



КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции

Тип клинических рекомендаций:

Правила проведения клинических лабораторных исследований

Москва – 2016

РАЗРАБОТЧИКИ:

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»
Роспотребнадзора, Москва

С.Б. Яцышина, М.Г. Творогова, Г.А. Шипулин, В.В. Малеев.

Ответственный разработчик: Ассоциация специалистов и организаций
лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины»

РЕЦЕНЗЕНТЫ

Захарова Юлия Александровна - заведующая клинико-диагностической лабораторией, Пермского клинического центра ФМБА России, доктор медицинских наук, г. Пермь.

Девяткин Андрей Викторович - Главный внештатный специалист по инфекционным болезням, главный врач ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, г. Москва.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящие клинические рекомендации устанавливают единые требования к выполнению лабораторной диагностики гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции для медицинских организаций Российской Федерации, имеющих лицензию по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика», «Вирусология», «Бактериология», «Инфекционные болезни», «Педиатрия», «Пульмонология».

Рекомендации одобрены на II Российском конгрессе лабораторной медицины в городе Москве 14 октября 2016 года.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТ	Антитела
БАЛ	Бронхо-альвеолярный лаваж
ВКО	Внутренний контрольный образец
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	Комплементарная ДНК
К-	Отрицательный контроль
К+	Положительный контроль
МАНК	Методы амплификации нуклеиновых кислот
МР	Методические рекомендации
МУ	Методические указания
МУК	Методические указания
НК	Нуклеиновая кислота
ОКО	Отрицательный контрольный образец
ОРВИ	Острая респираторная вирусная инфекция
ОРЗ	Острое респираторное заболевание
ОТ	Обратная транскрипция
ПК	Положительный контроль
ПКО	Положительный контрольный образец
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-КТ	ПЦР с детекцией в формате «по конечной точке»
ПЦР-РВ	ПЦР с детекцией в формате «реального времени»
РНК	Рибонуклеиновая кислота
СанПиН	Санитарные правила и нормы
ТОРС	Тяжелый острый респираторный синдром
УФ	Ультрафиолетовое излучение
FEП	Fluorescence End Point
FRT	Fluorescence Real Time
hAdv	Human Adenovirus
hBov	Human Bocavirus
hCov	Human Coronavirus
hPiv	Human Parainfluenza virus
hRSv	Human Respiratory Syncytial virus
hRv	Human Rhinovirus
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
MMIv	Название фермента для обратной транскрипции
Mpv	Metapneumovirus
RT	Reverse Transcription
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome

УРОВЕНЬ ДОКАЗАТЕЛЬНОСТИ РЕКОМЕНДАЦИЙ

Доказательной базой для рекомендаций явились публикации, вошедшие в базы данных Cochrane library, PubMed, EMBASE и MEDLINE, электронную библиотеку (www.e-library.ru). Глубина поиска составила 16 лет.

Клинические рекомендации созданы на основе согласованного мнения членов ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины», а также обобщения опыта авторов, специалистов обществ пульмонологов России (Российское Респираторное Общество) и стран Европы (Европейское Респираторное Общество) и апробированных рекомендаций, действующих в настоящее время в Великобритании [Harris M; Lim WS] США [Bartlett JG; Mandell LA], Швеции [Regamey N].

Оценка уровня доказательности и значимости рекомендаций производилась в соответствии с данными, изложенными ниже.

Оценка уровня доказательности

Уровень рекомендаций	Определение	Применение
A	Убедительные доказательства эффективности и существенной клинической пользы	Настоятельно рекомендуется
B	Сильные или умеренные доказательства эффективности, ограниченные клинические преимущества	Как правило, рекомендуется
C	Недостаточные доказательства эффективности или эффективность незначима по сравнению с возможными неблагоприятными последствиями	Необязательно к исполнению
D	Умеренные доказательства эффективности или эффективность незначима по сравнению с возможными неблагоприятными последствиями	Как правило, не рекомендуется

Качество доказательности рекомендации

I	Данные рандомизированных контролируемых клинических исследований или строго разработанных экспериментальных лабораторных исследований, выполненных независимыми исследователями
II	Данные хорошо спланированных клинических исследований без рандомизации, когортных исследований или исследований случай-контроль, аналитических исследований (предпочтительно более чем одного исследования), убедительные доказательства лабораторных экспериментов
III	Мнения авторитетных специалистов, основанные на данных клинических или лабораторных исследований, описательных исследованиях или отчетах экспертов

Уровни доказательности рекомендаций приводятся при изложении текста ниже.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

В методических рекомендациях представлены современные сведения о возбудителях ОРВИ, включая эпидемиологические данные о новых видах вирусов, описанных в последнее десятилетие. Представлен общий методический подход и подробный порядок проведения лабораторного исследования методом ПЦР с целью обнаружения НК гриппа и других значимых возбудителей ОРВИ. Особое внимание уделено описанию перечня биологического материала и правил его получения, упаковки, транспортирования и хранения биологического материала от больных (умерших).

Клинические рекомендации предназначены для специалистов лабораторий, выполняющих работы с использованием методов амплификации НК при исследовании материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I-IV групп патогенности (опасности), аккредитованных в установленном порядке и имеющих лицензии на данный вид деятельности в соответствии с законодательством Российской Федерации.

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
2. СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)».
3. СП 1.2.036-95 «Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».
4. СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
5. Национальный Стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности. ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003)
6. Национальный Стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности. ГОСТ Р (ИСО 15189-2009)
7. СП 3.1.12.3117-13 «Профилактика гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций».
8. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».
9. МУ 3.1.2.3047-13 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями».
10. МУК 4.2.3115 -13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний».
11. МУ 1.3.1877-04 «Порядок сбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторного анализа биологического материала от больных (и умерших) пациентов с подозрением на тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)».
12. МУ 3.4.3008-12 «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, "новых" и "возвращающихся" инфекционных болезней».
13. Приказ 19 апреля 1995 г. N 101/46 «О защите населения от гриппа и других острых респираторных заболеваний» (в ред. Приказа Минздрава РФ от 27.01.1998 N 25) с Приложением N 4 к Методическим указаниям по лабораторным методам диагностики гриппа и других ОРЗ.
14. МР «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация». Утвержденные Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г.Онищенко 18 апреля 2006 г. N 0100/4430-06-34.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	10
2. КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ИНФЕКЦИЙ.....	15
2.1. Профили клинико-статистических групп заболеваний.....	15
2.2. Клинические шифры, согласно МКБ-10.....	15
3. ТРЕБОВАНИЯ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
3.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу.....	16
3.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала.....	17
3.3. Требование к материально-техническому обеспечению выполнения исследований.....	19
4. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	20
4.1. Перечень биологического материала для исследования.....	20
4.2. Методика получения и условия хранения биологического материала...21	
4.2.1. Особенности сбора проб у разных категорий пациентов.....	21
4.2.2. Сбор биологического материала для ПЦР с целью последующей изоляция культуры вируса.....	24
4.3. Маркировка материала для лабораторного исследования.....	26
4.4. Транспортирование биологического материала для проведения ПЦР- исследования.....	26
4.5. Оценка приемлемости образцов.....	27
5. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ВЕРХНИХ И НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ.....	27
5.1. Сравнение методов лабораторной диагностики.....	28
5.2. Показания к применению метода полимеразной цепной реакции для этиологической диагностики гриппа и ОРВИ.....	31
5.3. Принцип метода ПЦР.....	32
5.4. Этапы проведения ПЦР.....	34
6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	37
6.1. Внутрилабораторный контроль качества.....	37
6.2. Внешний контроль качества.....	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	39
Приложение 1. Организация лабораторных помещений.....	43
Приложение 2. Материально-техническое оснащение.....	43
Приложение 3. Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала.....	46
Приложение 4. Предварительная обработка и подготовка биологического материала.....	47

Приложение 5. Методики экстракции НК из исследуемых образцов.....	48
Приложение 6. Методика проведения реакции обратной транскрипции.....	51
Приложение 7. Методики проведения ПЦР с различными форматами детекции фрагментов амплификации.....	52
Приложение 8. Порядок проведения контроля загрязнения лаборатории продуктами амплификации.....	60
Приложение 9. Формы критериев оценки качества медицинской помощи по группам заболеваний или состояний.....	61

1. ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость острыми инфекциями верхних дыхательных путей (ОРВИ) множественной или неуточненной локализации и гриппом в России по данным официальной статистики (форма 1) в совокупности составляет 19-20 тыс. на 100 тыс. населения ежегодно, превышая в десятки раз аналогичные показатели для других инфекционных болезней, и составляет 90% всех регистрируемых случаев инфекционных и паразитарных болезней. Дети дошкольного возраста подвержены острым респираторным заболеваниям (ОРЗ), в среднем, 4-8 раз в год, школьники от 2 до 6 раз в год, взрослые 2-3 раза в год. В контингентах часто болеющих детей эпизоды ОРЗ регистрируются от 10 до 12 раз в год.

В 90% случаев ОРЗ вызывают возбудители ОРВИ, причиной которых могут являться представители 4-х семейств вирусов, геном которых представлен молекулой РНК (ортомиксовирусы, парамиксовирусы, коронавирусы и пикорнавирусы) и 2-х семейств вирусов, геном которых представлен молекулой ДНК (аденовирусы, парвовирусы). Ведущее место среди острых инфекций дыхательных путей занимает грипп, возбудитель которого периодически вызывает пандемии, последняя из которых наблюдалась в 2009-2010 гг. Эпидемии гриппа охватывают от 5 до 20% населения, приводят к госпитализации порядка 3 млн. человек и вызывают до 250-500 тыс. летальных исходов в мире ежегодно [CDC. MMWR, 2010]. У взрослых больных гриппом в 10-15% случаев развиваются осложнения, причем 80% из них приходится на пневмонию. При развитии пневмонии у детей вирусы гриппа обнаруживают в 7-22% случаев. Возбудители гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, в котором выделяют три рода - *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* и *Influenzavirus C*, каждый из которых имеет по одному виду - *Influenza A virus*, *Influenza B virus* и *Influenza C virus*.

Вирусы гриппа А (*Influenzavirus A*), широко распространены в природе, их выделяют от большинства зверей и птиц, и по этой причине, они имеют высокий пандемический потенциал, так как способны преодолевать межвидовые барьеры. Способность вирусов гриппа А к быстрому накоплению мутаций, изменяющих их антигенные свойства, лежит в основе их высокого эпидемического потенциала. Вирусы гриппа А в настоящее время дифференцируют (типировать) с помощью генетических методов на подтипы (или субтипы) в соответствии с генетической структурой генов гемагглютинина (НА) на 16 субтипов и нейраминидазы (НА) на 9 субтипов. В 2013 г. при скрининге у летучих мышей в Центральной Америке и Перу 2013 г. были обнаружены новые субтипы

вирусов гриппа, обозначенные как H17N10 и H18N11. Значительную обеспокоенность вызывает циркуляция в природе патогенных для человека вирусов гриппа птиц. Регистрируются крупные эпизоотии, вызванные вирусами гриппа субтипов H7 и H9, сопровождаемые заболеванием людей (Гонконг – H9N2, 1998-1999 гг., Нидерланды-H7N7, 2003 г.), в ряде случаев с летальным исходом. С 2005 г. эпизоотии гриппа H5N1, повлекли за собой заболевания людей в десятке стран мира с летальностью 60%. В июне 2013 г. ВОЗ сообщила о 132 лабораторно подтвержденных случаях инфекции, вызванной вирусом гриппа A/H7N9, включая 37 случаев, закончившихся летально. Таким образом, на настоящее время актуален мониторинг вирусов гриппа, имеющих в геноме сегмент, кодирующий HA субтипов H5, H7 и H9.

Вирусы гриппа В до сих пор выделяли только от людей. Наряду с гриппом А, они занимают значительную долю в структуре летальности при гриппе у детей. Так, в США в сезоне 2010-2011 гг. вирус гриппа В стал причиной 38% случаев смерти детей, заняв в структуре циркулирующих вирусов гриппа 26% [CDC. MMWR., 2011].

У людей вирусы гриппа С вызывают спорадические ОРЗ. Среди животных вирусы гриппа С выделяют от свиней, при экспериментальном заражении заболеванию подвержены собаки. Вирусы гриппа А, В и С дифференцируют друг от друга с помощью иммунологических и МАНК.

Помимо гриппа, причиной ОРЗ являются парамиксовирусы: респираторно-синцитиальный вирус (*Human Respiratory syncytial virus*), метапневмовирус человека (*Human Metapneumovirus*), 4 вида (1-4) вирусов парагриппа (*Human Parainfluenza virus 1-4*), коронавирусы (*Human Coronavirus 229E*, *Human Coronavirus OC43*, *Human Coronavirus NL63*, *Human Coronavirus HKU1*), риновирусы (*Rhinovirus*) виды А, В, С, относящиеся к пикорнавирусам, аденовирусы (*Human mastadenovirus*) виды В, С, Е, бокавирус человека (*Human bocavirus*), относящийся к парвовирусам. Все вышеперечисленные вирусы вызывают ОРЗ среди всех возрастных групп, за исключением бокавируса человека, инфицирующего только детей. У лиц со сниженной активностью иммунной системы, причиной ОРЗ могут быть также энтеровирусы, вирусы герпеса, цитомегаловирус. Дифференциальная диагностика гриппа и других ОРВИ возможна только с помощью лабораторных методов исследования.

