

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
**Ж**  
Д.Л. Пиневич  
2018 г.  
Регистрационный № 078-0618

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ И  
ТАКТИКА ЛЕЧЕНИЯ БЕТА-ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический  
центр эпидемиологии и микробиологии»

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский  
университет»

**АВТОРЫ:**

канд. биол. наук, доц. Орлова С.В., д-р мед. наук, проф. Карпов И.А.,  
Штыров А.А., канд. мед. наук, доц. Стома И.О., Рудько Г.Ф.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен алгоритм диагностики инфекции вызванной бета герпесвирусами человека 6 типа (ВГЧ-6), 7 типа (ВГЧ-7) и цитомегаловирусом (ЦМВ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую диагностику бета-герпесвирусных инфекций с дифференциацией на латентную и острую форму.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-инфекционистов, врачей-эпидемиологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей - специалистов организаций здравоохранения, оказывающих специализированную медицинскую помощь пациентам с вероятностью развития герпесвирусных инфекций.

## 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;
- микрочентрифуга 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. ПРОВЕДЕНИЕ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цель: выявление вируса и/или антител в организме.

**Методы исследований:** полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (РВ-ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА).

**Объект исследований:** сыворотка крови, клетки крови, ликвор, слюна.

**Выявляемые маркеры:** ДНК ВГЧ 6, ДНК ВГЧ 7, ДНК ЦМВ, антитела  $\Lambda$ М, IgG .

### 6.1. ПОРЯДОК ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Диагностика бета - герпесвирусных инфекций осуществляется с дифференциацией на латентную и острую форму в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1.

### 6.2. ДЕТЕКЦИЯ МАРКЕРОВ ВИРУСА ГЕРПЕСА 6 ТИПА ГЕРПЕСА 6 ТИПА, ЦМВ

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

### 6.3 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.

#### 6.4. Постановка РВ-ПЦР

Выявляемые маркеры: ДНК ВГЧ 6, ДНК ВГЧ 7, ДНК ЦМВ

Постановка РВ- ПЦР осуществляется с использованием диагностических наборов, зарегистрированных в установленном порядке. Наиболее эффективно использование наборов с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Анализ ПЦР-амплифицированной ДНК (учет результатов) При использовании наборов с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции учет результатов проводится с использованием специального оборудования в соответствии с инструкцией производителя

#### 6.5 Постановка ИФА

#### 6.6 Выявляемые маркеры: антитела IgM, IgG .

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

## 7 УСТАНОВЛЕНИЕ ДИАГНОЗА

### 7.1 Детекция маркеров

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

Наличие маркеров ВГЧ-7 инфекции при лабораторном подтверждении является основанием для постановки диагноза «герпесвирусная инфекция - 7 типа».

Наличие маркеров ВГЧ-5 инфекции (ЦМВ) при лабораторном подтверждении является основанием для постановки диагноза «цитомегаловирусная инфекция».

### 7.2. *Определение формы инфекции*

#### 7.2.1. Постановка диагноза активной формы

Диагноз активной формы проводят и/или ПЦР и ИФА, определяя ДНК и антитела к исследуемым возбудителям.

Наличие ДНК бета -герпесвирусов пациента, <sup>М</sup> антител в сыворотке крови являются маркерами ранней инфекции в активной форме Присутствие IgG атител в сыворотке крови в титре не ниже 1:200 свидетельствует об активной форме инфекции.

#### 7.2.2. Постановка диагноза латентной формы

Детекция ДНК бета -герпесвирусов, в лейкоцитах крови, и отсутствие <sup>М</sup> антител в сыворотке крови свидетельствует о латентно/персистентной форме инфекции. Положительный результат указывает на присутствие вируса в клетках крови в не реплицирующей форме. Обнаружение серологических маркеров - IgG атител свидетельствует о перенесенной вирусной инфекции, но не позволяет точно установить наличие инфекционного процесса в организме в момент обследования. При установлении латентно/персистентной формы инфекции необходимо проводить наблюдение. Ухудшение клинико-лабораторных показателей или возникновение эпидемиологических данных, является показанием для проведения ПЦР, ИФА

## 8 ТАКТИКА ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ПОДТВЕРЖДЕННОЙ АКТИВНОЙ ФОРМОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ.

