

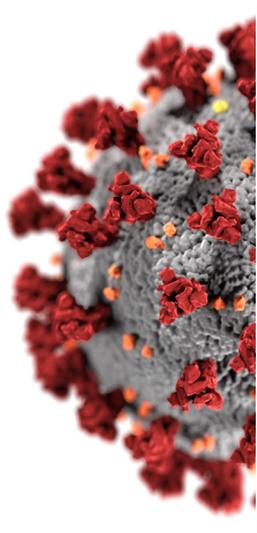


"ФЕДЕРАЦИЯ
ЛАБОРАТОРНОЙ
МЕДИЦИНЫ"



«РОССИЙСКОЕ
ОБЩЕСТВО
ФТИЗИАТРОВ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ



ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID 19)

Москва-2021

Ассоциация специалистов
и организаций лабораторной службы
ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ
Общероссийская общественная организация
«РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ФТИЗИАТРОВ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

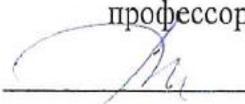
**ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НОВОЙ
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID 19)**

Москва, 2021

УТВЕРЖДАЮ

Президент Ассоциации специалистов и
организаций лабораторной службы
«ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ
МЕДИЦИНЫ»

профессор, д.м.н.

 /М.А. Годков/

« 16 » мая 2021

УТВЕРЖДАЮ

Президент Общероссийской общественной
организации «РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО
ФТИЗИАТРОВ»/Ассоциации фтизиатров

профессор, д.м.н.

 /И.А. Васильева/

« 21 » мая 2021

Методические рекомендации

Этиологическая диагностика новой коронавирусной инфекции (COVID 19)

Год утверждения

2021

Разработчики методических
рекомендаций

- Ассоциация «Федерация лабораторной медицины»
- Общероссийская общественная организация «Российское общество фтизиатров»

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящие рекомендации относятся к организации лабораторной этиологической диагностики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) методами амплификации нуклеиновых кислот (выявление РНК SARS-CoV-2) и иммунохимическими методами (выявление антигенов SARS-CoV-2 и антител к ним) для специалистов лабораторий, проводящих микробиологические и клинико-диагностические исследования.

Рецензенты:

Иванов А.М.

Заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Главный специалист клинической лабораторной диагностики Минобороны России, Вице-президент Ассоциации «Федерация лабораторной медицины», д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН

Львов Д.К.

Главный научный сотрудник, заведующий отделом экологии вирусов, подразделения «Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского» ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России д.м.н., профессор, академик РАН

Нетёсов С.В.

Заведующий лабораторией биотехнологии и вирусологии Факультета естественных наук ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет» д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

COVID-19 – заболевание, вызванное SARS-CoV-2

Ct (cycle threshold) – пороговое число циклов ПЦР, число циклов ПЦР, при котором флуоресценция превышает пороговое значение. При выявлении РНК SARS-CoV-2 чем выше значение Ct, тем ниже вирусная нагрузка в образце

HCoV – коронавирусы, вызывающие заболевания человека (англ. Human coronaviruses)

LAMP – метод изотермальной амплификации ДНК (англ. Loop Mediated Amplification)

ОТ-LAMP – метод изотермальной амплификации ДНК с обратной транскрипцией (англ. RT-LAMP, reverse transcription LAMP)

MERS – ближневосточный респираторный синдром (англ. Middle East respiratory syndrome)

RDT - Rapid Diagnostic Test, иммунохроматографический тест, быстрый тест, экспресс-тест

АГ SARS-CoV-2 – антигены SARS-CoV-2

АТ к SARS-CoV-2 – антитела к SARS-CoV-2

АПФ-2 – ангиотензин превращающий фермент 2

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

ВКО – образцы для внутрилабораторного контроля качества

ВОК – внешняя оценка качества с применением контрольных образцов

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИХ – иммунохроматография, быстрый, экспресс-тест

ИХЛА – иммунохемлюминесцентный анализ

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КПАВ - катионные поверхностно-активные вещества

МАНК – методы амплификации нуклеиновых кислот, включая методы полимеразной

цепной реакции и изотермальной амплификации с обратной транскрипцией

МПА - мегаПаскали

ОКО – отрицательный контрольный образец

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ОТ-ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией

ПБА – патогенные биологические агенты: патогенные для человека микроорганизмы и гельминты, а также любые объекты и материалы, включая полевой, клинический, секционный, подозрительные на содержание указанных ПБА

ПКО – положительный контрольный образец

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-КТ – полимеразная цепная реакция с регистрацией результата по конечной точке

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТОРС – тяжелый острый респираторный синдром (атипичная пневмония), вызываемый SARS-CoV – заболевание, вспышка которого зарегистрирована в нескольких странах в 2002-2004 гг.

ПБА – патогенный биологический агент

СИЗ – средства индивидуальной защиты

СИЗОД – средства индивидуальной защиты органов дыхания

СОП – стандартные операционные процедуры

ТЕ буфер – буферный раствор, содержащий ТРИС (гидроксиметил трисаминометан – $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) и ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), хелатирующего катионы металлов.

ФСВОК – федеральная система внешней оценки качества клинических лабораторных исследований

ЭХЛА – электрохемлюминесцентный иммуноанализ

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ.....	14
1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ И ПАТОГЕНЕЗ COVID-19	16
2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19	20
2.1. Требования к допуску медицинских организаций к проведению исследований и порядку информирования при получении положительных результатов	20
2.2. Требования к помещениям и оборудованию, используемым для этиологической диагностики COVID-19	21
2.2.1. Общие требования к помещениям и оборудованию, используемым для этиологической диагностики COVID-19	21
2.2.2. Дополнительные требования к помещениям и оборудованию для проведения этиологической диагностики COVID-19 с использованием МАНК.....	21
2.2.3. Дополнительные требования к помещениям и оборудованию используемым для этиологической диагностики COVID-19 с использованием иммунохимических методов определения антигена SARS-CoV-2	22
2.3. Правила проведения работ по этиологической диагностике COVID-19	22
2.3.1. Общие правила проведения работ по этиологической диагностике COVID-19	22
2.3.2. Дополнительные правила проведения работ по этиологической диагностике COVID-19 с применением МАНК.....	24
2.3.2. Дополнительные правила проведения работ по этиологической диагностике COVID-19 с применением иммунохимических методов определения антигена SARS-CoV-2.....	25
2.4. Требования к персоналу лаборатории, участвующему в диагностике COVID-19	25
3. ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19	28
3.1. Административные меры обеспечения биологической безопасности при проведении исследований для диагностики COVID-19.....	28
3.2 Инженерные меры обеспечения биологической безопасности при проведении исследований для диагностики COVID-19.....	29
3.3. Средства индивидуальной защиты при проведении этиологической диагностики COVID-19	29
3.4 Обработка помещений и обеззараживание материалов	30
4. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19	32
5. ВЫБОР ТЕСТ-СИСТЕМ/НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19	34

6. ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19	38
6.1. Преаналитический этап.....	38
6.1.1. Показания к назначению исследования для этиологической диагностики COVID-19. Направление на исследование	38
6.1.2. Биологический материал для исследования.....	41
6.1.3. Упаковка, маркировка и транспортировка биологических образцов.....	42
6.1.4. Прием образцов для исследований в лаборатории, их оценка, выбраковка и регистрация.....	44
6.1.5. Документы преаналитического этапа	45
6.1.6. Особенности преаналитического этапа исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот и антигенов SARS-CoV-2 иммунохимическими методами. Предварительная обработка образцов.....	45
6.1.7. Особенности преаналитического этапа исследования по выявлению антител к SARS-CoV-2 иммунохимическими методами. Предварительная обработка образцов	45
6.2. Аналитический этап	46
6.2.1. Аналитический этап исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот	46
6.2.1.1. Общее описание методов амплификации нуклеиновых кислот	46
6.2.1.2. Выделение РНК	47
6.2.1.3. Обратная транскрипция и амплификация нуклеиновых кислот.....	47
6.2.1.4. Контроль качества лабораторных исследований по выявлению РНК SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот.....	47
6.2.2. Аналитический этап иммунохимических методов, применяемых для диагностики COVID-19	49
6.2.2.1. Общее описание иммунохимических методов, применяемых для диагностики COVID-19.....	49
6.2.2.2. Аналитический этап определения антигенов SARS-CoV-2	49
6.2.2.3. Аналитический этап определения антител к SARS-CoV-2	50
6.3. Постаналитический этап.....	51
6.3.1. Общие требования к выполнению постаналитического этапа.....	51
6.3.2. Постаналитический этап МАНК.....	52
6.3.3. Постаналитический этап иммунохимических методов исследований.....	52
7. НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ	54
8. РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	57
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.	
Инструкция по поиску тест-систем/наборов реагентов для этиологической диагностики COVID-19	60

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения ПЦР-РВ исследования SARS CoV2, в соответствии с этапами проведения анализа ...62

ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

Порядок проведения контроля загрязнения лаборатории продуктами амплификации..... 64

ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

Техника взятия биологических материалов и условия их хранения 65

ПРИЛОЖЕНИЕ 5.

Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала.70

ПРИЛОЖЕНИЕ 6.

Предварительная обработка биологического материала71

ПРИЛОЖЕНИЕ 7.

Примеры направления на исследование для этиологической диагностики COVID-19 72

ПРИЛОЖЕНИЕ 8.

Форма сопроводительного листа для передачи биологических образцов в лабораторию74

ПРИЛОЖЕНИЕ 9.

Пример акта приема-передачи биологических образцов.....75

ПРИЛОЖЕНИЕ 10.

Пример журнала выбраковки образцов76

ПРИЛОЖЕНИЕ 11.

Пример журнала регистрации поступивших в лабораторию тест-систем/ наборов реагентов78

ПРИЛОЖЕНИЕ 12.

Примерная форма лабораторного журнала регистрации результатов исследования биологического материала на SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ 79

ПРИЛОЖЕНИЕ 13.

Примерная форма лабораторного журнала регистрации результатов определения антител к SARS-CoV-2 в биологическом материале..... 82

ПРИЛОЖЕНИЕ 14.

Примерная форма лабораторного журнала регистрации результатов определения антигенов SARS-CoV-2 в биологическом материале.....	85
---	----

ПРИЛОЖЕНИЕ 15.