Респираторно-синцитиальный вирус (hRSv, РС-вирус) является основным возбудителем бронхолитов и пневмоний у младенцев и детей младшего возраста во всем мире [Nair H; Stockman LJ]. Частота hRSv у больных внебольничной пневмонии детей колеблется от 15,7% до 31,8% в зависимости от региона эпидемического сезона и возраста и максимальна у

госпитализированных детей первого года жизни [Rohde GGU; Harris M]. В группу риска тяжелого течения РС-инфекции входят недоношенные младенцы, дети до 2-х лет, дети и взрослые с ослабленной вследствие заболеваний или лечения иммунной системой, пожилые люди (старше 65 лет). В годы эпидемической активности hRSv составляет 44% в этиологической структуре острых бронхитов у госпитализированных детей [Яцышина С.Б., 2008].

Клинико-эпидемиологические исследования инфекции, вызванной метапневмовирусом (hMPv), впервые обнаруженным в 2001 г., демонстрируют сходство клинической картины с RSv-инфекцией. Исследования специфических антител к вирусу в разных популяциях свидетельствуют о широкой распространенности hMPv, практически все дети имеют такие АТ к 5 годам жизни. MPv-инфекция составляет от 5 до 25% случаев госпитализаций с острой инфекцией нижних дыхательных путей детей младшего возраста [Edwards KM]. Основными диагнозами hMPv-инфекции у детей являются бронхиолиты, пневмония и бронхиальная астма. У детей при пневмонии метапневмовирус обнаруживают в 8-14,5% случаев [Williams JV, 2010; Rohde GGU]. hMPv, как и hRSv, могут служить причиной групповых заболеваний в домах малютки и домах престарелых, вызывая заболевания нижних дыхательных путей (до 79%) и приводя к летальным исходам (до 11%) [CDC. MMWR. 2013].

Вирусы парагриппа (hPiv) разделяют на 4 вида, относящиеся к двум родам: респировирусы (парагрипп 1 и 3) и рубулавirusы (парагрипп 2 и 4). Вирусы парагриппа часто обнаруживаются у детей младшего возраста. Ко второму году жизни каждый ребенок хотя бы один раз переболевает ОРЗ, вызванным вирусами парагриппа. hPiv 2 и 4 чаще обнаруживают у детей первого года жизни по сравнению с другими возрастными группами, где преобладают вирусы парагриппа 1 и 3. Доля hPiv в этиологической структуре ОРЗ составляет от 9 до 30%. При этом, в этиологической структуре круп у детей первых лет жизни вирусы парагриппа 1 – 4 занимают до 20%. Среди детей с заболеваниями нижних дыхательных путей, госпитализированных в стационары, инфицированные hPiv, составляют около 22% [Weinberg GA]. Все это ставит вирусы парагриппа на второе место среди возбудителей ОРВИ по частоте госпитализации и тяжести заболевания после респираторно-синцитиального вируса.

Среди аденовирусов (hAdv) выделяют 7 видов: А, В, С, D, Е, F, G. В зависимости от вида, аденовирусы вызывают различные инфекционные заболевания: конъюнктивиты и кератоконъюнктивиты (А, D), острые диарейные заболевания (F), гастроэнтериты (G), крупы, гриппоподобные

заболевания, бронхиты и пневмонии – В, С, Е. Известны случаи бессимптомного носительства hAdv в лимфоидной ткани верхних дыхательных путей на протяжении нескольких месяцев и лет, которые могут быть источником возбудителя. Будучи относительно устойчивыми к химическим и физическим воздействиям, hAdv могут длительное время сохранять стабильность в окружающей среде, и по этой причине, часто вызывают вспышки в детских дошкольных учреждениях, домах ребенка, домах престарелых, и прежде всего, в воинских частях, где частота выявления hAdv достоверно превышает таковую у взрослых штатских и детей [Львов Н.И.]. При этом заболевание может протекать со случаями пневмонии тяжелого течения, и даже заканчиваться летальным исходом [Яцышина С.Б., 2014].

Коронавирусы (hCov) представляют собой большую разнообразную группу вирусов, которая классифицируется как альфа, бета и гамма коронавирусы. Различные виды коронавирусов широко распространены в природе, вызывая различную инфекционную патологию у животных: гастроэнтериты и респираторные инфекции у свиней, инфекционный бронхит кур, энтериты у собак, инфекционный перитонит у кошек. Как показали исследования последних двух лет, летучие мыши инфицированы разнообразными альфа- и бета-коронавирусами. У человека острую респираторную инфекцию вызывают 4 вида коронавирусов: 229E, OC43, NL63, HKU1, чаще протекающую с поражением верхних дыхательных путей легкой или средней тяжести [Bradburne AF], и в редких случаях – с инфекциями нижних дыхательных путей [Woo PC]. Коронавирусы обнаруживаются преимущественно у детей младшего возраста с симптоматикой крупа и ларингита [van der Noek L]. У детей старшего возраста и у взрослых при коронавирусной инфекции может отмечаться гриппо-подобная симптоматика, а также кашель и ринорея.

В настоящее время семейство коронавирусов включает 2 вида вирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию у людей: *SARS-Cov* (Severe acute respiratory syndrome coronavirus, или ТОРС-коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром) и *MERS-Cov* (Middle East respiratory syndrome coronavirus, или БВРС-коронавирус, вызывающий Ближневосточный респираторный синдром). Коронавирус ТОРС вызвал эпидемию в 2003 году в 33 странах мира (наибольшее количество заболевших было зарегистрировано в Китае, Сингапуре и Канаде), с общим числом заболевших 7761 человек, у 623 из них заболевание закончилось летальным исходом [Memish ZA]. Вирус *SARS-Cov* легко передается от человека к человеку. С сентября 2012 г. на Ближнем

Востоке регистрируются случаи новой инфекции, вызванные коронавирусом *MERS-Cov*, летальность по данным ВОЗ составляет порядка 43%. Предполагают, что инфицирование людей происходит при контакте с верблюдами или с контаминированными вирусом объектами окружающей среды в домашнем хозяйстве или при посещении животноводческих ферм. Подтверждена возможность передачи *MERS-Cov* от человека к человеку при близком и длительном контакте, что может провоцировать вспышки внутрибольничной инфекции в человеческой популяции [Assiri AD]. Природным резервуаром обоих вирусов являются летучие мыши.

Самым распространенным возбудителем ОРВИ среди взрослого населения и детей всех возрастных групп являются риновирусы (hRv), вызывающие воспаление слизистой верхних дыхательных путей с ринореей и кашлем; в качестве осложнения нередко развивается трахеит. Среди Rv в настоящее время выделяют 3 вида вирусов: А, В, С. Принимая во внимание тот факт, что риновирусы достаточно часто обнаруживают у детей при пневмонии [Kieninger E; Яцышина С.Б., 2016], и экспериментально доказана возможность репликации риновирусов в ткани легких млекопитающих [Schroth MK], нельзя недооценивать данный возбудитель как причину поражения нижних дыхательных путей у детей.

Бокавирус (hBoV), впервые описанный в 2005 г., обнаруживается со среднегодовой частотой 1,5-19% как единственный возбудитель острой инфекции дыхательных путей у детей до 5 лет [Кондратьева Т.Ю.], вызывая лихорадку, кашель, риниты и диарею [Вартанян Р.В.]. Помимо этого, бокавирус часто обнаруживается в сочетании с другими возбудителями ОРЗ. При пневмонии у детей бокавирусы обнаруживаются в 4-15% случаев [Honkinen M; Esposito S; Яцышина С.Б., 2016]. У взрослых, находящихся в тесном контакте с больными детьми, бокавирус может вызывать легкие симптомы ОРЗ [Кондратьева Т.Ю.], в редких случаях вирус обнаруживается при пневмонии на фоне иммунодефицита.

Наиболее тяжело протекают острые инфекции дыхательных путей, вызванные респираторно-синцитиальным вирусом, метапневмовирусом, вирусами парагриппа и коронавирусами, у детей в возрасте до 5 лет, пожилых и у лиц с иммунодефицитом.

Современные данные свидетельствуют, что случаи инфекций нижних дыхательных путей вирусной этиологии не следует рассматривать как единичные или очень редкие. Вирусные возбудители инфекций дыхательных путей обнаруживаются у 10% пациентов ВП, нуждающихся в интенсивной терапии [Harris M].

Внедрение в клиники методов ранней этиологической лабораторной диагностики вирусных инфекций позволит клиницистам своевременно применять средства специфической противовирусной терапии, разрабатывать эффективную тактику ведения пациентов с инфекцией определенной этиологии, и тем самым, предотвращать осложнения и летальные исходы.

2. КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ИНФЕКЦИЙ

2.1. Профили клинико-статистических групп заболеваний

Инфекционные болезни

- Острые респираторные инфекции верхних дыхательных путей
- Острые респираторные инфекции нижних дыхательных путей

Пульмонология

- Пневмония
- Плевральный выпот

Пульмонология + Инфекционные болезни

- Грипп с пневмонией

Терапия + Пульмонология

- Инфекция нижних дыхательных путей

2.2. Клинические шифры, согласно МКБ-10

- J00 Острый назофарингит (насморк)
- J01 Острый синусит
- J02 Острый фарингит
 - о J02.8 Острый фарингит, вызванный другими уточненными возбудителями
 - о J02.9 Острый фарингит неуточненный
- J03 Острый тонзиллит
 - о J03.8 Острый тонзиллит, вызванный другими уточненными возбудителями
 - о J03.9 Острый тонзиллит неуточненный
- J04 Острый ларингит и трахеит
 - о J04.0 Острый ларингит
 - о J04.1 Острый трахеит
 - о J04.2 Острый ларинготрахеит
- J05 Острый обструктивный ларингит [круп] и эпиглоттит
 - о J05.0 Острый обструктивный ларингит [круп]
- J06 Острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации

- о J06.0 Острый ларингофарингит
- о J06.8 Другие острые инфекции верхних дыхательных путей множественной локализации
- о J06.9 Острая инфекция верхних дыхательных путей неуточненная
 - J10-J18 Грипп и пневмония
 - J20-J22 Другие острые респираторные инфекции нижних дыхательных путей
 - о J20 Острый бронхит
 - о J21 Острый бронхиолит
 - о J22 Острая респираторная инфекция нижних дыхательных путей неуточненная
- J40 Бронхит, не уточненный как острый или хронический
- J90 Плевральный выпот, не классифицированный в других рубриках

3. ТРЕБОВАНИЯ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу

Исследование имеют право проводить специалисты с высшим образованием - врачи клинической лабораторной диагностики, врачи-бактериологи, врачи-вирусологи и биологи, прошедшие первичную специализацию по клинической лабораторной диагностике и периодическое повышение квалификации в установленном порядке. Врачи и биологи должны иметь удостоверение о краткосрочном повышении квалификации «ПЦР-диагностика инфекционных заболеваний» на лицензированных курсах. Требования к знаниям и умениям специалистов должны соответствовать образовательным стандартам и другим нормативным документам, действующим на территории РФ. Врачи клинической лабораторной диагностики, врачи-бактериологи, врачи-вирусологи и биологи осуществляют контроль всего технологического процесса и непосредственно выполняют этапы молекулярно-биологического исследования по выявлению НК вирусов – возбудителей гриппа и ОРВИ, требующие высокой квалификации и специальной подготовки, принимают решение о необходимости дополнительных исследований (повторное проведение исследования и т.п.). Врачи клинической лабораторной диагностики консультируют врачей-инфекционистов и помогают в интерпретации результатов исследований.

Врачи клинической лабораторной диагностики (врачи-бактериологи, биологи) должны знать:

- все этапы подготовительной работы и проведения молекулярно-биологического исследования: правила взятия биологического материала, правила техники безопасности при работе с потенциально инфицированным биологическим материалом, требования к доставке и хранению материала, методики проведения исследования, критерии оценки результатов исследования.

Должны уметь:

- провести молекулярно-биологическое исследование, обработать результаты.

Подготовительную работу (прием поступающих в лабораторию образцов и сопроводительных документов, регистрацию полученного биологического материала, проведение технических манипуляций, не требующих высокой квалификации: подготовка помещений, ламинарных боксов, расходных материалов, утилизация использованных расходных материалов и остатков использованных биологических образцов) выполняет специалист со средним медицинским образованием и соответствующей квалификацией (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант, лаборант), имеющий сертификат специалиста и прошедший периодическое повышение квалификации в установленном порядке.

3.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала

ПЦР-исследование выполняется в организациях, имеющих лицензию на осуществление медицинской деятельности, в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения данных работ, выданное в установленном порядке.

Исследование материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы с помощью МАНК, связано с необходимостью одновременного обеспечения и соблюдения персоналом правил биологической безопасности и требований к медицинской организации при проведении данных работ с целью предотвращения контаминации НК и/или ампликонами исследуемых проб, помещений, оборудования. Лица, отвечающие за сбор, доставку и анализ образцов биологического материала, должны руководствоваться правилами и техникой безопасности при работе с ними. Все образцы биологического

материала считают потенциально опасными, т.к. могут содержать патогенные микроорганизмы.

Противоэпидемический режим в лаборатории, выполняющей ПЦР-исследование, должен быть обеспечен в соответствии с СП 1.3.2322-08, регламентирующими работу с микроорганизмами III-IV групп патогенности.

Персонал, непосредственно участвующий в проведении ПЦР-исследования, обязан соблюдать общие правила работы в молекулярно-биологических лабораториях (МУ 1.3.2569-09, СП.1.3.2322-08)), строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в медицинских лабораториях при манипуляциях с пробами пациентов, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей (ГОСТ Р 52905-2007).

Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к электрическим приборам, используемым в технологии (амплификаторы, центрифуги, термостаты и др.); персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

Для предупреждения пожаров необходимо соблюдать правила пожарной безопасности в соответствии с действующими нормативными документами.

Сбор, временное хранение, обеззараживание и транспортировка потенциально опасных отходов, загрязненных остатками биологического материала, образующихся в процессе выполнения технологии, должна проводиться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами (СанПиН 2.1.7.2790-10). Отходы, содержащие (потенциально содержащие) микроорганизмы (материалы и инструменты, предметы загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями) относятся к отходам класса Б, подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность. Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (не прокалываемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Реагенты, используемые для проведения экстракции нуклеиновых кислот и ПЦР, относятся к отходам класса Г. Отходы класса Г собираются в мягкую

(пакеты) или твердую (не прокалываемую) упаковку (контейнеры) любого цвета, кроме красного и желтого. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Вывоз и обезвреживание отходов класса Г должно производиться аккредитованной организацией.

Необходимо предусмотреть для обеззараживания исследуемого материала наличие автоклавной комнаты, которая может быть общей с другими подразделениями учреждения при условии соблюдения требований биологической безопасности. Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с требованиями СП 2.1.7.2790-10 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

3.3. Требование к материально-техническому обеспечению выполнения исследований

Организация помещений, требования к оборудованию и правила работы в лаборатории, выполняющей исследование с помощью МАНК, должны соответствовать методическим указаниям МУ 1.3.2569-09. Согласно методическим указаниям, лаборатория, в соответствии с этапами проведения анализа должна включать следующий набор последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений: 1) зону приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала; 2) зону выделения нуклеиновых кислот; 3) зону проведения реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции.

Работа лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, должна быть организована согласно СП 1.3.1285-03 и (или) СП 1.3.2322-08, МУ 1.3. 2569 -09. В лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III-IV группы патогенности, допускается исследование биологического материала, подозрительного на инфицирование микроорганизмами II группы патогенности только в тех случаях, для которых разработаны и утверждены нормативные документы, регламентирующие порядок проведения таких исследований в условиях данной лаборатории.

Для выполнения исследований используют стандартные оборудование, диагностические наборы реагентов, реагенты и расходные материалы, имеющие соответствующие сертификаты качества и

действующий срок годности, разрешенные к применению на территории РФ в установленном порядке.

Лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна включать набор последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон (помещений) или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений, количество которых определяется используемыми МАНК согласно приложению 1.

Для проведения диагностики гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции, лаборатории должны быть оснащены материально-техническими ресурсами согласно приложению 2.

4. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Важным моментом исследования является правильный выбор, отбор, хранение и использование биологического материала. Биологический материал должен соответствовать конкретной нозологии заболевания, содержать максимальное количество возбудителя (генома возбудителя) и быть доступным для получения не инвазивными методами. Для диагностики ОРВИ преимущественно используется биологический материал из дыхательных путей, соответствующий локализации поражения: при заболеваниях верхних дыхательных путей используются мазки из носоглотки и ротоглотки; в случае заболевания нижних дыхательных путей – материал из трахеи, бронхов и легких. При наличии выпота в плевральной полости также исследуется плевральная жидкость; при наличии менингеальной симптоматики – спинномозговая жидкость. Для диагностики отдельных инфекций могут использоваться дополнительные виды биологического материала, что указывается в инструкции к диагностическому набору. Например, для диагностики тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом ТОРС, помимо материала из респираторного тракта используются фекалии и плазма крови. При проведении исследования с целью определения этиологии ОРЗ с летальным исходом, исследуется секционный материал пораженных органов.

4.1. Перечень биологического материала для исследования

С целью выяснения этиологического агента (агентов) инфекции верхних дыхательных путей исследуются мазки со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки (АІ). Максимальная концентрация вирусов в этих отделах достигается на 2-й, 3-й день от момента появления симптомов заболевания (АІ). В связи с этим, брать материал для

исследования предпочтительно именно в эти указанные сроки. В то же время, метод ПЦР позволяет обнаружить НК возбудителя и гораздо позднее - в среднем до 7 дней, и максимум - до 2 недель от начала заболевания (при условии сохранения признаков поражения верхних дыхательных путей) (АII). Тем не менее, у госпитализированных пациентов материал для исследования следует собирать как можно раньше при поступлении (не позднее вторых суток), поскольку в более поздние сроки не исключена возможность суперинфекции при контакте с другими пациентами (АII).

Мазки со слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациента берут двумя разными зондами: сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки и объединяют вместе с целью повышения чувствительности исследования (АII): концы зондов с тампонами после взятия мазков последовательно помещаются в одну пробирку объемом 1,5-2 мл с 0,5 мл транспортной среды.

С целью выяснения этиологического агента (агентов) инфекции нижних дыхательных путей исследуется материал из нижних дыхательных путей (AI): мокрота (при глубоком откашливании), плевральная жидкость, эндотрахеальные аспираты из трахеи, получаемые с помощью хирургического (вакуумного или электрического) отсоса, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов, получаемые с помощью фибробронхоскопии, мокрота (откашливаемая свободно или откашливаемая после индукции ингаляцией стерильного 5% раствора натрия хлорида через небулайзер или полученная аспирацией из трахеи) .

В случае невозможности получения материала из нижних дыхательных путей, при исследовании для выявления респираторных вирусов допустимо использование мазков из верхних дыхательных путей (мазки со слизистой носоглотки из нижнего носового хода и мазки со слизистой задней стенки ротоглотки) (BII).

В случае летального исхода с целью определения этиологии инфекции исследуется посмертный (аутопсийный) материал (AI).

Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала представлены в приложении 3.

4.2. Методика получения и условия хранения биологического материала

4.2.1. Особенности сбора проб у разных категорий пациентов

Мазки со слизистой оболочки верхних дыхательных путей.

Мазки со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки берут после полоскания полости рта кипяченой водой комнатной температуры. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. В течение 6-ти часов перед процедурой нельзя использовать медикаменты, орошающие носоглотку или ротоглотку и препараты для рассасывания во рту.

У детей мазки со слизистой носоглотки берут сухим стерильным назофарингеальным велюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (АІ) (3–4 см для детей). После сбора материала конец зонда с тампоном опускают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой до места слома, при этом гибкая часть зонда складывается в три раза, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда. Пробирку герметично закрывают.

У взрослых мазки со слизистой носоглотки берут сухим стерильным назофарингеальным велюр-тампоном на пластиковом аппликаторе (допустимо использовать сухой стерильный зонд из полистирола с вязким тампоном). Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (АІ) (не менее 5 см для взрослых). После забора материала конец зонда с тампоном опускают на глубину 1 см в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой, конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки, опустив рукоятку зонда вниз. Пробирку герметично закрывают.

Мазки из ротоглотки берут сухим стерильным зондом из полистирола с вязким тампоном вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки (АІ), аккуратно прижимая язык пациента шпателем. После забора материала рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку с транспортной средой и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда с тампоном (1 см) отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он

позволил плотно закрыть пробирку. Допускается хранение в течение трех суток при температуре 2–8 °С, более длительно – при температуре не выше минус 16 °С (AI).

Мокроту при глубоком откашливании собирают в стерильные одноразовые герметично закрывающиеся контейнеры натошак после чистки зубов и полоскания полости рта водой. Пациента просят сделать несколько глубоких вдохов с задержкой дыхания на несколько секунд, затем с силой выдохнуть, что способствует появлению продуктивного кашля и очищению верхних дыхательных путей от мокроты (AI). Мокроту помещают в стерильные одноразовые пластиковые контейнеры. Допускается хранение в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С, более длительно - при температуре не выше минус 16 °С (AI).

Получение эндотрахеального аспирата проводят натошак после чистки зубов и полоскания полости рта водой. Пациента просят сделать несколько глубоких вдохов с задержкой дыхания на несколько секунд, затем с силой выдохнуть. Это способствует появлению продуктивного кашля и очищению верхних дыхательных путей от мокроты. После присоединения мукус-экстрактора через трубку-переходник к отсосу катетер для забора трахеального аспирата вводился в глотку через полость рта. Вследствие раздражения слизистой в области голосовой щели провоцируется кашлевой рефлекс и проводится извлечение трахеального содержимого через стерильный катетер (6 или 7 размера) с помощью отсоса (например, фирмы “Blue Cross A-750” (Япония)). Объем трахеального аспирата должен составлять не менее 3-5 мл; аспират помещают в стерильные одноразовые пластиковые контейнеры. Допускается хранение в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С, более длительно - при температуре не выше минус 16 °С (AI).

Получение индуцированной мокроты

С целью облегчения отхождения мокроты используют упражнения дыхательной гимнастики и вибрационный массаж грудной клетки. Наибольшего эффекта достигают с помощью ингаляций с использованием гипертонического раствора хлорида натрия (BII)[Zar HJ].

Перед процедурой целесообразно ввести 200 мкг сальбутамола через дозирующий ингалятор для предотвращения бронхоспазма. Затем в течение 15 минут через струйный небулайзер (аэрозольный аппарат) подается кислород со скоростью 5 л/мин с 5 мл 5% стерильного раствора NaCl. После этого проводится постукивание по передней и задней стенкам грудной клетки, с целью стимуляции отхождения мокроты. Затем пациента просят хорошо откашляться и собрать мокроту из нижних дыхательных путей (не

слюну!) в стерильный контейнер. Объем образца мокроты должен быть не менее 3 мл (для взрослых и около 1 мл для детей).

У пациентов с бронхиальной астмой ингаляции должны проводиться с осторожностью, для предупреждения бронхоспазма, целесообразно предварительно провести ингаляцию 200-400 мкг сальбутамола (AI).

В случае если мокрота не откашливается, процедуру рекомендуется (AI) комбинировать с последующим получением аспириатов из трахеи (эндотрахеальные аспириаты) с целью извлечения содержимого из трахеи с помощью стандартного отсоса с использованием стерильного катетера 6 или 7 размера.

Допускается хранение в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С, более длительно - при температуре не выше минус 16 °С (AI).

Аутопсийный материал забирают стерильным индивидуальным инструментом из зоны поврежденной ткани объемом 1-3 см³ стерильными инструментами (индивидуально для каждого органа), помещают в одноразовые стерильные пластиковые контейнеры с герметично завинчивающейся крышкой, замораживают и хранят при температуре не выше минус 16 °С (AI).

Исследуется аутопсийный материал следующих органов: фрагменты пораженной части трахеи, пораженной части бронхов, пораженной части легких, выпот плевральной полости (при его наличии), фрагменты селезенки, пораженной части миокарда (при наличии поражения), мягких мозговых оболочек, коры больших полушарий (при наличии менингеальной симптоматики в анамнезе), а при наличии очаговых изменений - аутопаты с границ данных участков.

Материал для исследования должен быть нативным (без фиксации формалином) (AI).

4.2.2. Сбор биологического материала для ПЦР с целью последующей изоляции культуры вируса

Мазки из носоглотки для вирусологической диагностики гриппа собирают стерильными зондами с вязкими тампонами со слизистой оболочки из нижнего носового хода. Зонд с тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход глубоко, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (AI) (3-4 см для детей и 5-6 см

для взрослых). После взятия материала тампон, не нарушая стерильности, помещают в пробирку с 2,0–5,0 мл вирусологической транспортной среды, рекомендованной в МР «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация» (АІ).

Взятие биологического материала с целью изоляции вирусов следует проводить не позднее трех дней от начала заболевания или в первый день госпитализации, предпочтительно до начала противовирусной терапии.

Мазки хранят в течение 24 ч при температуре 2–8° С, более длительно – при температуре не выше минус 20° С (желательно при температуре минус 70° С) (АІ). Перечень зондов и сред, рекомендуемых для применения, представлен в приложении 3.

После приготовления вирусологическую транспортную среду аликвотируют в одноразовые стерильные пробирки из полипропилена стерильным наконечником в стерильных условиях (в ламинарном боксе) по 1,0 мл (при использовании пробирок объемом 1,5 мл), по 1,5 мл (при использовании пробирок объемом 2 мл), или по 2,0 мл (при использовании пробирок объемом 5-15 мл), маркируют и хранят до использования при температуре от 2 до 8 °С (АІ).

Аутопсийный материал забирают стерильным индивидуальным инструментом из зоны поврежденной ткани объемом 1-3 см³ стерильными инструментами (индивидуально для каждого органа), помещают в одноразовые стерильные криопробирки с герметично завинчивающейся крышкой, замораживают и хранят при температуре не выше минус 70° С (АІ).

Следует избегать оттаивания и повторного замораживания материала во время хранения и транспортирования, поскольку это приводит к утрате вирусами жизнеспособности (АІ).

Транспортирование при температуре от 2 до 8° С допускается не более 24 часов. При необходимости более длительной транспортировки следует обеспечить температуру не выше минус 70° С (с использованием сухого льда (АІ), при этом биологический материал должен быть помещен в криопробирки и упакован согласно руководству ВОЗ «Перевозка инфекционных материалов с сухим льдом»:

http://www.who.int/ihr/Module_6_Shipping_with_dry_ice_RU.pdf).

В контейнер с целью поддержания холодной цепи помещают одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение требуемой температуры.

4.3. Маркировка материала для лабораторного исследования

На этикетке пробирок (контейнеров) с материалом указывается: порядковый номер образца, соответствующий номеру в сопроводительном документе, и, по возможности, фамилия и инициалы пациента, тип биоматериала.

