавляются низкомолекулярные антикоагулянты:

Низкомолекулярные антикоагулянты (ривароксабан) – 10мг 1 раз в сутки в течение месяца (при уровне Д-димеров не превышающем верхнюю границу нормы), лечебная доза (20мг) при уровне Д-димеров в 2 и более раз выше верхней границы нормы до нормализации показателей коагулограммы, с последующем приемом в течение месяца 10мг 1 раз в сутки.

6. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении исследований и пути их устранения

При выполнении метода ПЦР возможны следующие осложнения и/или ошибки:

Описание осложнения и/или ошибки	Возможная причина	Описание пути устранения осложнения и/или ошибки
Присутствует фрагмент амплификации в отрицательных пробах	Контаминация проб	Соблюдение пространственного разделения рабочих зон; работа только в одноразовых перчатках и их смена при переходе из одной зоны в другую; использование отдельных комплектов