Пример описания стандартной операционной процедуры «Ручное выделение РНК SARS-CoV2»	88
---	----

1. Цели.....	89
2. Обозначения, сокращения, символы	89
Требования к персоналу	90
3.1. Медицинские требования.....	90
3.2. Образование и обучение (инструктаж).....	90
3.3. Дополнительные требования	91
4. Описание.....	91
4.1. Клинические показания	91
4.2. Материал.....	91
4.3. Оборудование	91
4.4. Принцип метода	91
4.5. Реагенты и расходные материалы:	91
4.6. Подготовка наборов реагентов	92
4.7. Контроли.....	92
4.8. Обработка образцов.....	93
4.8.1. Обработка образцов мазков рото- и носоглотки из транспортной среды	93
4.8.2. Обработка образцов из сухих мазков рото- и носоглотки	93
4.8.3. Обработка образца из мокроты и бронхоальвеолярного лаважа	93
4.9. Выделение НК:.....	93
4.10. Уборка рабочего места и утилизация отходов	94
5. Связанные документы	95
6. Распределение экземпляров СОП	95

ПРИЛОЖЕНИЕ 16.

Пример описания стандартной операционной процедуры «Выявление РНК SARS-CoV2 методом ПЦР»	96
--	----

1. Цели.....	97
2. Обозначения, сокращения, символы	98
3. Требования к персоналу	98
3.1. Медицинские требования.....	98
3.2. Образование и обучение (инструктаж).....	98
3.3. Дополнительные требования	99

4. Описание.....	99
4.1. Клинические показания	99
4.2. Материал.....	99
4.3. Оборудование	99
4.4. Принцип метода	99
4.5. Реагенты и расходные материалы:	100
4.6. Подготовка наборов реагентов	100
4.7. Проведение анализа.....	100
4.8 Анализ и учет результатов	101
4.8.1. Условия анализа и учета результатов	101
4.8.2. Учет результатов.....	101
4.8.3 Уборка рабочего места и утилизация отходов.....	102
5. Связанные документы	102
6. Распределение экземпляров СОП	103

ПРИЛОЖЕНИЕ 17.

Пример описания стандартной операционной процедуры «Выявление антигенов SARS-CoV2 иммунохимическими методами»	104
2. Обозначения, сокращения, символы.....	105
3. Требования к персоналу	105
3.1. Медицинские требования.....	105
3.2. Образование и обучение (инструктаж).....	106
3.3. Дополнительные требования	106
4. Описание.....	106
4.1. Клинические показания	106
4.2. Материал.....	106
4.3. Оборудование	106
4.4. Принцип метода	107
4.5. Реагенты и расходные материалы:	108
4.6. Подготовка наборов реагентов	108
4.7. Проведение анализа.....	108
4.8 Анализ и учет результатов	110
4.8.1. Условия анализа и учета результатов	110
4.8.2. Учет результатов.....	110
4.8.3. Уборка рабочего места и утилизация отходов.....	111
5. Связанные документы	111
6. Распределение экземпляров СОП	111

ПРИЛОЖЕНИЕ 18.

Пример описания стандартной операционной процедуры «Определение антител к SARS-CoV2 иммунохимическими методами»	112
1. Цели.....	113
2. Обозначения, сокращения, символы	113
3. Требования к персоналу	113
3.1. Медицинские требования.....	113
3.2. Образование и обучение (инструктаж).....	114
3.3. Дополнительные требования	114
4. Описание.....	114
4.1. Клинические показания	114
4.2. Образцы для анализа	114
4.3. Оборудование	114
4.4. Принцип метода	115
4.5. Реагенты и расходные материалы:	115
4.6. Подготовка наборов реагентов	116
4.7. Проведение анализа.....	116
4.8 Анализ и учет результатов	117
4.8.1. Условия анализа и учета результатов	117
4.8.2. Учет результатов.....	117
4.9. Уборка рабочего места и утилизация отходов	117
5. Связанные документы	118
6. Распределение экземпляров СОП	118

ПРИЛОЖЕНИЕ 19.

Примеры оформления результатов исследования биологического материала для диагностики COVID-19 (выявление РНК и антигенов SARS-CoV-2).....	119
---	-----

ПРИЛОЖЕНИЕ 20.

Пример оформления результатов исследования об исследовании биологического материала с целью выявления антител к SARS-CoV-2	120
--	-----

СОСТАВ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ	122
-----------------------------	-----

ВВЕДЕНИЕ

31 декабря 2019г. офис ВОЗ в Китайской Народной Республике (КНР) официально объявил об идентификации нового типа бета-коронавируса (nCoV), который был изолирован 7.01.2020 с последующей публикацией результатов секвенирования его генома 12.01.2020 (<https://www.gisaid.org/>). Появление и активное распространение от человека к человеку нового возбудителя, вызвавшего тяжелое течение острого респираторного заболевания, поставило перед учеными, биотехнологами и специалистами здравоохранения задачи, связанные с быстрой разработкой и внедрением в практику методов диагностики для своевременного выявления больных и оказания им специализированной медицинской помощи и предупреждению распространения заболевания среди контактных лиц.

В настоящее время для этиологической диагностики COVID-19 доступны как прямые, так и непрямые методы: прямые методы направлены на выявления РНК (полимеразная цепная реакция в реальном времени и изотермальной амплификацией, с флюоресцентной детекцией и обратной транскрипцией) и антигена (иммунохроматографические) вируса SARS-CoV-2; непрямые методы - на выявление иммуноглобулинов классов IgA, IgM и IgG, в том числе, к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина вируса SARS-CoV-2. Решение о применении того или иного метода должно основываться на клинических проявлениях заболевания и текущей эпидемиологической ситуации, а также накопленном опыте.

В соответствии с пунктом 1.4 постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.03.2020 № 9 «О дополнительных мерах по снижению рисков распространения COVID-19», высшим должностным лицам субъектов Российской Федерации (руководителям высшего исполнительного органа государственной власти) поручено организовать лабораторную диагностику COVID-19 в субъектах Российской Федерации с привлечением лабораторий всех организаций вне зависимости от их организационно-правовой формы, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями III – IV групп патогенности с использованием методов, не предполагающих выделение возбудителя, соответствующие условия работы и обученный персонал, владеющие методами амплификации нуклеиновых кислот (МАНК).

Настоящие методические рекомендации включают рекомендации по организации и проведению этиологической диагностики коронавирусной инфекции (COVID-19) с применением следующих методов:

- прямые методы (выявление РНК SARS-CoV-2 МАНК и антигенов SARS-CoV-2

иммунохимическими методами);

- непрямыми методами (выявление антител к SARS-CoV-2 иммунохимическими методами).

Методические рекомендации охватывают, в том числе, организацию и технологические этапы проведения исследований. Особое внимание уделено описанию биологических материалов и правил их получения, упаковки, транспортирования и хранения.

Рекомендации основываются на «Временных методических рекомендаций по профилактике, лечению и диагностике коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 10 (08.02.2021), санитарных правилах, методических рекомендациях, национальных стандартах для медицинских лабораторий, а также международных рекомендациях и руководствах.

Рекомендации предназначены для руководителей и сотрудников медицинских организаций, в том числе, специалистов медицинских лабораторий, выполняющих лабораторные исследования для диагностики новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ И ПАТОГЕНЕЗ COVID-19

Первый коронавирус был описан как возбудитель инфекционного бронхита птиц в 1931 году. Коронавирус (HCoV-B814), вызывающий заболевание у человека, был выделен и описан в 1965 году Tyrrell D.A. и Вуное M.L. (Великобритания). По состоянию на февраль 2020 года описано более 40 видов коронавирусов семейства *Coronaviridae*, которые относятся к 4 родам: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*, и вызывают заболевания у животных (в основном летучих мышей), птиц, земноводных и млекопитающих. Только 7 представителей родов *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus* известны как возбудители заболеваний человека (HCoV - Human coronaviruses): HCoV-229E (1966г.), HCoV-OC43 (1967г.), SARS-CoV (2002г.), HCoV-NL63 (2004г.), HCoV-NKU1 (2005г.), MERS-CoV (2012г.) и SARS-CoV-2 (2019г.).

HCoV вызывают респираторные заболевания различной степени тяжести. Природным резервуаром HCoV служат, как правило, летучие мыши, которые переносят инфекцию без проявления клинических симптомов, при этом выделяют вирус со слюной, мочой и фекалиями.

До 2002 года коронавирусы рассматривали в качестве агентов, вызывающих легкие или среднетяжелые заболевания верхних дыхательных путей с крайне редкими летальными исходами.

В 2002 году впервые была зарегистрирована вспышка тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) в южном Китае, возбудителем которого стал вирус рода *Betacoronavirus*, подрода *Sarbecovirus*, названный SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). В период с 01.11.2002 по 31.07.2003 в 30 странах мира было зарегистрировано 8096 случаев заболевания ТОРС, летальность составила 9,6 % (774 скончавшихся пациента). Заболевание, получившее название SARS (ТОРС, атипичная пневмония) характеризовалось быстро прогрессирующей вирусной пневмонией, сопровождающейся дыхательной недостаточностью. Начиная с 2004 года новых случаев атипичной пневмонии, вызванной SARS-CoV, не зарегистрировано. Природным резервуаром SARS-CoV признаны летучие мыши, промежуточным хозяином - циветта (гималайская или пальмовая) и другие животные, экологически связанные с летучими мышами, употребляемые в Китае в пищу.

В 2012 году была зарегистрирована еще одна вспышка тяжелого респираторного заболевания, вызванного коронавирусом, также относящимся к роду *Betacoronavirus*, подроду *Merbecovirus* – ближневосточного респираторного синдрома, возбудитель которого получил название MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome-related

coronavirus). Первые случаи заболевания были зарегистрированы в странах Аравийского полуострова, заболевание получило название MERS (Middle East Respiratory Syndrome). К 31.01.2020 года число зарегистрированных случаев MERS составило 2519 в 27 странах, летальность достигала 35 %. Ежегодно регистрируют новые случаи MERS в различных странах. При этом 82 % случаев зарегистрированы в Саудовской Аравии. Как и в случае с SARS-CoV, природным резервуаром MERS-CoV служат рукокрылые (летучие мыши), однако промежуточным хозяином признан одногорбый верблюд (дромадер).

31 декабря 2019 года китайские власти сообщили о вспышке пневмонии неизвестного происхождения в городе Ухань, КНР. Вирусу изначально было присвоено название новый коронавирус 2019г. (2019-nCoV); в последующем Международный комитет по таксономии вирусов переименовал вирус на SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), а заболевание, которое он вызывает, определил как COVID-19 (COrona Virus Infectious Disease -19). Генетическая последовательность SARS-CoV-2 сходна с последовательностью SARS-CoV по меньшей мере на 79%, с MERS-CoV – на 50%.