В сопроводительном документе (направлении) к биоматериалу, собранному для исследования в лаборатории, необходимо указать:

- наименование учреждения, которое направляет биоматериал на исследования, телефон, адрес электронной почты;
- фамилию и имя обследуемого лица;
- возраст или дата рождения;
- пол;
- дату взятия биоматериала для лабораторного исследования;
- тип материала;
- дату заболевания или контакта с больным;
- предварительный клинический диагноз или повод к обследованию;
- степень тяжести заболевания;
- данные о вакцинации против гриппа в текущем эпидемическом сезоне (вакцинирован / не вакцинирован / нет данных);
- ФИО, должность, сотрудника, отправившего биоматериал, дату отправки биоматериала и контактный телефон, по которому можно связаться с данным сотрудником.

4.4. Транспортирование биологического материала для проведения ПЦР-исследования

При необходимости транспортирования внутри одного здания, пробирки/контейнеры с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные контейнеры-переноски. Транспортирование производится при комнатной температуре в течение 3 часов, более длительно - при температуре от 2 до 8 °С (АІ).

При необходимости транспортирования биологического материала в другие организации, образцы каждого пациента помещают в индивидуальный герметичный пакет с адсорбирующим материалом и дополнительно упаковывают в общий герметичный пакет, помещаемый в термоконтейнер (АІ). Транспортирование производится в термоконтейнерах при температуре от 2 до 8 °С (АІ). В контейнер желательно поместить

одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение требуемой температуры.

Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера.

4.5. Оценка приемлемости образцов

После доставки образца в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, маркировку пробирок с образцами биологического материала, их целостность и зарегистрировать поступивший материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме. Нумерация образцов при регистрации должна быть идентична нумерации в бланках направлений на молекулярно-биологическое исследование.

Непригодными для исследования являются образцы:

- немаркированные или несущие неверную (нечитаемую) маркировку;
- для которых не указаны дата получения материала;
- хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением требований, установленных для данного типа биологического материала;
- с нарушением целостности и/или герметичности тары (пробирок и др.) (в т.ч. пролитые образцы).

В случае непригодности доставленного образца необходимо уведомить врача, назначившего исследование, и рекомендовать повторное взятие материала с соблюдением всех перечисленных правил.

Если повторное взятие таких образцов материала невозможно, при оформлении результата ПЦР-исследования необходимо отразить возможность влияния нарушения правил преаналитического этапа на полученный результат.

Некоторые виды биологического материала требуют предварительной обработки, заключающейся в гомогенизации (например, секционный материал) снижении вязкости (например, густая и неоднородная по консистенции мокрота) и фракционировании путем центрифугирования. Описание работ по предварительной обработке и подготовке биологического материала к исследованию представлены в приложении 4.

5. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ВЕРХНИХ И НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

5.1. Сравнение методов лабораторной диагностики

Лабораторные методы, применяемые с целью этиологической диагностики вирусных инфекций верхних и нижних дыхательных путей, подразделяют на прямые (выделение возбудителя инфекции, обнаружение генома или антигенов возбудителя) и косвенные (обнаружение специфических антител к возбудителю).

Для выделения возбудителя инфекции применяют культуральный метод – направлен на изоляцию и идентификацию чистой культуры возбудителя инфекции. Среди вирусных возбудителей ОРЗ выделение в культуре возможно только для вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса, вирусов парагриппа 1-3 типов, метапневмовируса человека и аденовирусов, однако как рутинная процедура данный метод используется только для вирусов гриппа. Изоляция вирусов гриппа проводится в живых культурах клеток млекопитающих или на развивающихся куриных эмбрионах с последующим определением активности гемагглютинации (агглютинации вирусами эритроцитов) и идентификацией субтипов гемагглютинина (метод РТГА с типоспецифическими сыворотками) [МР «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация»]. Метод характеризуется достаточно большой продолжительностью, но незаменим при необходимости детального изучения патогенности, чувствительности к противовирусным препаратам, антигенных и других свойств изолятов вирусов.

Для определения антигенов вирусных возбудителей ОРЗ используют методы иммунохимии. В России используют тесты на основе *иммунохроматографии* для выявления антигенов вирусов гриппа и респираторно-синцитиального вируса (С II). Для обнаружения антигенов вирусов гриппа А и В используется также метод *ИФА*. Методы, основанные на связывании антигена с антителами, мечеными флуорохромом, результат которых оценивают с помощью люминисцентной микроскопии (*РИФ, ПИФ, РПИФ* и др.), используют для выявления в мазках из респираторного тракта антигенов вирусных возбудителей ОРЗ, находящихся внутри клеток слизистой оболочки. Тесты на основе *иммунофлуоресценции* (*РИФ, ПИФ, РПИФ* и др.) применяют (D III) только для обнаружения антигенов вирусов гриппа, респираторно-синцитиального вируса, аденовирусов, вирусов парагриппа 1-3.

Такие тесты используются только в эпидемиологических целях для массового скрининга, поскольку их аналитические характеристики могут варьировать в широких пределах в зависимости от производителя, условий

хранения реагентов и навыков их использования, и по этой причине они могут давать ложноотрицательные результаты - недовыявлять случаи инфицирования в период эпидемий (недостаточная чувствительность по сравнению с культуральными методами и ПЦР), и давать ложноположительные результаты в межэпидемический период (в силу недостаточной специфичности и субъективности интерпретации анализа) [Choi YJ; Choi WS; Tai CF].

Для выявления нуклеиновых кислот (РНК/ДНК) - фрагментов генома возбудителей острых инфекций дыхательных путей применяют *МАНК*, которые наиболее эффективны и востребованы для ранней диагностики и скрининга с целью последующего получения чистой культуры возбудителя. Для рутинных исследований применяются тесты на основе ПЦР, которые обнаруживают РНК/ДНК патогенов непосредственно в биологическом материале (AI). Максимального уровня специфичности и чувствительности достигают тесты на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (AI). Многочисленные исследования показывают преимущество такого формата ПЦР по диагностической чувствительности и специфичности перед выявлением антигенов методами иммунохроматографии и иммунофлуоресценции при диагностике гриппа, респираторно-синцитиальной инфекции и инфекции, вызванной вирусами парагриппа 1-3 [Ganzenmueller T; Vaz-de-Lima LRA; Corne JM].

Выявление специфических антител в сыворотках крови больных ОРЗ выполняют преимущественно с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА), иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции связывания комплемента (РСК) (ВП). Диагностические наборы на основе ИФА разработаны для выявления АТ к возбудителям аденовирусной инфекции, респираторно-синцитиальной инфекции, гриппа и парагриппа. В большинстве случаев при серологической диагностике обнаруживаются АТ класса IgM и IgG или все три класса антител. Тесты в первую очередь предназначены для определения уровня специфических антител в сыворотках крови больных с целью ретроспективного подтверждения диагноза вирусных инфекций. При РС-вирусной инфекции АТ класса IgM в диагностическом титре появляются в течение недели от начала заболевания и только у 73% больных [Meurman O], в связи с чем, для диагностики этой инфекции более чувствительным и специфичным является выявление сероконверсии специфических АТ класса IgG с 4-кратным нарастанием титра [Puthavathana P] в образцах сыворотки крови, полученных последовательно в острый период заболевания и в период

реконвалесценции (спустя 10-14 дней). Достоверность результата увеличивается в случае одновременного исследования обеих сывороток (AI).

Исследование диагностической эффективности выявления ДНК аденовирусов по сравнению с обнаружением специфических к hAdv AT класса IgM, IgA и IgG в парных сыворотках при острой респираторной инфекции показало, что диагностическая чувствительность последнего составляет 57,5% [Агеева МР].

Определение специфических антител используются также для оценки уровня коллективного гуморального иммунитета и ретроспективного анализа природы эпидемических вспышек.

Обнаружение антител к вирусам гриппа методом ИФА уступает по чувствительности и специфичности РТГА. Исследования во время пандемии гриппа 2009 года показали, что чувствительность обнаружения AT класса IgM к гемагглютнину вируса гриппа A(H1N1)pdm09 составила 53, 36 и 10% для больных до 5 лет, 6-15 лет и взрослых, соответственно. Также было показано, что для достижения специфичности требуется исследования парных сывороток крови с выявлением сероконверсии с 4-кратным нарастанием титра AT класса IgG или IgA [Li ZN], при этом чувствительность составляла 80% и 67% соответственно.

Внедрение ПЦР с детекцией флуоресценции в режиме реального времени и других МАНК произвело революцию в лабораторной диагностике респираторных вирусных инфекций благодаря своей высокой чувствительности, скорости и широкому спектру выявляемых с возможностью одновременного обнаружения нескольких возбудителей [Olofsson S].

Именно благодаря внедрению МАНК были обнаружены ранее неизвестные респираторные вирусы: метапневмовирус, бокавирус, коронавирусы (hCov HKUI и hCov NL-63 и новые риновирусы [Williams JV; Fabbiani M; Rhedin S; Pyrc K; Piralla A; Kieninger E].

В этой связи ранее используемые методы диагностики, такие как выделение вирусов в культуре клеток, обнаружение антигенов (методы ИФА или иммунофлуоресценции) в зарубежной рутинной клинической практике в большинстве лабораторий ушли в прошлое в силу своей меньшей чувствительности [Mahony JB; Johani SM; Jokela P; Beck ET].

Тесты на основе ПЦР в формате FRT позволяют обнаруживать РНК вируса гриппа А в суспензии с инфекционной активностью 0,03 lgTCID50/мл - 0,02 lgTCID50/мл и РНК вируса гриппа В в суспензии с инфекционной активностью 1lgTCID50/мл [Яцышина С.Б., 2009].

Использование в качестве мишени специфичных консервативных участков генома вирусов гриппа, обуславливает высокие показатели диагностической чувствительности ПЦР, приближающихся к 100% (90,5% - 97,6%) по сравнению с культуральной диагностикой [Bennett S; Jenny SL; Pabbaraju K].

Чувствительность ПЦР-исследования по обнаружению НК респираторных вирусов человека разных видов составляет 1000 – 10000 ГЭ (или копий) НК в 1 мл исследуемого образца.

Вместе с тем, при высокой аналитической и диагностической чувствительности ПЦР с детекцией флуоресценции в режиме реального времени обладает и высокой аналитической и диагностической специфичностью. Исследования показывают, что респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус, вирусы гриппа и другие, за исключением риновирусов, очень редко (0,5%-2,2%) обнаруживаются у взрослых и детей без симптомов ОРВИ [Brittain-Long R; Rhedin S; Jansen RR; Яцышина С.Б., 2016]. Более высокую частоту (порядка 30%) обнаружения риновирусов у условно-здоровых детей связывают с более длительным (3-6 недель) выделением вирусов из респираторного тракта после перенесенной инфекции, также не исключают наличия иннаппарантной инфекции [Jansen RR; Regamey N].

5.2. Показания к применению метода полимеразной цепной реакции для этиологической диагностики гриппа и ОРВИ

Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ при использовании метода ПЦР применяется для решения эпидемиологических и клинических задач. Общими показаниями для лабораторного обследования с целью проведения этиологической диагностики ОРВИ является наличие у пациента остро возникшего заболевания с локальными симптомами поражения дыхательных путей при наличии синдрома общей интоксикации.

ПЦР-анализ рекомендуется использовать в медицинских учреждениях для выяснения природы похожих по клиническим проявлениям, но отличных по этиологии, острых респираторных заболеваний в целях:

- раннего назначения специфических средств этиотропной терапии,
- дифференциальной диагностики с другими инфекционными болезнями,
- своевременной госпитализации больных,
- прогнозирования тяжести течения заболевания, возможных осложнений и исходов болезни,

- рационального размещения больных по этиологическому принципу (во избежание перекрестного внутрибольничного инфицирования),

а также в других случаях, требующих обязательного лабораторного обследования в целях идентификации возбудителя гриппа и ОРВИ согласно СП 3.1.12.3117-13 «Профилактика гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций».

Диагностика гриппа и других ОРВИ при использовании полимеразной цепной реакции применяют для решения различных эпидемиологических задач:

1. Определение этиологии острой инфекции верхних дыхательных путей при проведении мониторинга,
2. Определение этиологии острой инфекции нижних дыхательных путей при проведении мониторинга,
3. Изучение этиологии группового заболевания ОРЗ в целях проведения соответствующих профилактических и лечебных мероприятий,
4. Проведение исследований при подозрении на инфекцию, вызванную вирусами, относящимися к I и II группам опасности (коронавирусы SARS, MERS, вирус гриппа птиц, высоко патогенный вирус гриппа), связанную с завозом из неблагополучных регионов мира,
5. Лабораторное исследование с целью подтверждения случая гриппа (или другой ОРВИ) с летальным исходом,
6. Проведение ПЦР-анализа, как ускоренного предварительного теста с целью последующего выделения культуры вируса с использованием культурального метода исследования,
7. С целью идентификации и типирования культур вирусов.

5.3. Принцип метода ПЦР

Полимеразная цепная реакция является прямым методом быстрой диагностики инфекционных болезней, позволяющим обнаруживать в качестве анализата специфичные для возбудителя инфекции участки его генома. Метод направлен на обнаружение НК вирусов и бактерий в различных типах биологического материала, характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет проводить стандартизацию процедуры исследования, контролировать процесс обработки материала на всех этапах. Высокая аналитическая чувствительность ПЦР обеспечивается за счет лежащей в основе амплификации, то есть многократного увеличения количества фрагмента НК возбудителя. Цикличность реакции достигается путем многократного

(от 40 до 45 раз) последовательного повторения шагов инкубации реакционной смеси при температурах: 90-95°C (денатурация ДНК / кДНК), 50-65°C (отжиг праймеров), 60-72 °C (элонгация, или синтез цепи ДНК).