Лечение назначают в соответствии с Клиническими протоколами диагностики и лечения взрослого населения с инфекционными и паразитарными болезнями (приложение 5 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 484 от 13.06.2006).

8.1. Этиотропная терапия инфекций, вызванных ВГЧ-6 типа

К настоящему моменту в мире отсутствует противовирусные лекарственные средства с избирательным эффектом на ВГЧ-6 типа, что является основной причиной системного применения противовирусных средств более широкого спектра, а именно: ганцикловира, валганцикловира, фоскарнета и цидофовира (Таблица 1).

Таблица 1. Современные лекарственные средства с активностью против ВГЧ-6 типа

Международное непатентованное название	Основное показание	<i>In vitro</i> активность против ВГЧ-6	Проникновение через ГЭБ	Потенциальная токсичность
(Вал)Ганцикловир	ЦМВ-инфекция	Умеренная	Да	Угнетение костного мозга
Цидофовир	ЦМВ-инфекция	Хорошая	Нет	Нефротоксичность
Фоскарнет	ЦМВ-инфекция	Высокая	Да	Нефротоксичность
Артезунат	Малярия	Высокая	Да	Лейкопения
Бринцидофовир	ЦМВ-инфекция	Высокая	Да	Риск кровотечения в ЖКТ

Этиотропная терапия показана пациентам с энцефалитами, вызванными ВГЧ-6 типа на фоне глубокой иммуносупрессии: при трансплантации органов и тканей; пациентам гематологического и онкологического профиля на фоне химиотерапевтического лечения. В случае остальных клинических форм инфекций решение принимается индивидуально.

Таблица 2. Режимы дозирования противовирусных ЛС с активностью против ВГЧ-6 типа (у пациентов с нормальной почечной функцией)

Международное непатентованное название	Применение	Дозирование	Продолжительность
Ганцикловир	Схема 1-ой линии терапии ВГЧ-6 инфекции	5 мг/кг через 12 часов в/в	Определяется индивидуально клинической и вирусологической динамикой
Фоскарнет	Схема 1-ой линии терапии ВГЧ-6 инфекции	90 мг/кг через 12 часов в/в	
Цидофовир	Альтернативная схема при высоком риске устойчивости	5 мг/кг медленно 1 раз в неделю в/в	

Ганцикловир показан как эффективная мера медикаментозной профилактики реактивации инфекций, вызванных ВГЧ-6 типа у пациентов при трансплантации почки.

Фоскарнет рекомендуется к использованию у пациентов с ВГЧ-6 энцефалитом на фоне анемии.

T-клеточная адаптивная терапия является перспективным методом этиотропной терапии инфекций, вызванных ВГЧ-6 типа.

## 8.2. Этиотропная терапия инфекций, вызванных ВГЧ-7 типа

Данные о клинической эффективности противовирусных лекарственных средств в отношении ВГЧ-7 типа на сегодняшний день крайне ограничены. Ганцикловир и фоскарнет являются двумя наиболее обоснованными терапевтическими опциями в случае инфекций, вызванных ВГЧ-7 типа.

Таблица 3. Режимы дозирования противовирусных ЛС с активностью против ВГЧ-7 типа (у пациентов с нормальной почечной функцией)

Международное непатентованное название	Применение	Дозирование	Продолжительность
Ганцикловир	Схема 1-ой линии терапии ВГЧ-7 инфекции	5 мг/кг через 12 часов в/в	Определяется индивидуально клинической и вирусологической динамикой
Фоскарнет	Схема 1-ой линии терапии ВГЧ-7 инфекции	90 мг/кг через 12 часов в/в	
Цидофовир	Альтернативная схема при высоком риске устойчивости	5 мг/кг медленно 1 раз в неделю в/в	

В комплексной терапии инфекций, вызванных ВГЧ-7 типа также может быть рекомендовано снижение дозы иммуносупрессивных лекарственных средств. В случае развития энцефалита, вызванного ВГЧ-7 типа, показана клиническая эффективность комбинации ганцикловира и метилпреднизолона.