Как и в случае SARS-CoV и MERS-CoV, природным резервуаром SARS-CoV-2 являются летучие мыши, промежуточного хозяина пока установить не удалось, предположительно – это мелкие позвоночные, употребляемые в пищу (панголины и др.).

Вирус достаточно быстро распространился на все страны и континенты мира, вытеснив из активной циркуляции вирусы гриппа, а также некоторых возбудителей ОРВИ. Распространение нового заболевания было признано ВОЗ пандемией. Новая коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2, включена в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих (постановление Правительства Российской Федерации от 31 января 2020 г. № 66), а сам возбудитель в соответствии с санитарным законодательством Российской Федерации, отнесен ко II группе патогенности (СП 3.1.3597-20).

По данным ВОЗ, к 19 апреля 2021г. число инфицированных в мире составило 141 057 106 с наибольшей вовлеченности взрослых, из них с летальными исходами – 3 015 043 (2,14%) в основном среди лиц 65 лет и старше; очевидными стали наличие, по крайней мере, двух волн активности (в некоторых странах развивались третья и четвертая волны): весна 2020г. с пиковыми показателями летальности в апреле и осень 2020г. – зима 2021г. с пиковыми показателями летальности в начале января-апреле 2021г. Более 80% случаев из числа заболевших регистрировали в странах Америки (59 757 084) и Европы (49 364480). Число зарегистрированных случаев в России на конец апреля 2021 составило 4 787 273 (с 109 367 летальных исходов, 2,3%). появление и распространение новых вариантов, несущих специфические мутации и отличающихся большей

контагиозностью – VOC 202012/01 (Великобритания, сентябрь 2020) детектирован в 118 странах; VOC 202012/02 (Ю. Африка, август 2020), детектирован в 64 странах и штамм, выявленный в Бразилии и Японии (декабрь 2020) и распространившейся уже в 38 странах.

Коронавирусы относят к одноцепочечным (+) РНК вирусам, геном которых состоит из нескольких открытых рамок считывания (ORF), кодирующих белки необходимые вирусу для заражения клетки, включая РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), структурные белки шип-белок (S), белок оболочки (E), белок мембраны (M), нуклеокапсид (N) и другие вспомогательные белки. Свое название коронавирусы получили из-за формы вирусной частицы, выявленной при электронной микроскопии: на негативно-контрастных электронных фотографиях были обнаружены булавовидные отростки – пепломеры, состоящие из тримера гликопротеина, обозначенного как spike glycoprotein S, и выглядящие как корона. Связываясь с трансмембранными рецепторами клетки хозяина, гликопротеин S (шип-белки) обеспечивают проникновение вирусного нуклеокапсида в клетку.

Последовательность генома SARS-CoV-2 была расшифрована и опубликована китайскими исследователями в первые недели развития эпидемии COVID-19 в Ухане (Китай). Исследования геномов штаммов вирусов, выделенных в различных регионах мира, продолжаются, расшифрованные полноразмерные геномы постоянно пополняют международный банк данных геномных последовательностей (GenBank and the Sequence Read Archive - SRA).

Патогенез COVID-19 активно изучается. Начальным этапом инфицирования является проникновение SARS-CoV-2 в клетки-мишени, имеющие рецепторы ангиотензин превращающего фермента II типа (АПФ-2), представленные на поверхности эндотелиальных клетках дыхательного тракта, а также почек, пищевода, мочевого пузыря, подвздошной кишки, сердца, кровеносных сосудов, ЦНС, что определяет развитие клинической картины заболевания с полиорганным поражением и сближает COVID-19 с SARS и гриппом. Однако основной и быстро достижимой мишенью вируса являются альвеолярные клетки II типа (AT2) легких, что определяет высокую частоту развития пневмонии.

В респираторном тракте вирус выявляется на максимальном уровне за 1-2 дня до появления симптомов и в течении первой недели с момента появления первых симптомов – период наибольшей «заразности» пациента.

Инфицирование вирусом приводит к выработке антител к спектру вирусных белков, однако определение антител к S-белку и нуклеокапсидному белку (N) используют наиболее часто в серологической диагностике. Некоторые антитела детектируют уже

в течение первых 4 дней заболевания с последующим нарастанием титров в течение последующих 4 недель. Длительность их циркуляции и протективная эффективность требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, быстрая расшифровка и публикация последовательности генома SARS-CoV-2, а также данные по особенностям патогенеза и иммунного ответа позволили разработать наборы реагентов для выявления вируса в биологических образцах (РНК и антигена) – прямые методы этиологической диагностики, а также антител иммуноглобулинов классов IgA, IgM и IgG, в том числе, к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина вируса SARS-CoV-2 – не прямые методы этиологической диагностики.

Более подробная информация будет представлена в соответствующих разделах настоящих Методических рекомендаций.

2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

2.1. ТРЕБОВАНИЯ К ДОПУСКУ МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЙ К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПОРЯДКУ ИНФОРМИРОВАНИЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 198н от 19.03.2020 и постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.03.2020 № 9 этиологическая лабораторная диагностика новой коронавирусной инфекции (методами амплификации нуклеиновых кислот и/или иммунохимическими методами) без выделения возбудителя проводится в клиническо-биологических, микробиологических/ бактериологических или вирусологических лабораториях медицинских организаций (далее – Лаборатория), имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека III - IV групп патогенности, и условий для проведения исследований с применением МАНК и/или иммунохимических методов.

Организация исследований должна соответствовать действующим санитарным правилам и учитывать действующие методические рекомендации Роспотребнадзора и МЗ РФ.

Количество образцов, поступающих в лабораторию для исследований для диагностики COVID-19, не должно превышать возможности лабораторий проводить исследования в соответствии с санитарными нормами и правилами проведения исследований, гарантирующими их биологическую безопасность и качество (см. раздел 4).

Роспотребнадзор ведет реестр медицинских коммерческих организаций, не входящих в государственную и муниципальную системы здравоохранения, заявленных для диагностики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) (сайт регистрации <https://reports.fcgie.ru/app/form?id=68>).

Представление результатов прямых этиологических исследований. Информация о положительных или сомнительных результатах исследований на COVID-19, полученных прямыми методами (определение РНК МАНК или определение антигена SARS-CoV-2 иммунохроматографическими методами), незамедлительно передается уполномоченным сотрудником организации, на базе которой проводили исследования, в территориальные органы Роспотребнадзора, с указанием данных об обследуемом лице. Учет и регистрацию случаев COVID-19 территориальными органами Роспотребнадзора

проводят на основе экстренных извещений, направленных медицинскими организациями.

2.2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ И ОБОРУДОВАНИЮ, ИСПОЛЬЗУЕМЫМ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

2.2.1. Общие требования к помещениям и оборудованию, используемым для этиологической диагностики COVID-19

Помещения и оборудование, используемые для лабораторной этиологической диагностики COVID-19, должны соответствовать требованиям действующих санитарных правил (См. раздел 7).

Лаборатория должна иметь помещения, последовательное расположение которых обеспечивает поточность проведения процесса исследования в отдельных рабочих («заразных») зонах (помещениях или отдельных шкафах безопасности II класса в составе общих функциональных помещений). На входных дверях в рабочие помещения должен быть знак «Биологическая опасность» (красного или красно-оранжевого цвета на желтом фоне). Входная дверь должна иметь запирающее устройство.

Вспомогательные помещения (комнаты персонала, кабинет заведующего лабораторией, раздевалки для сотрудников, комната приема пищи, туалет, подсобные (складские) помещения) должны быть расположены за пределами рабочих зон.

Исследования для этиологической диагностики COVID-19 могут проводиться в передвижных (мобильных) лабораториях, при условии выполнении требований действующих санитарных правил и наличия разрешений на осуществление этого вида медицинской деятельности в соответствии с действующей нормативно-законодательной базы.

При проведении обеззараживания биологических материалов необходимо руководствоваться СанПиН 2.1.7.2790-10. **Обеззараживание отходов должно производиться в рабочей («заразной») зоне лаборатории (см. п. 3.4).**

Для выполнения исследований используют оборудование, наборы реагентов, реагенты и расходные материалы, зарегистрированные разрешенные к применению на территории России как изделия медицинского назначения, имеющие действующий срок годности. Применение изделий медицинского назначения осуществляется в соответствии с инструкциями их производителей.

2.2.2. Дополнительные требования к помещениям и оборудованию для проведения этиологической диагностики COVID-19 с использованием МАНК

Помещения и оборудование, используемые для исследований с применением МАНК

для диагностики COVID-19, должны соответствовать требованиям, изложенным действующих санитарных правилах, методических указаниях.

Рекомендуется следующее распределение работ по исследованиям МАНК):

- рабочая зона 1 - прием, регистрация, разбор и первичная обработка биологического материала;
- рабочая зона 2 - выделение нуклеиновых кислот из нативного биологического материала;
- рабочая зона 3 - проведение реакции амплификации с обратной транскрипцией и учет ее результатов при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции продукта амплификации.

Лаборатория должна иметь оборудование, достаточное для проведения исследований МАНК для этиологической диагностики COVID-19, с учетом объема работы (пример оснащения в Приложении 2).

2.2.3. Дополнительные требования к помещениям и оборудованию используемым для этиологической диагностики COVID-19 с использованием иммунохимических методов определения антигена SARS-CoV-2

Лаборатория должна иметь помещения, расположение которых обеспечивает поточность проведения процесса исследования в трех отдельных рабочих зонах (помещениях или отдельных шкафах (боксах) безопасности II класса в составе общих функциональных помещений):

- рабочая зона 1 - прием, регистрация, разбор и первичная обработка биологического материала;
- рабочая зона 2 – выделение антигенов SARS-CoV-2 из нативного биологического материала с использованием экстракционного/инактивирующего буфера, входящего в состав набора реагентов или рекомендованного производителем набора реагентов;
- рабочая зона 3 - проведение иммунохимических реакций по обнаружению антигена SARS-CoV-2.

Лаборатория должна иметь оборудование, достаточное для проведения иммунохимических реакций для этиологической диагностики COVID-19, с учетом объема работы .

Методики исследований, интерпретация результатов должны соответствовать инструкциям производителей реагентов и оборудования.

2.3. ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ ПО ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ COVID-19

2.3.1. Общие правила проведения работ по этиологической диагностике COVID-19

При организации лабораторных исследований для диагностики COVID-19 необходимо обеспечение соблюдения поточности материала: недопустимо пересечение маршрутов движения образцов/материалов (потенциально инфицированных материалов, проб нуклеиновых кислот или антигенов, продуктов амплификации) между местами проведения последовательных этапов исследования.