Залогом достоверности ПЦР-анализа при идентификации и субтипировании конкретного возбудителя ОРВИ является правильный выбор гена-мишени, олигонуклеотидов, комплементарных мишени и параметров ПЦР, а также экспериментальная оценка аналитических и диагностических характеристик. Поскольку вирусы подвержены большой изменчивости, гены-мишени должны быть консервативными в пределах одного вида вируса. Как правило, это гены, кодирующие матриксный протеин, нуклеопротеин, неструктурные белки, или не транслируемые области генома.

Аналитические и диагностические характеристики (специфичность и чувствительность) анализа должна обязательно оцениваться при разработке и подтверждаться при регистрации наборов реагентов, после чего они разрешаются к использованию в целях диагностики. Аналитическая чувствительность отражает минимальное количество аналита (ДНК или РНК) в пересчете на 1 мл исследуемого образца биологического материала, которое может быть обнаружено тестом в 100% случаев. Аналитическая специфичность – способность теста определять конкретный аналит в образцах, содержащих другие похожие аналиты (например, РНК или ДНК других вирусов, бактерий или человека).

Важно учитывать, что характеристики диагностических наборов, установленные разработчиком и указанные в инструкции к набору реагентов, будут воспроизводиться только при условии соблюдения всех требований и рекомендаций, включая использование оборудования, комплектов реагентов, соблюдение всех этапов и процедур исследования от момента сбора биологического материала до интерпретации.

При диагностике вирусных инфекций дыхательных путей информация о количестве возбудителя не имеет большого значения: с одной стороны, концентрация возбудителя в респираторных мазках весьма условно свидетельствует о тяжести заболевания, и с другой стороны, больше зависит от способа и правильности получения биологического материала. В связи с этим, более затратные количественные тесты не имеют большого смысла, поэтому не востребованы. Преимуществом могут пользоваться тесты, обеспечивающие большую мультиплексность анализа, то есть возможность обнаруживать большое количество значимых возбудителей в одной ПЦР при приемлемой чувствительности.

5.4. Этапы проведения ПЦР

Непосредственно ПЦР-исследование состоит из нескольких этапов:

- экстракция НК (РНК/ДНК) из образцов исследуемого биологического материала,
- в случае если геном возбудителя представлен РНК, требуется проведение реакции обратной транскрипции (ОТ) для получения кДНК,
- амплификация ДНК (или кДНК) при помощи специфичных к гену-мишени праймеров и фермента Taq-полимеразы,
- детекция, анализ и интерпретация результатов,
- регистрация результатов.

На этапе экстракции исследуемый образец обрабатывается лизирующим раствором, в результате чего происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение НК. Поскольку качество ПЦР зависит от чистоты выделенных НК, с целью очистки (устранения ингибиторов ПЦР) используются различные методы экстракции НК, включая автоматизированные. Один из методов основан на принципе неселективного или селективного прикрепления НК к сорбентам с последующей отмывкой и элюцией НК с сорбентов в буферный раствор. Существуют варианты с использованием сорбентов, содержащих частицы железа; в таком случае фракционирование возможно с применением магнитных штативов или автоматических станций. Сорбция также может проводиться на мембраны специальных колонок при центрифугировании раствора, содержащего НК, или при помощи вакуумного насоса. В основе другого метода выделения лежит принцип высаливания (выпадения в осадок) НК из растворов при добавлении спиртов в присутствии солей в высокой концентрации. Экстракция РНК из исследуемого материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО), что позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца на всех этапах. Внутренний контроль может быть экзогенным (в этом случае препарат ВКО добавляется в исследуемый образец на этапе экстракции) или эндогенным (в реакции ПЦР используются праймеры для амплификации геномной ДНК / РНК человека). Для ПЦР-исследования образцов для выявления возбудителей, геном которых состоит из РНК, используется препарат ВКО, представляющий собой молекулу РНК, защищенную оболочкой белка. На этапе экстракции получают РНК ВКО, затем проводится получение, амплификация кДНК ВКО и его детекция. Описание примера работ по экстракции РНК/ДНК приведены в приложении 5.

Реакция обратной транскрипции может проводиться в двух вариантах: как отдельный этап или совмещенная с амплификацией. Если ОТ проводится отдельным этапом, для инициации синтеза кДНК на молекулах РНК используются гексамеры случайной последовательности (рэндом-праймеры), фермент обратная транскриптаза и другие специальные реагенты. В результате такой реакции образуется кДНК на основе матриц всех РНК, присутствующих в растворе, полученном на этапе экстракции НК из исследуемого образца. В случае, если ОТ совмещена в одной реакции (программе) с ПЦР, реагенты для ОТ входят в состав подготовленной смеси для амплификации, к которой добавляют РНК; в результате образуется только кДНК, синтез которой иницируется участвующим в ПЦР праймером. Первый вариант более удобен при необходимости проведения большого количества ПЦР (более трех): в диагностических целях для обнаружения широкого спектра возбудителей для каждого пациента, при проведении эпидемиологического мониторинга, при расследовании случаев группового заболевания или выяснения этиологии тяжелого (атипичного) или летального случая, а также при необходимости последующего субтипирования положительных образцов (например при гриппе). кДНК более стабильна, по сравнению с РНК, и может более длительно храниться без замораживания: при температуре от 2 до 8 °С в течение недели (при условии проведения ОТ в пробирках, имеющих специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free», или в подвергшихся автоклавированию), и более длительно при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев или при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Допустимо однократное повторное замораживание кДНК. При необходимости хранения РНК, не позднее 30 мин после экстракции ее следует перенести в стерильные пробирки и хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, при температуре не выше минус 16 °С в течение месяца, и более длительно при температуре не выше минус 68 °С, причем повторное замораживание РНК не допускается.

Отдельный этап ОТ также удобен в случае подозрения на инфекцию, вызванную возбудителем второй группы опасности (ТОРС, высоко патогенный грипп птиц), когда манипуляции с биологическим материалом (предварительная обработка, экстракция НК) и ОТ проводятся в помещениях, оборудованных для работы с возбудителем второй группы опасности, а далее кДНК, при необходимости, может быть передана для проведения ПЦР в помещения, оборудованные для работы с возбудителями III-IV группы опасности. Пример методики проведения реакции обратной транскрипции приведен в приложении 6.

Для диагностики ОРВИ применяются варианты ПЦР, различающиеся способом детекции фрагментов амплификации: ПЦР с детекцией методом электрофореза, с флуоресцентной детекцией с использованием интеркалирующих красителей, с гибридационно-флуоресцентной детекцией с использованием конъюгированных с флуоресцентной меткой зондов в режиме реального времени (ПЦР-РВ, или FRT) и по окончании ПЦР (ПЦР-КТ, или FEP). Описание методик ПЦР с различными вариантами детекции продуктов амплификации приведен в приложении 7.

Из всех вариантов наибольшую специфичность и возможность мультиплексирования (обнаружения в одной реакции нескольких генов-мишеней различных микроорганизмов) обеспечивает гибридационно-флуоресцентная детекция с использованием конъюгированного с флуоресцентной меткой зонда, который присутствует в составе реакционной смеси и гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата ПЦР-КТ осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата ПЦР-РВ – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» с двумя – шестью оптическими каналами. Специфичность амплификации также обеспечивается «горячим стартом», когда реакция начинается не ранее этапа денатурации НК при разделении ее компонентов восковой перегородкой, которая плавится при 95°C, либо использованием химически модифицированных Taq-полимераз, активирующихся при прогреве реакционной смеси при 95 °C..

Анализ результатов различается в зависимости от варианта ПЦР. Описание анализа результатов для методик ПЦР с различными вариантами детекцией продуктов амплификации приведен в приложении 7.

Для некоторых вариантов ПЦР требуется дополнительное оборудование (например, для детекции флуоресценции при ПЦР-КТ и разделения ДНК методом электрофореза, визуализации ДНК в агарозном геле). ПЦР в формате детекции продуктов амплификации методом электрофореза требует особых мер предотвращения контаминации (ложноположительных результатов), достигаемых проведением специальных мероприятий и соблюдением особых правил организации лаборатории согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий,

использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Для правильной интерпретации результатов обязательно использование положительных и отрицательных контрольных реакций для всех этапов анализа. С целью упрощения и ускорения этого этапа можно использовать специальное программное обеспечение, рекомендованное производителем конкретного диагностического набора реагентов.

По результатам анализа в лаборатории выдают ответ о наличии в пробе специфических фрагментов ДНК или РНК генома возбудителя инфекционного заболевания. Результаты ПЦР-исследования должны учитываться в совокупности с результатами других методов в комплексной диагностике заболевания.

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Организация качества лабораторных исследований обеспечивается внедрением системы управления качеством (менеджмента качества, СМК) в соответствии с ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и ГОСТ Р ИСО 15189. Система управления качеством предусматривает внутренние контрольные процедуры и внешний контроль. В рамках организации контроля качества большое внимание необходимо уделять разработке и внедрению на рабочих местах стандартных операционных процедур (СОП). С целью предотвращения появления недостоверных, в том числе ложноположительных результатов, необходимо соблюдать требования по организации лаборатории, правила работы персонала с оборудованием и реактивами, и требования, указанные в инструкции и методических рекомендациях производителей конкретного набора реагентов.

6.1. Внутрिलाбораторный контроль качества

Внутрिलाбораторный контроль представляет собой систему внутрिलाбораторных сличений получаемых в лаборатории результатов. Для этого в каждой серии (постановке) тестируются контрольные образцы: ОКО, К+ и К-. Для внутрिलाбораторного контроля качества исследований рекомендуется использовать содержащие выявляемые организмы (или их НК), контрольные образцы, прошедшие государственную регистрацию в установленном порядке и разрешенные к применению на территории РФ (при их наличии).

Обеспечение внутреннего контроля качества проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и с инструкциями используемых наборов реагентов.

Внутрилабораторный контроль включает следующие специализированные процедуры:

- постоянная оценка контрольных образцов в каждой постановке (серии) амплификации,
- периодическое проведение повторного испытания (выполняется двумя операторами параллельно при смене оборудования, специалиста, введении нового набора реагентов),
- использование контрольных образцов для внутрилабораторного контроля качества (данный вид контрольных процедур рекомендуется проводить при входном контроле наборов реагентов, смене оборудования, специалиста, введении нового набора реагентов),
- контроль загрязнения лаборатории продуктами амплификации, проводится ежемесячно согласно процедуре (приложение 9).

Для контроля за контаминацией лаборатории продуктами амплификации необходимо проводить тестирование смывов не реже 1 раза в неделю в соответствии с МУ 1.3.2569-09 согласно приложению 8.

В случае получения постоянных положительных сигналов в отрицательных контролях все исходные реактивы подлежат немедленной замене, необходимо провести деконтаминационные мероприятия в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.2. Внешний контроль качества

Внешний контроль качества осуществляется в форме участия в межлабораторных сличениях. В случае неудовлетворительной оценки полученных результатов в лаборатории необходимо принимать экстренные меры по устранению ошибок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева М.Р., Яцышина С.Б., Львов Н.И. Лабораторная служба. 2016, т.5, №3, с.35-35.
2. Варганян Р.В., Швецова Ю.В., Бунин С.В., Яцышина С.Б., Малышев Н.А. Бокавирусная инфекция у детей раннего возраста. Детские инфекции. 2010, №3, с.10-14.
3. Кондратьева Т.Ю., Швец Е.Ю., Евсеева Е.Л., Горелов А.В., Яцышина С.Б., Шипулин Г.А., Семина Н.А. Эпидемиологические аспекты бокавирусной инфекции у детей. Инфекционные болезни. 2008, т.6, №2, с.1-16.
4. Львов Н.И., Писарева М.М., Мальцев О.В., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Михайлова М.А., Го А., Янина М.А., Резниченко Н.А., Грудинин М.П., Жданов К.В., Лобзин Ю.В. Особенности этиологической структуры ОРВИ в отдельных возрастных и профессиональных группах населения Санкт-Петербурга в эпидемический сезон 2013-2014 гг. Журнал Инфектологии. 2014, т.6, №3, с.62-70.
5. Методические рекомендации «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация» (Утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 18.04.2006. N 0100/4430-06-34).
6. Яцышина С.Б., Шипулин Г.А. Совершенствование лабораторной диагностики гриппа и ОРЗ. Грипп и гриппоподобные инфекции (включая особо опасные формы гриппозной инфекции). Фундаментальные и прикладные аспекты изучения. Санкт-Петербург: Изд-во "Роза мира", 2008. Бюллетень проблемной комиссии N 2, с. 43-48.
7. Яцышина С.Б., Миненко А.Н., Прадед М.Н., Волошина П.В., Трушакова С.В., Браславская С.И., Бурцева Е.И., Шипулин Г.А., Малеев В.В., Покровский В.И. Диагностика гриппа: новый вариант H1N1 в России. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009, № 6, с.56-62.
8. Яцышина С.Б., Самчук В.В., Васильев В.В., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Савочкина Ю.А., Буланенко В.П., Шипулин Г.А., Малеев В.В. Аденовирусная пневмония с летальным исходом у взрослых. Терапевтический архив. 2014, т.86, №11, с.55-59.
9. Яцышина С.Б., Спичак Т.В., Ким С.С., Воробьева Д.А., Швец Е.Ю., Горелов А.В., Учайкин В.Ф., Покровский В.И. Выявление респираторных вирусов и атипичных бактерий у больных пневмонией и здоровых детей за десятилетний период наблюдения. Педиатрия. 2016, №2, с.43-50.
10. Assiri A.M.D. Hospital Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. The New England Journal of Medicine. 2013; 369(5):407-16.
11. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File TM Jr, Musher DM, Fine MJ. Guidelines from the infectious diseases society of America. Practice Guidelines for the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. Clin Infect Dis. 2000; 31:347–82.
12. Beck ET, Henrickson KJ. Molecular diagnosis of respiratory viruses. Future Microbiol. 2010; 5(6):901–16.
13. Bennett S., Gunson R.N., MacLean A. et al. The validation of a real-time RT-PCR assay which detects influenza A and types simultaneously for influenza A H1N1 (2009) and oseltamivir-resistant (H275Y) influenza A H1N1 (2009). J Virol Methods. 2011; 171:86–90.
14. Bradburne AF, Bynoe ML, Tyrrell DA. Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. Br. Med. J. 1967; 3:767-9.
15. Brittain-Long R, Westin J, Olofsson S, Lindh M, Anderson L-M. Prospective evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens – duration of symptoms significantly affects detection rate. J. Clin. Virol. 2010; 47(3):263–7.
16. CDC. Estimates of deaths associated with seasonal influenza—United States, 1976–2007. MMWR. 2010; 59:1057–62.
17. CDC. Influenza-associated pediatric deaths-United States, September 2010-August 2011. MMWR. 2011; 60(36):1233-8.