Схема лечения энцефалита, вызванного ВГЧ-7 типа включает:

- ганцикловир в дозировке 200-400 мг 3 раза/сут в течение 7-8 сут;

глюкокортикостероиды при наличии осложнений (тромбоцитопения, гранулоцитопения, поражение ЦНС, обструкция верхних дыхательных путей): преднизолон 60-80 мг/сут с последующей отменой в течение 4-6 сут.

## 8.3. Этиотропная терапия цитомегаловирусной инфекции

8.3.1 В случае первичной инфекции или реактивации цитомегаловируса средством выбора является ганцикловир (5 мг/кг в/в каждые 12 часов) или валганцикловир (900 мг внутрь каждые 12 часов) у пациентов с нормальной почечной функцией, режимы дозирования у пациентов с нарушенной почечной функцией приведены в Таблице 2.

8.3.2 Валганцикловир рекомендуется пациентам, имеющим приверженность к терапии, а также в состоянии усваивать пероральные лекарственные формы. Ганцикловир внутривенно предпочтителен в случае тяжелой или жизнеугрожающей цитомегаловирусной инфекции.

8.3.3 Ацикловир, валацикловир не рекомендуются к применению в случае подтвержденной ЦМВ-инфекции по причине их малой эффективности в отношении данного вируса.

8.3.4 Сопутствующая пассивная неспецифическая иммунотерапия рутинно не рекомендуется.

8.3.5 При невозможности применения (вал)ганцикловира, противовирусным средством второго ряда является фоскарнет.

8.3.6. После адекватного клинического ответа на внутривенный ганцикловир, пациент может быть переведён на валганцикловир при условии усвоения пероральных лекарственных форм и приверженности терапии.

8.3.7. связи с индивидуальными особенностями вирусологического ответа при терапии ЦМВ-инфекции, у пациентов с положительным клиническим ответом и отсутствием снижения ДНК ЦМВ в крови замена противовирусной не рекомендуется в течение первых недель лечения.

8.3.8. Возможность развития резистентности ЦМВ к противовирусной терапии следует учитывать у пациентов с предшествующим суммарным использованием (вал)ганцикловира более 6 недель и отсутствием клинического ответа на фоне 2 недель адекватного лечения или при развитии ЦМВ-виремии на фоне применяемой противовирусной профилактики.

8.3.9. Этиотропную противовирусную терапию ЦМВ-инфекции рекомендуется проводить не менее 2 недель, до клинического выздоровления и снижения ДНК ЦМВ в крови менее нижнего предела определения (<200 МЕ/мл) в одном/двух последовательных исследованиях.

Таблица 4. Режимы дозирования основных противовирусных лекарственных средств для лечения ЦМВ-инфекции у пациентов с нарушенной почечной функцией

СКФ, мл/мин	Терапевтическая доза	Поддерживающая/профилактическая доза
<b>Ганцикловир в/в</b>		
>70	5 мг/кг через 12 часов	5 мг/кг через 24 часа
50-69	2,5 мг/кг через 12 часов	2,5 мг/кг через 24 часа
25-49	2,5 мг/кг через 24 часа	1,25 мг/кг через 24 часа
10-24	1,25 мг/кг через 24 часа	0,625 мг/кг через 24 часа
<10	1,25 мг/кг 3 раза в неделю после гемодиализа	0,625 мг/кг 3 раза в неделю после гемодиализа
<b>Валганцикловир внутрь</b>		
>60	900 мг через 12 часов	900 мг один раз в сутки
40-59	450 мг через 12 часов	450 мг один раз в сутки
25-39	450 мг один раз в сутки	450 мг один раз за 48 часов
10-24	450 мг один раз за 48 часов	450 мг два раза в неделю
<10*	200 мг 3 раза в неделю после гемодиализа	100 мг 3 раза в неделю после гемодиализа

\*в данном случае показан раствор для орального введения в связи с невозможностью деления

## 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 ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Противопоказания, соответствующие таковым для назначения лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции:

1. Беременность, лактация.
2. Повышенная чувствительность к данному лекарственному средству в анамнезе.
3. Не следует назначать ганцикловир одновременно с другими препаратами, вызывающими нейтропению.

#### 11. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ

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