Взятие биологического материала должно проводиться вне помещений лаборатории. **Сотрудники лаборатории не должны** участвовать в сборе, предварительной обработке, хранении образцов на до-лабораторном этапе, и в транспортировке материала.

Руководитель лаборатории, выполняющей исследования МАНК с целью выявления РНК SARS-CoV-2, должен оценить мощность лаборатории и определить количество исследований, которые лаборатория может выполнить в течение одной рабочей смены.

Время проведения исследования на COVID-19 и выдачи результатов (положительных, отрицательных, сомнительных) не должно превышать 48 часов с момента поступления биологического материала в лабораторию.

Биологический материал, собранный, маркированный и упакованный в соответствии с установленными правилами (см. раздел 4.1.3), и сопроводительные документы к нему, находящиеся в отдельном непромокаемом пакете, поступают в лабораторию в рабочую зону 1. В рабочей зоне 1 осуществляют прием материала, его маркировку, регистрацию в специальном журнале (в бумажной или электронной форме), первичную подготовку образцов (перевод сухих и плотных материалов в жидкую фазу и т. д.), разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала. Допускается объединение зон лаборатории для проведения работ по приему, регистрации, разбору и первичной обработке материала для исследований с применением МАНК и аналогичных работ для исследований с применением других методов для диагностики инфекционных заболеваний (бактериологическими, иммунологическими и т. д.).

Перенос проб из одной рабочей зоны в другую, а также их хранение в данных помещениях рекомендуется осуществлять в плотно закрывающихся контейнерах с их последующей обработкой регламентированными дезинфицирующими средствами после каждого использования.

Все манипуляции в рабочих зонах 1 и 2, включая манипуляции, сопровождающиеся риском образования аэрозоля (встряхивание, центрифугирование и т. д.) при обработке материала (например, при выделении нуклеиновых кислот или экстракции антигенов), выполняют в шкафах (боксах) биологической безопасности II или III класса или боксированных помещениях.

Техника манипуляций с ПБА должна минимизировать образование аэрозолей и

возможности перекрестной контаминации между образцами!

Пипетирование суспензий ПБА, образцов, содержащих продукты амплификации создает повышенные риски образования аэрозолей. На всех этапах работы с ПБА необходимо использовать наконечники для автоматических пипеток с барьерными фильтрами (filter-tips).

На время проведения исследований все образцы биологических материалов (инфицированные или потенциально инфицированные) помещают на хранение в холодильное (морозильное) оборудование по крайней мере до валидации результатов исследований.

Для исключения непредусмотренного нарушения подачи электроэнергии необходимо подключать оборудование лаборатории к источникам бесперебойного питания.

Тест-системы/наборы реагентов, используемые для этиологической диагностики COVID-19, должны быть зарегистрированы в установленном порядке для использования в РФ как медицинские изделия. Перечень зарегистрированных в Российской Федерации диагностических наборов реагентов для выявления маркеров COVID-19 (РНК и антигенов SARS-CoV-2, антител к вирусу) представлен в Государственном реестре медицинских изделий (<https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch>).

При поступлении в лабораторию все тест-системы/наборы реагентов должны регистрироваться в журнале (см. Приложение 11).

Условия хранения тест-систем/наборов реагентов должны соответствовать инструкциям по применению. ***Не допускается использование тест-систем/наборов реагентов, незарегистрированных в РФ в установленном порядке, реагентов с истекшим сроком годности, а также хранившихся в условиях нарушения температурного режима.***

Реагенты, биологический материал, пробы с выделенными нуклеиновыми кислотами, пробы с продуктами амплификации, хранят отдельно, в разных холодильниках и в разных рабочих зонах лаборатории.

Холодильное оборудование должно быть оснащено средствами ручного или автоматического температурного контроля, контроль температуры должен проводиться не реже двух раз в день (в начале и в конце рабочего дня/смены. Результаты ручного контроля должны регистрироваться в специальных журналах, при автоматической регистрации температуры результаты регистрации должны сохраняться как свидетельства о реальном режиме хранения наборов реагентов и исследуемых проб.

2.3.2. Дополнительные правила проведения работ по этиологической диагностике COVID-19 с применением МАНК

Пробы, подготовленные в рабочей зоне 1 поступают в рабочую зону 2, в которой проводят выделение и очистку нуклеиновых кислот из биологического материала.

В рабочей зоне 3 осуществляют приготовление реакционных смесей, проведение обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот. Приготовление реакционных смесей в рабочей зоне 3 выполняют в ПЦР-боксе.

Рекомендуется разделить рабочую зону 3 на две подзоны (3а и 3б) и разместить их в отдельных помещениях. В подзоне 3а осуществляют приготовление реакционных смесей в ПЦР-боксах и проведение обратной транскрипции. В подзоне 3б проводят амплификацию нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции.

Совмещение рабочих зон 2 и 3 в одном помещении возможно «при наличии в нем отдельных боксов биологической безопасности II или III классов для каждой из рабочих зон».

При применении тест-систем и оборудования, позволяющих проводить все этапы МАНК в одной пробирке (картридже), разделение зон 2 и 3 также не требуется.

Лаборатория должна проводить **контроль контаминации помещений лаборатории продуктами амплификации нуклеиновых кислот** не реже 1 раза в неделю согласно процедуре (приложение 3). Для контроля за контаминацией помещений берутся смывы с поверхностей во всех зонах лаборатории. Смывы исследуются МАНК и наборами реагентов, которые применяются в лаборатории для диагностики COVID-19.

В случае получения положительных результатов в отрицательных контролях, или в образцах смывов с поверхностей все исходные реактивы подлежат немедленной замене, необходимо провести деконтаминационные мероприятия (см. Приложение 3).

2.3.2. Дополнительные правила проведения работ по этиологической диагностике COVID-19 с применением иммунохимических методов определения антигена SARS-CoV-2

Пробы, подготовленные в рабочей зоне 1 поступают в рабочую зону 2, в которой проводят выделение антигенов SARS-CoV-2 из нативного биологического материала с использованием экстракционного/ инактивирующего буфера, входящего в состав набора реагентов или рекомендованного производителем набора реагентов.

В рабочей зоне 3 осуществляют проведение иммунохимических реакций по обнаружению антигена SARS-CoV-2.

2.4. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ ЛАБОРАТОРИИ, УЧАСТВУЮЩЕМУ В ДИАГНОСТИКЕ COVID-19

К проведению исследований для диагностики COVID-19 с применением МАНК

допускаются специалисты с высшим образованием, допущенные к работе в лаборатории в соответствии с действующим профессиональным стандартом специалиста клинической лабораторной диагностики: врачи клинической лабораторной диагностики, врачи–бактериологи или врачи–медицинские микробиологи, а также биологи, имеющие удостоверение о повышении квалификации по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика» и/или «Бактериология».

Специалисты со средним медицинским образованием, допущенные к проведению этиологических лабораторных исследований для диагностики COVID-19 с применением МАНК, должны иметь сертификат или свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Лабораторная диагностика» или «Бактериология».

Все специалисты лаборатории с высшим и средним специальным образованием, допущенные к проведению исследований для этиологической диагностики COVID-19, должны пройти повышение квалификации по применяемым методам исследования для диагностики инфекций.

Все сотрудники лаборатории, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19, должны пройти инструктаж и дать письменное согласие на работу для этиологической диагностики COVID-19.

Врачи-бактериологи, врачи клинической лабораторной диагностики и биологи, участвующие в диагностике COVID-19:

- выполняют исследования (проводят высокотехнологичные операции), отвечают за их организационно-методическое обеспечение, проводят валидацию и интерпретацию результатов исследования, оформляют результаты исследования;
- организуют деятельность находящихся в подчинении медицинских работников лаборатории;
- контролируют и обеспечивают ведение документации лаборатории;
- организуют и контролируют мероприятия по обеспечению биологической безопасности в лаборатории.

Врачи-бактериологи, врачи клинической лабораторной диагностики и оказывают консультативную помощь медицинским работникам в планировании исследований по диагностике COVID-19, в интерпретации результатов исследования, рекомендуют проведение дополнительных исследований.

Специалисты со средним медицинским образованием проводят:

- прием поступающих в лабораторию образцов и сопроводительных документов,
- выбраковку образцов,
- регистрацию полученного биологического материала,
- проведение технических манипуляций, не требующих высокой квалификации (подготовка помещений, боксов биологической безопасности, расходных

материалов к работе),

- утилизацию использованных расходных материалов и остатков использованных биологических образцов,
- обработку рабочих зон и оборудования с целью их обеззараживания, и для удаления продуктов амплификации, которые могут контаминировать рабочие зоны лаборатории (см. раздел 2.3.2).

Персонал лаборатории, участвующий в проведении диагностики COVID-19, обязан соблюдать общие правила работы с материалами, потенциально зараженными патогенными биологическими агентами, в том числе использовать безопасные техники манипуляций с пробами пациентов, медицинскими изделиями (наборами реагентов, расходными материалами) объектами потенциальной опасности для здоровья людей. Инструктаж на рабочем месте по соблюдению требований биологической безопасности должны проводиться не реже 1 раза в год.

Персонал лаборатории должен выполнять правила химической, электрической и противопожарной безопасности при проведении работ в лаборатории.

Персонал должен быть обучен правилам использования средств индивидуальной защиты (СИЗ), и применять их при проведении исследований по диагностике COVID-19, соблюдать правила личной гигиены.

3. ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

Учитывая высокую контагиозность нового коронавируса SARS-CoV-2 и отнесение его ко II группе патогенности (опасности), однако лабораторные исследования с целью диагностики COVID-19 проводятся без накопления возбудителя, поэтому, в соответствии с действующими санитарными правилами, условия проведения исследований должны отвечать требованиям к работе с ПБА III группы патогенности (опасности).

Организационно-планировочные решения в лаборатории должны соответствовать действующим санитарным правилам. Помещения лаборатории разделяют на «заразную» зону, где осуществляются любые манипуляции с материалом инфицированным (потенциально инфицированным), и «чистую» зону, где не проводят работы с микроорганизмами и их хранение. Все рабочие зоны лаборатории (рабочая зона 1, рабочая зона 2, рабочая зона 3), а также помещение для обеззараживания биологического материала относят к помещениям «заразной» зоны.

Допускается проведение работ одновременно с разными видами (штаммами) возбудителей в одном помещении. При этом биологическая безопасность обеспечивается в соответствии с наиболее жесткими требованиями, определяемыми видовыми, штаммовыми и другими особенностями используемых ПБА.