18. CDC. Outbreaks of Human Metapneumovirus in Two Skilled Nursing Facilities — West Virginia and Idaho, 2011–2012. *MMWR*. 2013; 62(46):909-13.
19. Choi WS, Noh JY, Huh JY et al. The clinical usefulness of the SD Bioline Influenza Antigen Test(R) for detecting the 2009 influenza A (H1N1) virus. *Yonsei Med J*. 2011; 52(4):683–5.
20. Choi Y.J., Nam H.S., Park J.S. et al. Comparative analysis of the multiple test methods for the detection of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(10):1450–6.
21. Corne JM, Green S, Sanderson G, Caul EO, Johnston SL. A multiplex RT-PCR for the detection of parainfluenza viruses 1-3 in clinical samples. *J Virol Methods*. 1999; (82):9–18.
22. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg, GA, Hall CB, Szilagyi PG, Staat MA, Iwane MK, Prill MM, Williams JV, for the New Vaccine Surveillance Network (NVSN). The burden of human metapneumovirus infection in young children. *New England Journal of Medicine* 2013; 368:633-43.
23. Esposito S, Daleno C, Prunotto G, Scala A, Tagliabue C, Borzani I, Fossali E, Pelucchi C, Principi N. Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013; 7(1):18-26.
24. Fabbiani M, Terrosi C, Martorelli B, Valentini M, Bernini L, Cellesi C, and Cusi M.G. Epidemiological and Clinical Study of Viral Respiratory Tract Infections in Children From Italy. *Journal of Medical Virology*. 2009; 81:750-6.
25. Ganzenmueller T, Kluba J, Hilfrich B et al. Comparison of the performance of direct fluorescent antibody staining, a point-of-care rapid antigen test and virus isolation with that of RT-PCR for the detection of novel 2009 influenza A (H1N1) virus in respiratory specimens. *J Med Microbiol*. 2010; 59:713–7.
26. Harris M, Clarc J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, McKean M, Thomson A, British Thoracic Society Standards of Care Committee. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax*. 2011; 66: Suppl 2:ii1-23.
27. Honkinen M, Lahti F, Osterback R, Ruuskanen O, Waris M. Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumoniae. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(3):300-7.
28. Jansen RR, Wieriga J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, deJong MD, Schinkel J. Frequent Detection of Respiratory Viruses without Symptoms: Toward Defining Clinically Relevant Cutoff Values. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(7):2631-6. doi: 10.1128/JCM.02094-10.
29. Jenny SL, Hu Y, Overduin P, Meijer A. Evaluation of the Xpert Flu A Panel nucleic acid amplification-based point-of-care test for influenza A virus detection and pandemic H1 subtyping. *J Clin Virol*. 2010; 49(2):85–9.
30. Johani SM, Balawi M, Alwan B, Hefdhhi R, Hajeer A. Validity of two rapid point of care influenza tests and direct fluorescence assay in comparison of real time PCR for swine of origin Influenza virus. *J. Infect. Public Health*. 2011; 4(1):7–11.
31. Jokela P, Piiparinen H, Luiro K, Lappalainen M. Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex real-time RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay. *Clin. Microbiol. Infect*. 2010; 16(10):1568–73.
32. Kieninger E, Fuchs O, Latzin P, Frey U and Ramey N. Rhinovirus infection in infancy and early childhood. *Eur Respir J*. 2013; 41(2): 443-52.
33. Li ZN, Lin SC, Carney PJ, Li J, Liu F, Lu X, Liu M, Stevens J, Levine M, Katz JM, Hancock K. IgM, IgG, and IgA antibody responses to influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin in infected persons during the first wave of the 2009 pandemic in the United States. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21(8):1054-60. doi: 10.1128/CVI.00129-14.
34. Lim WS, Baudouin SV, George RC, Hill AT, Jamieson C, Jeune ILe, Macfarlane JT, Read RC, Roberts HJ, Levy ML, Wani M, Woodhead MA. British Thoracic Society guidelines

- for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Pneumonia Guidelines Committee of the BTS Standards of Care Committee. Thorax.* 2009; 64(Suppl III):iii1–iii55. doi:10.1136/thx.2009.121434
35. Mahony JB. Nucleic acid amplification-based diagnosis of respiratory virus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2010; 8(11):1273–92.
 36. Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Whitney C. Update of Practice Guidelines for the Management of Community-Acquired Pneumonia in Immunocompetent Adults. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 37:1405–33.
 37. Memish Z.A. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. *Emerging Infectious Diseases.* 2013; 19(11):1819-23. www.cdc.gov/eid.
 38. Meurman O, Ruuskanen O, Sarkkinen H, Hanninen P, Halonen P. Immunoglobulin class-specific antibody response in respiratory syncytial virus infection measured by enzyme immunoassay. *J Med Virol.*1984; (14):67–72.
 39. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, Pierangeli A, Antonelli G, De Angelis D, Berardi R, Moretti C. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child.* 2010; 95(1):35-41.
 40. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010; 375:1545–55.
 41. Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J, Lindh M. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2011; 9(8):615–26.
 42. Pabbaraju K, Wong S, Wong AA et al. Design and validation of real-time reverse transcription-PCR assays for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:3454–60.
 43. Piralla A, Baldanti F, Gerna G. Phylogenetic Patterns of Human Respiratory Picornavirus Species, Including the Newly Identified Group C Rhinoviruses, during a 1-Year Surveillance of a Hospitalized Patient Population in Italy. *J Clin Microbiol* 2011; 49(1): 373–6.
 44. Puthavathana P, Habanananda S, Toncharoensook R, Kositanont U, Wasi C. Serological response to respiratory syncytial virus infection in pediatric patients with a comparison to immunofluorescence and virus isolation. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1995; (13):37 – 41.
 45. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virolog.* 2007; 81: 3051–7.
 46. Regamey N, Kaiser L, Roiha HL, Deffernez C, Kuehni CE, Latzin P, Aebi C, Frey U; Swiss Paediatric Respiratory Research Group. Viral etiology of acute respiratory infections with cough in infancy: a community-based birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27(2):100-5.
 47. Rhedin S, Lindstrand A, Rotzén-Östlund M, Tolfvenstam T, Ohrmalm L, Rinder MR, Zweyberg-Wirgart B, Ortqvist A, Henriques-Normark B, Broliden K, Naucler P. Clinical utility of PCR for common viruses in acute respiratory illness. *Pediatrics.* 2014; 133(3):e538-45. doi: 10.1542/peds.2013-3042.
 48. Rohde GGU. The role of viruses in CAP. *Eur Respir Monogr.* 2014; 63:74-87.
 49. Schroth MK, Grimm E, Frindt P, Galagan DM, Konno SI, Love R, Gern JE. Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20:1220–8.
 50. Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ, Fischer-Langley G. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among infants and young children in the United States, 1997–2006. *Ped Infect Dis J* 2012;31:5–9.
 51. Tai CF, Lu CY, Shao PL et al. Rapid-test sensitivity for novel swine-origin pandemic influenza A. *J Formos Med Assoc.* 2012; 111(8):427-30.
 52. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006; 30:760-73.

53. Vaz-de-Lima LRA, Souza MCO, Matsumoto TK, Hong MA, Salgado MM, Barbosa ML, Sato NS, Requejo HI, Oliveira CAF, Pecchini R, Berezin E, Passos SD, Schvartsman C, Pasmanick A, Durigon EL, Ueda M. Performance of indirect immunofluorescence assay, immunochromatography assay and reverse transcription-polymerase chain reaction for detecting human respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirate samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 5(103):463–7.
54. Weinberg GA, Hall CB, Poehling KA, Edwards KM, Iwane MK, Bridges CB, Staat MA, Griffin MR, Szilagyi PG. Parainfluenza virus infection of young children: population-based burden of hospitalization. *Journal of Pediatrics* 2009; 154:694-9.
55. Williams JV, Edwards KM, Weinberg GA, Griffin MR, Hall CB, Zhu Y, Szilagyi PG, Wang CK, Yang C-F, Silva D, Ye D, Spaete RR, Crowe JE Jr. Population-based incidence of human metapneumovirus infection among hospitalized children. *J Infect Dis*. 2010; 201(12): 1890-8.
56. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*. 2004; 350: 443–50.
57. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol*. 2005; 79:884-95.
58. Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swingler G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet*. 2005; 365:130–4.

Приложение 1

Организация лабораторных помещений

Набор последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон (помещений) или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений, количество которых определяется используемыми МАНК.

Рабочая зона 1 - приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала, в которой осуществляют прием материала, его маркировку, регистрацию в специальном журнале, первичную подготовку (концентрирование материала путем центрифугирования, фильтрации, суспендирование и т.д.), объединение или разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала.

Рабочая зона 2 – для выделения (экстракции) нуклеиновых кислот, в которой проводят экстракцию и очистку нуклеиновых кислот микроорганизмов из проб, подготовленных в Рабочей зоне 1.

Рабочая зона 3 - для проведения реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридационно – флуоресцентного метода детекции, где осуществляют приготовление реакционных смесей, проведение обратной транскрипции, амплификации нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридационно – флуоресцентного метода детекции. Рекомендуется разделить Рабочую зону 3 на две подзоны (3а и 3б) и разместить их в отдельных помещениях. В подзоне 3а осуществляют приготовление реакционных смесей и проведение обратной транскрипции. В подзоне 3б проводят амплификацию нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридационно – флуоресцентного метода детекции.

Рабочая зона 4 - учета результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза.

Приложение 2

Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения исследования в соответствии с этапами проведения анализа.

Рабочая зона 1

1. Бокс биологической безопасности III класса защиты или бокс биологической безопасности II класса защиты.
2. Центрифуга для пробирок объемом 5-100 мл до 3 тыс. об/мин.
3. Микроцентрифуга / вортекс.
4. Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл до 10000g.
5. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25– 100 °С.
6. Термостатируемый шейкер для пробирок.
7. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл или 2,0 мл.

9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.
10. Штативы для наконечников, микропробирок объемом 1,5 мл.
11. Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и не выше минус 16 °С (для хранения исследуемого материала). Возможно, отдельное использование холодильника с камерой поддерживающей температуру от 2 до 8 °С и морозильника, с камерой поддерживающей температуру не выше минус 16 °С.
12. Морозильная камера поддерживающая температуру минус 70 °С (при необходимости, в случае длительного хранения материала).
13. Емкость с регламентируемым дезинфицирующим раствором.
14. Емкость с 70 % этиловым спиртом.

Рабочая зона 2

1. Бокс биологической безопасности II или III класса биологической защиты.
2. Микроцентрифуга / вортекс.
3. Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл до 10000g.
4. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25 - 100 °С.
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 2,0 мл.
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и до 1000 мкл.
10. Штативы для наконечников, микропробирок объемом 1,5 мл.
11. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и не выше минус 16 °С (для хранения наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот). Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С и морозильника, с камерой поддерживающей температуру не выше минус 16 °С.
12. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С (для хранения препаратов нуклеиновых кислот). Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот;
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
16. При исследовании материала, подозрительного на зараженность возбудителями III-IV групп патогенности, не образующими спор, допускается использование автоматизированного оборудования для выделения нуклеиновых кислот.

Рабочая зона 3

1. Бокс биологической безопасности II и III класса или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс).
2. Программируемые термоциклеры (персональные, многомодульные, с функцией амплификации в режиме «реального времени») и автоматизированные станции.

3. Выбор термоциклера или автоматизированной станции определяется методами амплификации нуклеиновых кислот и наборами реагентов, используемыми в лаборатории, характером выполняемых задач и финансовыми возможностями.
4. Флуориметр (флуоресцентный детектор) - только при использовании учета продуктов амплификации гибридационно – флуоресцентным методом детекции по конечной точке.
5. Микроцентрифуга / вортекс.
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
7. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0,5 (0,2) мл.
8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10 мкл, 100 мкл и 200 мкл, свободные от РНКаз.
9. Штативы для наконечников, микропробирок объемом 0,5 (0,2) мл.
10. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и от минус 18°С до минус 25 °С (для хранения наборов, предназначенных для проведения обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот). Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от минус 18°С до минус 25 °С.
11. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.
12. С целью автоматизации процедуры приготовления реакционных смесей для амплификации допускается использование автоматизированного оборудования для внесения (дозирования) реагентов.