3.1. АДМИНИСТРАТИВНЫЕ МЕРЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

Административные меры обеспечения биологической безопасности принимаются руководством лаборатории совместно с руководителями медицинской организации, в состав которой входит лаборатория. Административные меры являются наиболее эффективными и включают:

- определение назначения помещений лабораторий в соответствии с цепочкой движения материала, зон с однотипными рисками;
- определение правил доступа в лабораторию и зоны с различными уровнями биологических рисков;
- определение правил работы, санитарно-гигиенических норм для данного подразделения и мер инфекционного контроля для каждой группы помещений (например, цвет халатов);
- контроль за выполнением установленных правил;
- определение обязанностей сотрудников в отношении выполнения программы

- обеспечения биологической безопасности;
- образовательную подготовку персонала, организацию обучения и регулярного переобучения.

3.2 ИНЖЕНЕРНЫЕ МЕРЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

Меры технического характера направлены на снижение концентрации инфекционного аэрозоля в помещениях и окружающей среде, и применяются в зонах высокого риска, где эффект одних лишь административных мер недостаточен. Инженерное обеспечение помещений, в которых проводят исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 МАНК и антигена SARS-CoV-2 методами иммунохимии, и применяемые виды оборудования должны соответствовать действующему законодательству и обеспечивать безопасные условия труда.

К инженерным мерам относятся организация систем общей и местной вентиляции.

Функциями общей вентиляции являются:

- снижение концентрации («разбавление») и удаление инфекционных микрочастиц (аэрозольных и пылевых) - подача (подмешивание) свежего воздуха, подогрев, увлажнение или снижение влажности воздуха;
- исключение перетекания воздушных масс из «заразных» зон в «чистые» помещения, обеспечение движения направленного воздушного потока внутри «заразной» зоны из наименее загрязненной зоны в более загрязненную для предотвращения создания застойных зон;
- обеззараживание воздуха, выбрасываемого за пределы лаборатории.

Вентиляционная система лаборатории должна быть изолированной, приточно-вытяжной с механическим побуждением. Воздуховоды систем приточной и вытяжной вентиляции должны содержать фильтры высокой очистки (Н11 - Н14) (в соответствии с действующими строительными и санитарными правилами).

Работы, связанные с высоким риском образования аэрозоля (центрифугирование, гомогенизация, измельчение, интенсивное встряхивание, обработка ультразвуком, вскрытие объектов с зараженным материалом), работы с большими объемами и высокими концентрациями ПБА и др. потенциально опасные манипуляции с нативным биоматериалом проводят в боксах биологической безопасности II и III классов или в боксированных помещениях.

3.3. СРЕДСТВА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

Средства индивидуальной защиты (СИЗ) при проведении этиологической диагностики

COVID-19 включают защитную одежду и средства защиты органов дыхания (СИЗОД). Выбор типа защитной одежды (защитного костюма и средств индивидуальной защиты) определяется отнесением нового коронавируса SARS-CoV-2 к вирусам II группы патогенности. Во всех рабочих зонах (рабочей зоне 1, рабочей зоне 2, рабочей зоне 3), защитная одежда включает в себя: костюм IV типа, резиновые (латексные перчатки), и СИЗОД (респиратор типа FFP3 или его эквивалент), или более высокий уровень защиты (пневмошлем), очки для защиты глаз или защитный экран, специальная лабораторная обувь, бахилы.

Лаборатория должна иметь СИЗ в достаточных количествах, включающих необходимое количество комплектов для каждой рабочей зоны, возможность смены СИЗ в течении дня, запас СИЗ, обеспечивающий бесперебойное обеспечение персонала.

Каждая рабочая зона (помещение) обеспечивается необходимым количеством комплектов одноразовой спецодежды (комбинезон, средство, закрывающее волосяную часть головы, одноразовые латексные (резиновые) перчатки и стерилизуемая сменная обувь). Рекомендуется использование одноразовой одежды разных цветов (для каждой зоны свой цвет). При работе в рабочей зоне 3 следует дополнительно надевать одноразовые бахилы. При переходе из одной зоны в другую необходима смена комплекта защитной одежды. *Использование защитной одежды из другой зоны запрещено.*

Надевание и снятие защитной одежды производится в предбоксах (шлюзах), в каждом из которых должны быть отдельные комплекты защитной одежды и обуви.

3.4 ОБРАБОТКА ПОМЕЩЕНИЙ И ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ

Обработку помещений лаборатории, проводящей исследования по диагностике COVID-19, проводят в соответствии с требованиями действующих санитарных правил и норм.

Перед началом работы рабочую поверхность столов (биологических боксов) и оборудования обрабатывают растворами дезинфицирующих средств, с учетом их действия на ПБА, указанном в инструкциях их производителей, а также инструкций производителей к оборудованию, тест-системам/наборам реагентов.

Ежедневно в конце рабочего дня проводят текущую влажную уборку полов разрешенными к применению дезинфицирующими средствами. Каждая рабочая зона (помещения) лаборатории должна быть обеспечена промаркированным набором уборочного инвентаря. Перенос и использование уборочного инвентаря не по назначению (для уборки других зон) не допускается.

Рабочие зоны (помещения) лаборатории должны подвергаться ежедневному

обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с РЗ.5.1904-04.

Дезинфекция рабочих зон и обеззараживание возможных разливов инфицированных жидкостей организма или крови должны проводиться с использованием дезинфицирующих средств, зарегистрированных в установленном порядке. При обработке должны использовать режимы для обеззараживания объектов при вирусных инфекциях, указанные в инструкциях по применению этих средств.

Для дезинфекции могут быть использованы средства из различных химических групп (с учетом спектра их действия на ПБА, указанном в инструкциях их производителей, а также инструкций производителей к оборудованию, тест-системам/наборам реагентов):

- хлорсодержащие (натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты - в концентрации активного хлора в рабочем растворе не менее 0,06%, хлорамин Б - в концентрации активного хлора в рабочем растворе не менее 3,0%),
- кислород-активные (перекись водорода - в концентрации не менее 3,0%),
- катионные поверхностно-активные вещества (КПАВ) - четвертичные аммониевые соединения (в концентрации в рабочем растворе не менее 0,5%),
- третичные амины (в концентрации в рабочем растворе не менее 0,05%),
- полимерные производные гуанидина (в концентрации в рабочем растворе не менее 0,2%).

В лабораториях, проводящих исследования МАНК, необходимо регулярно контролировать наличие контаминации помещений продуктами амплификации нуклеиновых кислот и, при выявлении контаминации, проводить обработку помещений (Приложение 3).

При проведении исследований образуются медицинские отходы, относящиеся к классам А, Б, В и Г. Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с требованиями СП 2.1.7.2790-10.

Отходы, содержащие (потенциально содержащие) SARS-CoV-2 (материалы и инструменты, предметы, загрязненные нативным биологическим материалом), относят к медицинским отходам класса В, которые подлежат обязательному обеззараживанию.

Не разрешается вынос необеззараженных медицинских отходов из рабочих зон лаборатории.

Медицинские отходы класса В собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (не прокалываемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета, имеющие красную маркировку. Выбор упаковки зависит от состава отходов.

Обеззараживание медицинских отходов должно проводиться с применением физических методов дезинфекции.

4. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

Качество медицинских лабораторных исследований обеспечивается системой управления качеством (менеджмента качества) (ГОСТ ИСО 15189). В рамках организации контроля качества большое внимание необходимо уделять стандартизации и документированию процессов, в том числе разработке и внедрению на рабочих местах стандартных операционных процедур (СОП).

Система управления качеством предусматривает контроль за выполнением лабораторных процедур, включающий внутренние контролирующие процедуры и внешний контроль.

Внутрилабораторный контроль при проведении исследований по этиологической диагностике COVID-19 включает:

- регулярный аудит с целью подтверждения соответствия выполняемых процедур установленным правилам;
- исследование контрольных образцов в каждой серии исследований на всех этапах исследований;
- периодическое проведение повторных исследований, поступивших в лабораторию биологических образцов (выполняется двумя операторами параллельно при смене оборудования, при проведении этапов исследования новым (ранее не проводившим этот этап исследования) специалистом, при введении нового набора реагентов);
- исследование контрольных образцов при входном контроле новой партии наборов реагентов, смене оборудования, смене специалиста, выполняющего исследование, введении нового набора реагентов;
- контроль загрязнения лаборатории продуктами амплификации проводится не реже, чем 1 раз в неделю (раздел 2.3.2., приложение 3).

На любом этапе исследования могут возникать ситуации, которые могут привести к ошибкам. Ложноотрицательные результаты могут быть получены

- при нарушении правил подготовки пациента к взятию биоматериала для исследования (см. приложение 4),
- при нарушении правил взятия биоматериала, условий хранения и транспортировки образцов/реагентов
- при нарушении условий хранения образцов/реагентов,
- если исходный образец содержал ингибирующие вещества,
- если на этапе выделения нуклеиновых кислот или антигена были потери материала,
- как следствие аналитических характеристик тест-систем/наборов реагентов.

Ложноположительные результаты могут быть получены при контаминации образца на любом этапе исследования или контаминации реагентов образцом с высокой вирусной нагрузкой, или нуклеиновыми кислотами, продуктами амплификации (при исследованиях МАНК), как интерференции с веществами, содержащимися в биоматериалах.

Применение контрольных образцов должно проводиться в соответствии с инструкциями к используемым наборам реагентов. Многие наборы реагентов, зарегистрированные в Российской Федерации для применения в здравоохранении, включают положительные и отрицательные контрольные образцы.

С целью предотвращения появления недостоверных, в том числе ложноположительных или ложноотрицательных результатов, при этиологической диагностике COVID-19, необходимо строго соблюдать требования по организации лаборатории, санитарные правила, методические рекомендации и инструкции производителей конкретного набора реагентов. Соблюдение правил проведения исследований на всех этапах контролируется при регулярных внутренних аудитах.

В случае получения положительных результатов в отрицательных контролях все исходные реактивы подлежат немедленной замене.

Внешний контроль качества с применением контрольных образцов (ВОК) является ретроспективный анализ качества исследований и направлен на выявление системных ошибок при проведении исследований. ВОК осуществляется в форме участия лаборатории в межлабораторных сличениях, проводимых организациями, аккредитованными для проведения межлабораторных сличений (при наличии), например, ФСВОК или международные системы внешней оценки качества. В случае неудовлетворительной оценки полученных результатов руководитель лаборатории обязан принять экстренные меры по выявлению причин ошибок и их устранению.

5. ВЫБОР ТЕСТ-СИСТЕМ/НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

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, с другой стороны, зависит от стадии инфекционного процесса, способа и правильности получения биологического материала. В связи с этим, преимуществом в диагностике COVID-19 могут иметь тесты, позволяющие получить как количественные, так и качественные результаты, но обеспечивающие:

- высокие чувствительность и специфичность исследования,
- быстроту получения результата,
- мультиплексность анализа, то есть возможность обнаружить несколько целевых мишеней (РНК SARS-CoV-2, антигенов, антител), что повышает надежность исследования,
- стоимость исследования, включая, в том числе, стоимость реагентов, расходных материалов, трудозатрат и эксплуатационных расходов,
- возможность использования станций для автоматического проведения исследования.

Аналитические и диагностические характеристики тест систем. Тест-системы/наборы реагентов, применяемых для диагностики инфекционных заболеваний характеризуются их чувствительностью и специфичностью. Различают аналитические и диагностические показатели. Эти характеристики представлены в инструкциях к большинству тест-систем/наборов реагентов, применяемых в медицинских целях.

Характеристики тест-систем/наборов реагентов, указанные в инструкции, будут воспроизводиться только при условии строгого соблюдения инструкции по проведению исследований, в том числе правил использования изделий медицинского назначения (оборудования, тест-систем/наборов реагентов, расходных материалов и пр.)

Аналитическая чувствительность — это наименьшее количество аналита (наименьшая концентрация), которое можно обнаружить этим методом. Предел обнаружения аналита отражает аналитическую чувствительность тест-системы/набора реагентов: чем меньше предел обнаружения, тем выше чувствительность.

Аналитическая специфичность — способность метода измерять лишь тот компонент, для определения которого он предназначен. В случае тест-систем/наборов реагентов, предназначенных для этиологической диагностики COVID-19, разработчики

определяют аналитическую специфичность наборов реагентов по их способности давать положительную реакцию на потенциально интерферирующие вирусы и бактерии, вызывающие респираторные инфекционные заболевания.

Аналитические характеристики МАНК (выявление РНК) и выявление антигенов SARS-CoV-2. Предел обнаружения большинства зарегистрированных в России тест-систем МАНК составляет 10^3 копий РНК в мл исходного образца, 10-25 копий РНК в аликвоте для проведения МАНК. Заявленная производителем аналитическая чувствительность тест-системы картриджной технологии ПЦР – 250 копий РНК в мл исходного образца.

Аналитическая чувствительность наборов реагентов для определения АГ SARS-CoV-2 различна, но, как правило, ниже, чем у большинства наборов реагентов, основанных на МАНК и колеблется в интервале $3 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^3$ TCID₅₀ (Fifty-percent tissue culture infective dose, доза вируса, вызывающая инфицирование 50% зараженных клеток в клеточной культуре) в мл исходного образца для большинства зарегистрированных в России наборов реагентов.

Все зарегистрированные в Российской Федерации тест-системы/наборы реагентов для определения РНК SARS-CoV-2 на основе МАНК, в соответствии с инструкциями производителя, имеют 100% аналитическую специфичность.

Аналитическая специфичность зарегистрированных в Российской Федерации тест-систем/наборов реагентов для определения АГ SARS-CoV-2 на основе иммунохимических методов, согласно приведенным в инструкциях производителей данных, колеблется в пределах 98-100%.

Диагностическая чувствительность теста определяет его способность правильно определить пациентов с заболеванием и определяется как доля (%) положительных результатов, полученных исследуемым методом, среди всех положительных результатов, подтверждающих наличие заболевания, полученных при обследовании той же группы пациентов другими методами (методами лабораторной диагностики или другими методами клинического обследования).

Диагностическая специфичность теста определяет его способность правильно определить пациентов, не имеющих заболевание и определяется как доля (%) истинно отрицательных результатов среди здоровых лиц в группе обследуемых пациентов (методами лабораторной диагностики или другими методами клинического обследования).

Диагностические характеристики МАНК (выявление РНК) и выявление антигенов SARS-CoV-2. Диагностические характеристики наборов реагентов для обнаружения АГ SARS-CoV-2 большая часть производителей оценивает с использованием образцов, полученных от пациентов с возможным COVID-19, собранных в течение семи дней после появления симптомов. В качестве тестов сравнения при этом используются высокочувствительные тест-системы/наборы реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2, основанные на ОТ-ПЦР РВ. Вне зависимости от используемого иммунохимического метода диагностическая чувствительность тест-систем/наборов реагентов для выявления АГ SARS-CoV-2 по сравнению с ОТ-ПЦР в образцах, полученных в день появления симптомов составила 50-70%, через 1 день 60-80%, на 3 й день - 70-90%, на 3-7 день - 80-100%. Значением C_t ОТ-ПЦР, обратно пропорциональное содержанию РНК возбудителя в образце связано с эффективностью выявления АГ SARS-CoV-2: чем ниже C_t , тем выше вероятность обнаружения АГ SARS-CoV-2. Низкая эффективность выявления АГ SARS-CoV-2 (20-50%) отмечена при исследовании образцов с C_t выше 30.

Показатели положительной и отрицательной прогностической ценности всех диагностических тестов зависят от диагностической чувствительности и диагностической специфичности теста, но варьирует в зависимости от распространенности заболевания в популяции и от наличия клинических проявлений болезни у конкретного пациента. Если распространенность COVID-19 в популяции высока, то положительная прогностическая ценность результата также выше, чем при обследовании популяции с низкой распространенностью COVID-19 при всех значениях диагностической чувствительности.

При выборе тест-систем/наборов реагентов для выявления антител к SARS-CoV-2 необходимо учитывать возможное влияние интерферентов на результат исследования (билирубин, гемоглобин, липиды), возможность использования различных видов стабилизаторов крови (ЭДТА, цитрат натрия), возможность получения ложных результатов в образцах крови беременных женщин и лиц с другими гетерологичными заболеваниями, вызванными другими возбудителями (грипп типа А, грипп типа В, аденовирусная инфекция, риновирусная инфекция, коронавирусные инфекции (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-NKU1, SARS-CoV, MERS-CoV), Varicella Zoster, цитомегаловирусом, вирусом кори, вирусом краснухи, вирусом простого герпеса первого типа, вирусом Эпштейна-Барр, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, HBV-инфекцией, HCV-инфекцией, ВИЧ -инфекцией).

При выборе наборов реагентов необходимо отдавать предпочтение тест-системам с наиболее высокими параметрами чувствительности и специфичности,

позволяющими получать надежные результаты, правильность которых не вызывает сомнений, и позволяющими обеспечить минимальные уровни ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Для этиологической диагностики COVID-19 могут быть использованы только тест-системы/наборы реагентов, зарегистрированные в РФ как медицинские изделия (Государственный реестр медицинских изделий <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch>) Инструкция по поиску зарегистрированных тест-систем/наборов реагентов в Государственном реестре медицинских изделий приведена в Приложении 1.

6. ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19

6.1. ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

6.1.1. Показания к назначению исследования для этиологической диагностики COVID-19. Направление на исследование

Обследование пациентов для этиологической диагностики COVID-19 проводится в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 198н от 19.03.2020, Временными методическими рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID 19) (версия 11 от 07.05.2021).

Обследованию на COVID-19 с применением методов этиологической диагностики подлежат следующие группы пациентов:

- лица, вернувшиеся на территорию Российской Федерации с признаками респираторных заболеваний (или при появлении симптомов в течение периода медицинского наблюдения);
- контактировавшие с больными COVID-19;
- пациенты с диагнозом «внебольничная пневмония»
- лица старше 65 лет, обратившиеся за медицинской помощью с симптомами респираторного заболевания
- медицинские работники, имеющие риски инфицирования COVID-19 – один раз в неделю, а при появлении симптомов – немедленно;
- находящиеся в учреждениях постоянного пребывания независимо от организационно-правовой формы (специальные учебно-воспитательные учреждения закрытого типа, кадетские корпуса, дома интернаты, учреждения ФСИН России).

Для других («неконтактных») пациентов с респираторными симптомами взятие и исследование мазков из носа и ротоглотки в день обращения проводится по решению врача.

Определение АГ SARS-CoV-2 может быть выполнено вместо проведения определения РНК SARS-CoV-2 с помощью МАНК в следующих случаях:

- при реагировании на предполагаемые вспышки COVID-19 в отдаленных местах, учреждениях и полузакрытых популяциях, где проведения исследования МАНК затруднено. Выявление нескольких положительных результатов определения АГ SARS-CoV-2 предполагает наличие вспышки COVID-19 и позволяет на раннем этапе начать введение мер инфекционного контроля. Там, где это возможно, все образцы, дающие положительные результаты определения АГ SARS-

CoV-2, должны быть доставлены в лабораторию с возможностью проведения исследования МАНК для подтверждающего тестирования;

- при расследовании вспышек (например, в закрытых или полужакрытых группах, включая школы, дома престарелых, круизные суда, тюрьмы, рабочие места и общежития и т.д.), когда первые случаи были подтверждены МАНК, определение АГ SARS-CoV-2 может быть использовано для скрининга лиц из группы риска и быстрой изоляции лиц с положительным результатом и приоритетного сбора проб для проведения диагностики COVID-19 с применением МАНК от лиц с негативным результатом определения АГ SARS-CoV-2;
- при отслеживании случаев COVID-19 в популяциях, особенно среди работников жизненно-важных специальностей, включая медицинских работников, во время вспышек или в регионах широко распространенной передачи инфекции в популяции, для раннего выявления и изоляции положительных случаев заболевания;
- выявление бессимптомных случаев, возникших после контакта с подтвержденным МАНК случаем COVID-19, однако в этой ситуации негативный результат определения АГ SARS-CoV-2 не должен исключать контактное лицо из карантинных требований.

Использование определения АГ SARS-CoV-2 не рекомендуется при обследовании популяций с предполагаемой низкой распространенностью заболевания, особенно там, где подтверждающее тестирование с помощью МАНК недоступно.

В зависимости от обстоятельств и обстановки может оказаться полезным проведение нескольких последовательных определений АГ SARS-CoV-2 у лиц, получивших отрицательный результат первого теста. Последовательное тестирование на антигены, например, в закрытых или полужакрытых группах, включая школы, дома престарелых, круизные суда, тюрьмы, рабочие места и общежития и т.д., может помочь быстро идентифицировать лиц с COVID-19 и предотвратить дальнейшую передачу. Возможно, нет необходимости проводить подтверждающее тестирование с помощью МАНК при проведении серийного тестирования на антиген у тех лиц, кто получил отрицательный результат первого теста.