Рабочая зона 4 (Для анализа продуктов амплификации методом электрофореза)

1. Камера для горизонтального электрофореза.
2. Источник постоянного тока с напряжением 150 - 460 В.
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.
4. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов.
5. Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в чистой зоне и предназначенным для анализа результатов электрофореза).
6. Аквадистиллятор.
7. Микроволновая печь или другой нагревательный прибор для плавления агарозы.
8. Колба коническая из термостойкого стекла объемом 250 мл для плавления агарозы.
9. Мерные цилиндры объемом 100 мл и 1000 мл.
10. Столик и набор гребенок для приготовления геля.
11. Штатив для микропробирок объемом 0,5 мл.
12. Отдельная автоматическая пипетка переменного объема до 100 мкл.
13. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл в штативе.
14. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С (для хранения наборов электрофоретической детекции).
15. Емкость с дезинфицирующим раствором для сброса отработанных расходных материалов.
16. Пластиковая емкость объемом 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

Приложение 3

Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала

1. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, 503CS01, COPAN, Италия). Используется для получения материала из носоглотки у детей и желательно, у взрослых.
2. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (например, 300202, Deltalab, Испания) - зонд для сбора мазков из ротоглотки; допустимо использовать для получения материала из носоглотки у взрослых.
3. Стерильный физиологический раствор хлорида натрия или транспортная среда, например «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Транспортную среду аликвотируют стерильным наконечником в стерильных условиях (в ламинарном боксе) в одноразовые стерильные пробирки из полипропилена по 0,5 мл (при использовании пробирок объемом 1,5-2 мл, например, МТС-200-С, Axigen, США).
4. Герметичные одноразовые полипропиленовые контейнеры для мокроты, аспиратов, БАЛ.
5. Вакуумные системы для получения аспиратов (например, фирмы “Blue Cross A-750” (Япония).
6. Небулайзер для проведения манипуляций с целью облегчения эвакуации мокроты
7. Контейнеры для фекалий (при диагностике тяжелых вирусных респираторных инфекций, вызванных коронавирусами).
8. Пробирки для получения плазмы крови (при диагностике тяжелых вирусных респираторных инфекций, вызванных коронавирусами).

Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала для ПЦР, предваряющей изоляцию культуры вируса

Рекомендуемые зонды:

1. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, 503CS01, COPAN, Италия). Используется для получения материала из носоглотки у детей и взрослых (желательно).
2. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (например, 300202, Deltalab, Испания) - зонд для сбора мазков из носоглотки у взрослых.

Рекомендуемые вирусологические среды:

1. Среда 199 с антибиотиками (Среда 199 на растворе Хенкса (500 мл) + 1 мл гентамицина + 5-10 мл бычьего сывороточного альбумина (BSA, fraction V, Sigma, A-8412) + 5-10 мл Хепес-буфера (Hepes buffer, Sigma, 194550)),
2. Вирусологическая транспортная среда BD (Бектон, Дикинсон энд Компани),
3. Вирусологическая транспортная среда Virocult «M40 Compliant», Sigma Virocult, в комплекте с зондом (Swab and virus transport medium for the collection and transportation of virus specimens),
4. Вирусологическая транспортная среда, например, COPAN UTC-330.

Предварительная обработка и подготовка биологического материала

Работы проводятся в соответствии с действующими документами: СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», методические указания МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки. Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции РНК отбирают 100 мкл образца.

Мокрота или аспират из трахеи. Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке реагентом «МУКОЛИЗИН». С целью снижения вязкости в емкость с мокротой добавляется равное количеству мокроты количество реагента «МУКОЛИЗИН». После инкубации при комнатной температуре до просветления мокроты (не более 20 минут) 100 мкл мокроты используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток обработанной мокроты замораживают.

Бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов. Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа оставшийся материал замораживают.

Секционный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

Предварительная обработка фекалий.

К образцу фекалий (объемом до 1,0 мл (по 0,4–1,0 г)) добавляют 4,0 мл физиологического раствора до образования 10-20% суспензии (фекалии водянистой консистенции могут использоваться без приготовления суспензии). Взвесь фекалий интенсивно встряхивают на вортексе до образования суспензии.

Полученную суспензию фекалий освещают одним из двух способов:

1. Центрифугирование суспензии фекалий 20 мин при 3 тыс. об/мин. Супернатант (осветленный экстракт фекалий) используют для экстракции РНК.
2. Проведение экспресс фильтрации суспензии фекалий. Для экспресс-фильтрации используют два наконечника объемом 1 мл (один с аэрозольным фильтром, другой – без фильтра) и полистироловую палочку с ватным наконечником (например, палочку для ушей). Предварительно следует подготовить систему фильтрации: от ватной палочки отрезается кончик с ватой, который вставляется в наконечник без аэрозольного фильтра и проталкивается с помощью другого чистого наконечника до упора в его суженную часть. Автоматической пипеткой объемом 1 мл с наконечником с аэрозольным фильтром забирается 0,5 мл фекальной суспензии, наконечник с суспензией плотно до упора вставляется в подготовленный наконечник с ватной вставкой. Фильтрация суспензии проводится из наконечника пипетки с фильтром через наконечник с ватной вставкой в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл под давлением поршня пипетки. В случае затруднений при фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию суспензии фекалий. Полученный фильтрат используют для экстракции РНК.

Допустимо хранение осветленного экстракта фекалий в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, и более длительно – при температуре не выше минус 16 °С. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Приложение 5

Методики экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов

Методика экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов с использованием сорбента на примере набора реагентов «АмплиСенс РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Порядок работы

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая пробирки для отрицательного и положительного контролей экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО (если он предусмотрен для проведения ПЦР-исследования). Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.
3. Внести в пробирки с раствором для лизиса и ВКО (если используется) по 100 мкл исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести 100 мкл ОКО, пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО (если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования).

5. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой 65 °С на 5 мин. Перемешать и затем осадить капли на вортексе.
 6. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.
 7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 12 тыс g (например, 13,4 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin , Eppendorf).
 8. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 9. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
 10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 12 тыс g.
 11. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 12. Аналогично провести одну отмывку 200 мкл раствора для отмывки 4.
 13. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка.
 14. Добавить в пробирки по 50 мкл буфера для элюции (РНК-буфера) и перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой 65 °С на 5 мин, периодически перемешивая на вортексе. Допускается увеличение объема элюции до 120 мкл (см. инструкцию к используемому набору реагентов для амплификации).
 15. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 12 тыс g. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и/или ПЦР.
- Очищенная НК может храниться при температуре от 2 до 8 °С до 4 ч, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение недели и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. С целью хранения необходимо, не захватывая осадок, перенести надосадочную жидкость (содержащую НК) в стерильную пробирку.

Методика экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов с использованием сорбента на примере набора реагентов «АмплиСенс РИБО-сорб» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Порядок работы

1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО (если он предусмотрен для проведения ПЦР-исследования). Добавить в пробирки по 450 мкл лизирующего раствора. Промаркировать пробирки.
3. Внести в пробирки с лизирующим раствором и ВКО (если используется) по 100 мкл исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. Перемешать пипетированием. Инкубировать при комнатной температуре 3 мин.
4. В пробирку, содержащую отрицательный контроль (ОК) экстракции внести 100 мкл ОКО, в пробирку содержащую положительный контроль (ПК) экстракции внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО (если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования).
5. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе. Осадить капли на вортексе. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), центрифугировать на микроцентрифуге в течение 1 мин при 7 тыс g (например, 10 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin , Eppendorf) и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новые пробирки.
6. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин. Перемешать и затем осадить капли вортексе.
7. Ресуспендировать сорбент, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента, плотно закрыть крышки. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 7 тыс g.
9. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
10. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 1, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.
11. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 30 с при 7 тыс g.
12. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
13. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.
14. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 30 с при 7 тыс g.
15. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
16. Повторить процедуру отмывки раствором для отмывки 3, следуя пп. 13-15.
17. Аналогично провести одну отмывку 400 мкл раствора для отмывки 4.

18. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента.
19. Добавить в пробирки по 50 мкл буфера для элюции (РНК-буфера). Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 60 °С на 5 мин. Допускается увеличение объема элюции до 120 мкл (см. инструкцию к используемому набору реагентов для амплификации).
20. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 2 мин при 12 тыс g (например, 13,4 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin , Eppendorf). Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и/или ПЦР.

Реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения ДНК / РНК-пробы. Для этого необходимо после проведения подготовки реакции ОТ или ОТ-ПЦР центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 2 мин при 12 тыс g и очень осторожно, не захватывая сорбент, внести РНК в реакцию. Внесение проб РНК в реакцию необходимо провести незамедлительно после центрифугирования. В случае если в течение 3 минут после центрифугирования проба РНК не внесена в реакцию, необходимо провести повторное центрифугирование данной пробы.

Очищенная НК может храниться при температуре от 2 до 8 °С до 4 ч, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение недели и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для этого необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

Приложение 6

Методика проведения реакции обратной транскрипции на примере набора реагентов «АмплиСенс РЕВЕРТА-L», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Каждой аликвоты реагентов из комплекта достаточно для приготовления реакционной смеси на 12 реакций. Стандартный конечный объем реакции – 20 мкл, объем РНК-пробы – 10 мкл. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК разводят буфером в 2 раза, то есть для ПЦР будет подготовлено 40 мкл, для 4 реакций ПЦР.

При необходимости проведения большего количества ПЦР-реакций, рекомендуется увеличить объем реакции ОТ и всех реагентов в 2 раза: конечный объем реакции – 40 мкл, объем РНК-пробы – 20 мкл (то есть из аликвоты реагентов комплекта для ОТ нужно приготовить реакционную смесь на 6 реакций).

Перед работой компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением реакции обратной транскрипции.

Порядок работы:

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 0,2 (0,5) мл.
2. Приготовить реакционную смесь для 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix внести 5 мкл RT-G-mix-1, тщательно перемешать и осадить капли на вортексе.

3. К полученному раствору добавить 6 мкл ревертазы (MMIv), пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли на вортексе.
Следует иметь в виду, что Ревертаза (MMIv) термочувствительна, в связи с чем, ее нельзя оставлять при комнатной температуре в течение длительного времени.
 4. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл приготовленной реакционной смеси.
 5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл РНК-пробы, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. Осторожно перемешать пипетированием. Промаркировать пробирки.
 6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 37 °С на 30 мин.
 7. Для последующей постановки ПЦР полученную в реакции обратной транскрипции кДНК развести в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником с фильтром добавить 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).
- Готовый препарат кДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

Приложение 7

Методики проведения ПЦР с различными форматами детекции фрагментов амплификации

ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (ПЦР-смесь-FL раскапана под воск)

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-буфера-А, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-FL.
3. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл К-.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл К+.
 - в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ОКО.
 - г) положительный контроль экстракции (ПК, если используется в наборе реагентов) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ПКО.

А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплектов

реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Разморозить необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-FL, ПЦР-буфером-В и полимеразой (TaqF) и осадить капли кратковременным центрифугированием (1–2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке $10 \cdot (N+1)$ мкл ПЦР-смеси-FL, $5 \cdot (N+1)$ мкл ПЦР-буфера-В, и $0,5 \cdot (N+1)$ мкл полимеразы (TaqF). (Расчетную таблицу приготовления реакционных смесей см. в приложении 1).
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по 15 мкл подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл К–.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл К+.
 - в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ОКО.
 - г) положительный контроль экстракции (ПК, если используется в наборе реагентов) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ПКО.
- Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»
 4. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения амплификации и детекции флуоресцентного сигнала в соответствии с инструкцией к набору реагентов, учитывая рекомендованные каналы для флуорофоров.
 5. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Перед установкой в амплификатор планшетного типа необходимо осадить капли со стенок пробирок кратковременным (1–3 с) центрифугированием на центрифуге/вортексе.
 6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
 7. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

Анализ, интерпретация и выдача результатов исследования

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Согласно инструкции производителя наборов реагентов устанавливают все необходимые настройки параметров, включая уровень пороговой линии, устранение выбросов (если предусмотрено) и другие, указанные для конкретного набора реагентов. Положительным считают образец, в котором кривая флуоресценции пересекает установленную на соответствующем уровне пороговую линию, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов по определенному каналу детекции. При этом кривая флуоресценции данной

пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. В случае, если экспоненциальный подъем не очевиден (линия флуоресценции похожа на прямую линию) следует проанализировать необработанные (сырые) данные. Если в сырых данных экспоненциальный подъем флуоресценции отсутствует, результат этой пробы считать отрицательным.

В ходе интерпретации результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- НК искомого возбудителя обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для соответствующего флуорофора определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение.
- НК искомого возбудителя не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для соответствующего флуорофора не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t , а значение порогового цикла C_t по каналу для детекции ВКО не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение.
- Результат анализа невалидный, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по каналу для детекции НК возбудителя, и по каналу для детекции ВКО значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК. При повторении результатов рекомендовать повторный сбор материала для анализа.
- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы значение порогового цикла C_t по каналу для детекции НК возбудителя превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение, а значение порогового цикла C_t по каналу для детекции ВКО не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК. При повторении результатов или получении значения порогового цикла C_t по каналам для детекции НК возбудителя менее граничного, образец считать положительным.

Граничные значения C_t указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. Подробная информация по программированию приборов, анализу и интерпретации результатов также указана в методических рекомендациях по применению конкретного набора реагентов.