Для обеспечения максимальной эффективности исследований прямыми методами этиологической диагностики (выявления РНК и антигенов SARS-CoV-2) необходимо стремиться обеспечить взятие образцов биологических материалов у пациентов с подозрением на COVID-19 в течение первых 5 дней с момента появления первых симптомов заболевания.

Определение антител к SARS-CoV-2 относится к непрямым методам этиологической диагностики COVID-19 и включает определение иммуноглобулинов классов А, М, G

(IgA, IgM, IgG, суммарных антител) к белкам коронавируса N или S, S1, S2, RBD.

Выявление антител к SARS-CoV-2 имеет вспомогательное значение для диагностики текущей инфекции и основное для оценки иммунного ответа на текущую, перенесенную инфекцию и формирование поствакцинального иммунитета. Решение о тестировании на антитела к SARS-CoV-2 принимается лечащим врачом индивидуально, исходя из клинической целесообразности.

Антитела класса А (IgA) начинают формироваться и доступны для детекции примерно со 2 дня от начала заболевания, достигают пика через 2 недели и сохраняются длительное время. Антитела класса М (IgM) начинают выявлять примерно на 7-е сутки от начала заражения, достигают пика через неделю и могут сохраняться в течение 2-х месяцев и более. Антитела класса G (IgG) к SARS-CoV-2 начинают выявлять примерно с 3-й недели или ранее. Особенностью гуморального ответа на инфекцию является небольшой временной промежуток между появлением антител IgM и IgG, а иногда и одновременное их формирование.

С целью диагностики COVID-19 непрямым методом рекомендуется проведение отдельного тестирования на антитела класса IgM/IgA и IgG, а также мониторинг появления антител в динамике (детекция сероконверсии) — повторное тестирование в неясных случаях через 5-7 дней. Для определения наличия IgG рекомендуется использовать наборы реагентов с количественным определением титра антител, что позволит оценивать напряженность иммунитета в динамике.

Тестирование на наличие антител к вирусу SARS-Cov-2 назначается исходя из клинической целесообразности. Тест на наличие антител может быть положительным через 10-14 дней от момента появления клинических симптомов. Отрицательный результат теста на антитела демонстрирует отсутствие гуморального иммунного ответа на COVID-19.

Тестирование на суммарные антитела (IgA, IgM и IgG) или IgG к SARS-CoV-2 рекомендуется проводить медработникам, которым не проводили такое исследование ранее или если был получен отрицательный результат. При появлении IgG к SARS-CoV-2 в результате перенесенной инфекции или вакцинации дальнейшее тестирование на антитела к вирусу не обязательно.

При оценке напряженности поствакцинального иммунитета методом ИФА может быть проведено определение антител к полноразмерному S-белку и/или рецептор связывающему домену (анти-RBD) с применением тест-систем/наборов реагентов, в инструкциях которых указано такое применение. Оценка поствакцинального иммунитета по уровню антител к полноразмерному S-белку и/или рецептор связывающему домену (анти-RBD) может быть затруднено в связи с особенностями вакцин (антигенов,

индуцирующим иммунную реакцию).

Направление на исследование для проведения этиологической лабораторной диагностики COVID-19

Направление в медицинскую лабораторию на исследование по выявлению РНК SARS-CoV-2 МАНК, или по определению АГ SARS-CoV-2 или по выявлению антител к SARS-CoV-2 должно быть оформлено в электронном виде (через систему удаленной электронной регистрации – для учреждений-заказчиков по системе ОМС, или в виде электронного заказа в программе МИС врачом-клиницистом), или на бумажном носителе (приложение 7).

При направлении биологических материалов для исследования в лабораторию другой медицинской организации, помимо сведений, перечисленных выше, должно быть указано:

- наименование медицинской организации, в которую направляется биологический образец;
- наименование и контактные данные медицинской организации, которую представляет медицинский работник, назначивший лабораторное исследование.

В направлениях образцов пациентов с респираторными симптомами, прибывших из стран с зарегистрированными случаями COVID-19, или относящихся к группам риска, должно быть отмечено «*cito*». Эти образцы должны направляться в лабораторию и исследоваться в приоритетном порядке.

6.1.2. Биологический материал для исследования

Взятие образцов биологических материалов для этиологической диагностики COVID-19 осуществляется вне медицинской лаборатории (см. раздел 2.3.1), медицинскими сотрудниками, не являющимися сотрудниками лабораторий. Медицинский работник, осуществляющий взятие биологического материала, его маркировку и упаковку, должен пройти инструктаж по месту работы по правилам биологической безопасности при работе с пациентами, потенциально инфицированными микроорганизмами II группы патогенности, в соответствии с действующими нормативными документами, и дать письменное согласие участвовать в проведении этих манипуляций.

Сотрудники, осуществляющие взятие биологического материала, должны быть обеспечены средствами индивидуальной защиты: респиратор СИЗОД типа FFP3 или эквивалент, или более высокий уровень защиты (пневмошлем), очки для защиты глаз или защитный экран; хирургический халат или защитный комбинезон, одноразовые перчатки медицинские смотровые (см. приложение 3).

Основным видом биологического материала для лабораторного исследования МАНК (выявление РНК SARS-CoV-2) или иммунохимическими методами (выявление АГ-

SARS-CoV-2) является материал, полученный при взятии мазка со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки.

Методами амплификации нуклеиновых кислот при признаках заболевания нижних дыхательных путей могут быть исследованы: 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 при фибробронхоскопии, мокрота (откашливаемая свободно или индуцированная ингаляцией стерильного 5 % раствора натрия хлорида через небулайзер или полученная аспирацией из трахеи). На наличие РНК SARS-CoV-2 могут быть исследованы и другие виды биологического материала: кровь (сыворотка, цельная кровь), моча, фекалии, мазки из анального отверстия, аутопсийный материал, если исследование таких материалов предусмотрено инструкцией производителя к применяемым тес-системам/наборам реагентов.

Для исследований на наличие антител (IgA, IgM, IgG или суммарных к SARS-CoV-2) основными видами биологического материала для лабораторного исследования является цельная кровь, сыворотка или плазма крови.

Приемы инструкций по взятию биологического материала приведены в Приложении 4. Взятие биологического материала проводится согласно инструкциям к тест-системам и наборам реагентов и действующими санитарными правилами.

При взятии биологического материала с применением инвазивных процедур следует применять повышенные меры предосторожности в связи с высокими рисками образования инфекционных аэрозолей и инфицирования окружающих.

Расходные материалы и оборудование, рекомендуемые для взятия биологического материала, являются изделиями медицинского назначения и должны быть зарегистрированы для использования на территории России в установленном порядке (Государственный реестр медицинских изделий (<https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch>)). Перечень расходных материалов, СИЗ, оборудование, применяемое при взятии биологических образцов, перечислены в приложении 5.

6.1.3. Упаковка, маркировка и транспортировка биологических образцов

Маркировку проб биологических материалов и их упаковку проводят специалисты, осуществляющие их взятие. Все образцы, направляемые в лабораторию, вносятся в сопроводительный лист (см Приложение 8). *Для передачи образцов внутри одного медицинского учреждения сопроводительный лист не требуется.*

Для идентификации образцов контейнеры/пробирки маркируются в месте взятия биологического материала, обеспечивающей однозначную идентификацию образца

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

Два или более образца одного пациента могут быть упакованы в один пластиковый пакет. Образцы от каждого пациента упаковываются в индивидуальный пакет с последующим объединением нескольких индивидуальных пакетов в общую упаковку -групповая упаковка.

Групповую упаковку помещают в герметично закрывающийся контейнер для транспортировки биологических материалов. Дно контейнера для транспортировки должно быть выстлано адсорбирующим материалом, пропитанным дезсредствами. Контейнер помещают в пенопластовый термоконтейнер с охлаждающими термоэлементами. Транспортный контейнер опечатывается и маркируется. В контейнер необходимо поместить одноразовый термоиндикатор, контролирующий соблюдение температуры транспортировки от 2 до 8°C.

Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера. В число сопроводительных документов также входят: акт упаковки/сопроводительного листа, доверенность на перевозку опасного груза, сопроводительное письмо от направляющей организации.

Транспортировка образцов внутри одного здания/медицинской организации осуществляется в специальных контейнерах/биксах. Пробирки/контейнеры с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные контейнеры-переноски. Допустимо хранение образцов при комнатной температуре в течение 3 часов до момента доставки в лабораторию, более длительно – при температуре от 2 до 8°C

Направления на бумажных носителях передаются в отдельном полиэтиленовом пакете.

Транспортировка/пересылка образцов из другой медицинской организации выполняется в соответствии с требованиями к пересылке инфекционных материалов II группы патогенности согласно действующим санитарными правилами.

Для идентификации образцов контейнеры/пробирки маркируются в месте взятия биологического материала с использованием самоклеящихся этикеток/перманентного маркера информацией, обеспечивающей однозначную идентификацию образца и его соответствие направлению.

Передача образцов биологического материала от пациентов с подозрением на COVID-19 проводится с предоставлением направлений и оформлением Акта приема-

передачи (см. Приложения 7, 9).

Акт оформляется в двух экземплярах, один для направившей организации, другой для принявшей образцы организации.

Для передачи образцов внутри одной медицинской организации Акт приема-передачи не требуется.

Сотрудник медицинской организации, сопровождающий контейнер с образцами, и/или водитель автомобиля, осуществляющий его перевозку, должны быть проинструктированы о правилах перевозки ПБА II группы патогенности.

6.1.4. Прием образцов для исследований в лаборатории, их оценка, выбраковка и регистрация

Биологический материал, собранный, маркированный и упакованный в соответствии с установленными правилами передается в лабораторию, в рабочую зону 1. На этапе приема, сортировки и регистрации материала лаборатория должна проводить выбраковку образцов, для которых информация в направлении не совпадает с данными на этикетке или в Акте приема-передачи, нарушены сроки и правила транспортировки, нарушена герметичность контейнеров.

Сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование (на бумажном носителе или в электронной форме), соответствие количества и номеров доставленных образцов сопроводительному листу, маркировку пробирок с образцами биологического материала, их целостность, и зарегистрировать поступивший материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме.

Непригодными для исследования являются образцы:

- немаркированные или несущие неверную (нечитаемую) маркировку;
- без указания даты взятия биологического 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);
- с визуальными признаками гемолиза и липемии (для исследований крови на наличие антител).