По значению C_t , полученного для исследуемого образца, можно косвенно судить о количестве НК возбудителя в пробе: чем меньше значение C_t , тем больше НК в исследуемой пробе, и наоборот. То есть, если значение C_t в исследуемом образце равно или меньше, чем значение C_t для K^+ по данному каналу детекции, можно считать, что количество НК возбудителя большое; если значение C_t в исследуемом образце больше, чем значение C_t для K^+ по данному каналу детекции, можно считать, что количество НК возбудителя небольшое; если кривая флуоресценции пересекает пороговую линию на последних циклах амплификации – в пробе содержатся следовые количества НК возбудителя.

Результаты исследования регистрируют в лаборатории в рабочем журнале (в бумажной или электронной форме) и в унифицированной форме бланка выдачи результатов. Бланк должен содержать название лаборатории и медицинский организации, информацию о пациенте, достаточную для его идентификации, название биологического материала и всех исследуемых показателей, дату проведения исследования, результаты исследования, фамилию подпись сотрудника, выполнившего исследование.

ПЦР с детекцией флуоресценции продуктов амплификации в формате «по конечной точке»

Выбор диаметра пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора. Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (ПЦР-смесь-FL раскапана под воск).

Данный этап отличается от варианта амплификации с детекцией в режиме «реального времени» только подготовкой к амплификации двух дополнительных пробирок с образцом «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью-1-FL на поверхность застывшего воска вносится необходимое количество ПЦР-смеси-Фон, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесь-1-FL .

Во все пробирки сверху добавляется по одной капле минерального масла для ПЦР.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «по конечной точке».

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования/ амплификации.
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Детекция флуоресценции продуктов амплификации по «конечной точке»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по указанным в инструкции к набору реагентов каналам. Предварительно в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки, как правило, указанные в инструкции, вкладыше, а также в методических рекомендациях по применению набора реагентов.

Интерпретация результатов

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб кДНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип интерпретации результатов следующий:

- НК возбудителя обнаружена, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу детекции, выше установленного порогового значения положительного результата.
- НК возбудителя не обнаружена, если для данной пробы сигнал по

соответствующему каналу детекции ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу ВКО выше установленного порогового значения.

- Результат анализа невалидный, если для данной пробы сигнал по каналу детекции возбудителя ниже установленного порогового значения отрицательного результата и сигнал по каналу ВКО ниже установленного порогового значения. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца с этапа экстракции НК. При повторении результатов рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы сигнал по каналу детекции возбудителя выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями). В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК. При повторении результатов считать образец положительным.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для всех положительных и отрицательных контролей.

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналу детекции возбудителя ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена НК возбудителя, соответствующего данному флуорофору.
2. Если для отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу детекции возбудителя выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена НК возбудителя, соответствующего данному флуорофору, начиная с этапа экстракции НК.

ПЦР с детекцией продуктов амплификации ДНК методом электрофореза

ПЦР-амплификация проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации. Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Таq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-R для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска раскатать по 10 мкл ПЦР-смеси-2, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-R.
3. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Б. Проведение амплификации.

1. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.

2. подготовить контрольные пробы для реакции амплификации:

а) отрицательный контроль (К-) – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.

б) положительный контроль (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО.

3. Запустить на амплификаторе нужную программу. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

4. После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР-амплификации (ЗОНУ 3).

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °С (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

Проведение электрофореза для детекции продуктов амплификации ДНК

Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в изолированной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в других зонах ПЦР-лаборатории.

Приготовление рабочих растворов и геля агарозы.

1. Приготовить рабочий буфер для электрофореза. В мерный цилиндр влить 25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ), концентрированного с бромидом этидия, довести дистиллированной водой до 500 мл, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

Следует помнить, что бромид этидия – канцерогенное вещество, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые; при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой. Все реагенты, содержащие бромид этидия, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке.

2. Навеску агарозы соответствующую ожидаемой концентрации геля, пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла объемом 250 мл. Налить 100 мл рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.

3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см (форма 1 или 2) или 5 см (форма 3 или 4) друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду (ДНК будет двигаться к положительному). Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера так, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Порядок внесения образцов – продуктов амплификации ПЦР - в гель.

1. Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла по 10–15 мкл проб и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В каждом ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен К⁺ и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК (с комплектом не поставляется).

2. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), включить источник. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон») и источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин (форма 1 или 2), 40 мин (форма 3 или 4). Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.

3. По завершении времени электрофореза (краситель ксиленцианол при этом пройдет примерно половину длины геля – 1,5 см (форма 1 или 2), 2,5 см (форма 3 или 4); краситель крезоловый красный – примерно 2/3 длины геля – 2 см (форма 1 или 2), 3,5 см (форма 3 или 4)), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

Следует иметь в виду, что при просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

Учет результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения нуклеиновых кислот. Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК, соответствующих по размеру (находящихся на одном уровне) положительным контрольным пробам. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К-) и в дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа выделения (ОК), не должно быть никаких полос, за исключением димеров праймеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.

Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне положительного контроля большей или меньшей интенсивности независимо от наличия полосы внутреннего контроля. Полоса внутреннего контроля может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией ДНК обнаруженного возбудителя. Отрицательными считаются образцы, которые содержат только полосу на уровне внутреннего контроля, и не содержат полосы на уровне положительного контроля амплификации искомого возбудителя.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа контрольных точек не совпадают с указанными в инструкции к набору реагентов, то соответствующий этап анализа следует переделать.
2. Если в дорожке какой-либо из исследуемых проб отсутствуют обе полосы, соответствующие искомому возбудителю и ВКО. Результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой пробы с самого начала. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки биологического материала, приведшая к потере ДНК или ингибированию ПЦР. Если результат повторного тестирования повторяется, необходимо провести повторный забор материала.
3. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
4. Если в отрицательном контроле (ОК, К-) выявляется специфическая полоса на уровне К+, значит, произошла контаминация реактивов или проб. Требуется повторить анализ проб с первого этапа проведения анализа (выделение ДНК из исследуемого материала), а также принять меры по выявлению источника контаминации.

Порядок обеззараживания отработанных реагентов

Первый способ.

Необходимые реагенты для обработки 1 литра буфера и гелей:

1. 0,5 М перманганат калия – 1 л,
2. 2,5 М соляная кислота – 1 л,
3. 2,5 М NaOH – 1 л.

Порядок работы:

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость объемом 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 ч. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

Второй способ.

Необходимые реагенты:

1. Стеклопластиковая колонка емкостью на 1 – 2 л.
2. Активированный уголь.

Порядок работы:

Заполнить колонку активированным углем и пропускать отработанный буфер через нее небольшими порциями. Дезактивированный раствор можно сливать в канализацию. Гели дезактивировать первым способом.

При хранении трис-боратного буфера (ТБЕ), концентрированного с бромидом этидия возможно выпадение осадка соли борной кислоты, не влияющее на качество реактива.

Если в концентрированном буфере имеется осадок, то следует готовить рабочий раствор (согласно инструкции к комплекту реагентов), который затем прогревают при помешивании каждые 10-15 мин в кипящей водяной бане в течение 30 мин до растворения осадка. Не допускать попадания нерастворенных частиц борной кислоты в агарозный гель.

Порядок проведения контроля загрязнения лаборатории продуктами амплификации

1. Подготовить пробирки с ТЕ-буфером или деионизованной водой (внести по 300 мкл в микропробирки объемом 1,5 мл в стерильных условиях)
2. Контрольные точки, с поверхности которых производятся смывы:
 1. Ручки холодильников,
 2. Рукоятки ламинарных шкафов,
 3. Поверхность вортекса,
 4. Рукоятки пипеток в зоне ПЦР,
 5. Поверхность термостата,
 6. Рукоятки пипеток в зоне выделения НК,
 7. Ручки двери,
 8. Корпус и блоки приборов для ПЦР,
 9. Клавиатура компьютеров,
 10. Телефон (если имеется в рабочих зонах).

3. Промаркировать пробирки соответственно контрольным точкам.

Технология взятия смывов:

1. надеть перчатки, протереть их салфеткой, смоченной 70% этиловым спиртом;
2. зонд с ватным тампоном (например, гигиенический тампон для ушей) смочить в подготовленной пробирке с ТЕ-буфером (деионизованной водой);
3. вращательными движениями протереть поверхности объекта соответственно контрольным точкам;
4. после взятия смыва зонд поместить в микропробирки с ТЕ-буфером (деионизованной водой), вращать в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удалить зонд в емкость для сброса;
5. для взятия смывов с каждой новой контрольной точки использовать отдельный зонд.
6. Провести постановку ПЦР (без экстракции и обратной транскрипции) с набором реагентов, контаминация которого фрагментами амплификации контролируется в данный момент. Работать по инструкции к данному набору реагентов.

Постановка ПЦР:

1. подготовить необходимое количество микропробирок для ПЦР, включая отрицательный (К-) и положительный (К+) контроля этапа ПЦР;
2. в качестве положительного контроля этапа ПЦР (К+) необходимо использовать соответствующий ПКО для контролируемого набора реагентов;
3. для постановки отрицательного контроля этапа ПЦР (К-) использовать ТЕ-буфер (деионизованную воду), который был использован в качестве среды для смывов;

Поверхности контрольных точек, где выявлены положительные результаты ПЦР-анализа смывов, подвергаются обработке раствором, содержащим активный хлор (например, раствором «Хлормисепт люкс» (ООО «Полисепт», Россия) 0,1% по активному хлору) с последующей экспозицией 30 мин и тщательным удалением дезинфицирующего раствора водопроводной водой.

После этого проводятся повторные смывы. Следует принимать во внимание, что можно обрабатывать только поверхности, выдерживающие подобную обработку.

Формы критериев оценки качества медицинской помощи по группам заболеваний или состояний

Группа заболеваний или состояний __ Гripp с пневмонией, Пневмония, Инфекция нижних дыхательных путей _____

Код/коды по МКБ-10 _J10-J18, J20-J22, J40_____

Формы, виды и условия оказания медицинской помощи:

- лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции с целью определения НК вирусов гриппа А, В, С, респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, аденовируса, вирусов парагриппа 1-4, бокавируса, коронавирусов (NL63, HKUI, E229, OC43), риновирусов, при заболевании детей _____

- лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции с целью определения НК вирусов гриппа А, В, С, респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, аденовируса, вирусов парагриппа 1-4, коронавирусов (NL63, HKUI, E229, OC43), риновирусов, при заболевании взрослых _____

- лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции с целью определения НК высокопатогенных для человека вирусов животных (высокопатогенные вирусы гриппа птиц, SARS-cov, MERS-cov и др.), по эпидемическим показаниям _____

1. Событийные (смысловые, содержательные, процессные) критерии качества

- Направлен на исследование следующий биологический материал: мокрота (при глубоком откашливании или откашливаемая после индукции ингаляцией стерильного 5% раствора натрия хлорида через небулайзер) _____ да или нет

- Направлен на исследование следующий биологический материал: эндотрахеальный аспират, получаемый с помощью хирургического (вакуумного или электрического) отсоса, при отсутствии мокроты _____ да или нет

- Направлен на исследование следующий биологический материал: БАЛ, получаемый с помощью фибробронхоскопии, по показаниям _____ да или нет

- Направлен на исследование следующий дополнительный биологический материал: плазма крови, фекалии, при подозрении на SARS-cov, MERS-cov _____ да или нет

2. Временные критерии качества

- Биологический материал собран и направлен на лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции _не позже _6 часов_ с момента_ обращения пациента за медицинской помощью _____ да или нет

- Биологический материал собран и направлен на лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции _не позже _1 часа_ с момента_ обращения пациента за медицинской помощью, при подозрении на SARS-cov, MERS-cov _____ да или нет

- Специфическая противовирусная терапия назначена _не позже _одного часа_ с_ момента сообщения о положительном результате ПЦР-исследования на наличие НК возбудителей гриппа и ОРВИ и высокопатогенных для человека вирусов животных __ да или нет

3. Результативные критерии качества - После начала приема специфической противовирусной терапии наблюдалась положительная динамика состояния пациента _ да или нет

Группа заболеваний или состояний __ Плевральный выпот _____

Код/коды по МКБ-10 _J90 _____

Формы, виды и условия оказания медицинской помощи:

- лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции с целью определения НК вирусов гриппа А, В, С, респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, аденовируса, вирусов парагриппа 1-4, бокавируса, коронавирусов (NL63, HKUI, E229, OC43), риновирусов, при заболевании детей _____

- лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции с целью определения НК вирусов гриппа А, В, С, респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, аденовируса, вирусов парагриппа 1-4, коронавирусов (NL63, HKUI, E229, OC43), риновирусов, при заболевании взрослых _____

- лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции с целью определения НК высокопатогенных для человека вирусов животных (высокопатогенные вирусы гриппа птиц, SARS-cov, MERS-cov и др.), по эпидемическим показаниям _____

1. Событийные (смысловые, содержательные, процессные) критерии качества

- Направлен на исследование следующий биологический материал: плевральная жидкость _____ да или нет

2. Временные критерии качества

- Биологический материал собран и направлен на лабораторное исследование методом полимеразной цепной реакции _не позже _6 часов_ с момента_ обращения пациента за медицинской помощью _____ да или нет

- Специфическая противовирусная терапия назначена _не позже _одного часа_ с момента сообщения о положительном результате ПЦР-исследования на наличие НК возбудителей гриппа и ОРВИ и высокопатогенных для человека вирусов животных __ да или нет

3. Результативные критерии качества

- После начала приема специфической противовирусной терапии наблюдалась положительная динамика состояния пациента _ да или нет