Данные о выбракованных образцах и причинах выбраковки образцов должны быть внесены в журнал выбраковки (см Приложение 10).

Лаборатория обязана сообщить в направившее образцы медицинское учреждение/отделение, врачу или другому уполномоченному представителю, назначившему лабораторное исследование о факте выбраковки образцов и ее причине в письменном виде (на бумажном носителе или в электронной форме), и рекомендовать повторное

взятие материала с соблюдением всех перечисленных выше правил.

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

Данные о поступивших в лабораторию образцах должны быть внесены в лабораторный журнал (см. Приложения 12 - 14).

6.1.5. Документы преаналитического этапа

Направления, сопроводительные листы, акты приема-передачи образцов могут поступить в лабораторию на бумажном носителе или в электронной форме. Документы на бумажном носителе, поступающие в отдельной пластиковой упаковке одновременно с образцами, после сверки с поступающими образцами и регистрации (присвоения лабораторного номера), должны проходить обработку при 80⁰С в сухожаровом шкафу в течение 30 минут, после этого передаваться в чистую зону для хранения в архиве.

Журнал регистрации исследований/результатов исследования (см. приложения 12-14) ведется в электронном виде или на бумажном носителе.

6.1.6. Особенности преаналитического этапа исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот и антигенов SARS-CoV-2 иммунохимическими методами. Предварительная обработка образцов

Пробирки с мазками из носоглотки и ротоглотки вместе с зондами необходимо перемешать в течение 30 сек. Некоторые виды биологического материала требуют предварительной обработки, заключающейся в гомогенизации (например, секционный материал), фракционировании путем центрифугирования (см. Приложение 6).

При проведении определения АГ SARS-CoV-2 для получения достоверных результатов необходимо соблюдать установленные в инструкции по применению применяемого набора реагентов сроки обработки образцов растворами для экстракции/инактивации.

До получения результатов исследования необходимо сохранять предварительно обработанные образцы нативного биологического материала в условиях, приведенных в Приложении 4.

6.1.7. Особенности преаналитического этапа исследования по выявлению антител к SARS-CoV-2 иммунохимическими методами. Предварительная обработка образцов

Выявление в сыворотке (плазме) крови антител к SARS-CoV-2 иммунохимическими методами исследования проводят в соответствии с действующими санитарными правилами.

До получения результатов исследования необходимо сохранять предварительно обработанные образцы нативного биологического материала в условиях, приведенных в Приложении 4.

6.2. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

6.2.1. Аналитический этап исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот

6.2.1.1. Общее описание методов амплификации нуклеиновых кислот

МАНК -методы выявления нуклеиновых кислот РНК/ДНК возбудителя в биологическом материале являются прямыми методами диагностики COVID-19, позволяющими с высокой достоверностью установить этиологию заболевания и изучить важные для принятия клинических и противоэпидемических решений характеристики возбудителя.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) – молекулярно-генетический метод, позволяющий добиться значительного увеличения (амплификации) малых концентраций определенных (специфичных) фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) возбудителя в биологическом материале (пробе) и подтвердить наличие этиологического агента в материале даже при его незначительном количестве. В Российской Федерации разработаны и разрешены к применению тест-системы/наборы реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР с обратной транскрипцией, с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP - Loop-Mediated Isothermal Amplification) - технология амплификации нуклеиновых кислот, применяемая для этиологической диагностики инфекционных заболеваний. Для диагностики COVID-19 применяется модификация этого метода, получившая обозначение RT-LAMP (Reverse Transcription-coupled LAMP), так как в ней используется ДНК-полимераза, обладающая активностью обратной транскриптазы (ревертазы). На основе RT-LAMP модификации в мире, начиная с 2009 года, были разработаны тест-системы/наборы реагентов для выявления различных РНК-содержащих вирусов.

В процессе LAMP происходит быстрое накопление продуктов реакции. Реакция проводится при одной температуре 60 – 65°C. Результаты LAMP обычно тестируют по конечному продукту. Положительная реакция позволяет определить, присутствует ли возбудитель инфекционного заболевания/целевая последовательность РНК/ДНК в образце.

Тест-системы/наборы реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 на основе

LAMP, зарегистрированные в России приведены в Государственном реестре медицинских изделий <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch>.

6.2.1.2. Выделение РНК

Качество исследования МАНК и достоверность полученных результатов зависит от полноты экстракции нуклеиновых кислот из биологических образцов и их чистоты. Для выделения нуклеиновых кислот могут использоваться ручные и автоматизированные методы выделения с использованием наборов реагентов для выделения РНК, рекомендованные производителем набора, применяемого для выявления РНК SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот. Изделия медицинского назначения - тест-системы/наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот должны быть зарегистрированы для использования как изделие медицинского назначения. Пример описания процедуры экстракции РНК вируса SARS-CoV-2 приведен в Приложении 15 «Пример описания стандартной операционной процедуры «Ручное выделение РНК SARS-CoV-2».

Экстракция нуклеиновых кислот проводится обработкой вторичного образца лизирующим раствором для обеспечения разрушения клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов.

Экстракция РНК из исследуемого материала в большинстве тест-систем проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО), представляющего собой молекулу РНК, защищенную оболочкой белка, что позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца на всех этапах исследования. Полученный при экстракции образец РНК ВКО, проходит все последующие этапы исследования: обратную транскрипцию, получение кДНК, амплификацию и регистрацию.

Для всех методов амплификации нуклеиновых кислот выделение РНК проводится в соответствии с инструкциями производителей наборов.

6.2.1.3. Обратная транскрипция и амплификация нуклеиновых кислот

Реакции обратной транскрипции и амплификации (ПЦР и LAMP) должны проводиться в соответствии с инструкцией производителя тест-системы/ набора реагентов, в том числе с учетом приборов, указанных в инструкции. Пример стандартной операционной процедуры (СОП) ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 приведен в приложении 16.

6.2.1.4. Контроль качества лабораторных исследований по выявлению РНК SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот

В дополнение к изложенному в разделе 4, для выявления ложноотрицательных

и ложноположительных результатов необходима система контроля проведения МАНК с применением контрольных образцов.

Виды контрольных образцов: внутренний контрольный образец (ВКО), положительный контрольный образец (ПКО), отрицательный контрольный образец (ОКО). Контрольные образцы входят в состав тест-системы/набора реагентов.

ВКО позволяет оценить корректность выполнения анализа на всех этапах для каждого конкретного образца, поэтому должен присутствовать в каждой пробе, добавляться к образцу перед этапом выделения, быть неконкурентным (выделяться и амплифицироваться независимо от ДНК / РНК определяемого патогена, детектироваться в отдельном канале). ВКО контролирует эффективность выделения НК (качество образцов, наличие ингибиторов, качество работы исполнителя, потери материала на этапе отмывок, ошибки дозирования), качество амплификации в каждой пробирке. ВКО необходим для определения валидности результатов исследований.

ПКО необходим для определения валидности результатов, позволяет удостовериться в сохранности смеси реагентов, контролирует работу набора реагентов в целом, помогает принять решение о клинической значимости результата в случае слабоположительных образцов. ПКО, как и все исследуемые образцы, должен проходить все стадии анализа МАНК, начиная с этапа пробоподготовки.

ОКО необходим для правильной интерпретации результатов и определения их валидности, и контролирует возникновение контаминации на стадии анализа, является показателем «чистоты» работы исполнителя анализа МАНК, контролирует качество набора реагентов. ОКО, как и все исследуемые образцы, должен проходить все стадии анализа МАНК, начиная с этапа пробоподготовки в лаборатории.

ПКО и ОКО вносят в отдельные пробирки соответственно на этапе выделения нуклеиновых кислот в каждой серии исследуемых образцов.

Внутрилабораторный контроль качества проводят в соответствии с разделом 4 и инструкциями используемых наборов реагентов. Все наборы реагентов, зарегистрированные в России для применения в здравоохранении, включают положительные и отрицательные контрольные образцы.

При отрицательных результатах исследования ПКО необходимо повторить исследование всей серии образцов с новыми реагентами.

В случае получения положительных результатов в ОКО все исходные реактивы подлежат немедленной замене. Также необходимо проведение

деконтаминационных мероприятий в соответствии Приложением 3.

6.2.2. Аналитический этап иммунохимических методов, применяемых для диагностики COVID-19

6.2.2.1. Общее описание иммунохимических методов, применяемых для диагностики COVID-19

Иммунохимические методы, применяемые для диагностики COVID-19 делятся на прямые (определение АГ SARS-CoV-2) и непрямые (определение АТ- SARS-CoV-2) и включают методы иммуноферментного анализа (ИФА), иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА), электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ЭХЛА), иммунохроматографии (ИХ, RDT- Rapid Diagnostic Test), в том числе сэндвич-иммуноанализа.

Прямой ИФА, ИХЛА или ЭХЛА основан на аффинном связывании антител из образца с иммобилизованной на твердой фазе антигеном с последующей детекцией образовавшегося иммунного комплекса с помощью антител к антителам (антиантител), конъюгированных с ферментами, за счет превращения неокрашенных (нехемилюминесцирующих) соединений в окрашенные (хемилюминесцирующие) под действием измененного в ферментативной реакции субстрата, или электрохимически на поверхности электродов в кассетах. Оптическая плотность полученного окрашенного раствора или интенсивность свечения может быть измерена и прямо пропорционально соотносится с количеством связавшегося со «связывающими» антителами антигена. При проведении ИХ вторичные антитела конъюгированы с флуоресцентной меткой, коллоидным золотом или окрашенными латексными частицами, при этом детекция сигнала осуществляется визуально, флуориметрически или колориметрически, в зависимости от типа используемого иммунохроматографического теста.

Сэндвич-иммуноанализ основан на использовании двух антител, распознающих отдельные эпитопы измеряемого анализата таким образом, что они способны связываться с анализатом одновременно. Детекция образовавшегося иммунного комплекса происходит аналогичными прямому иммуноанализу способами.

Иммунохимические методы могут быть качественными, полуколичественными и количественными, а исследование может проводиться как в ручном, полуавтоматическом или автоматическом режимах.

6.2.2.2. Аналитический этап определения антигенов SARS-CoV-2

Иммунохимические методы для определения АГ SARS-CoV-2 основаны на сэндвич-иммуноанализе. Исследование может производиться в форматах ручного (ИХ экспресс-тестов), полуавтоматического и автоматического ИФА и

ИХЛА ЭХЛА, а также в формате быстрого иммунохроматографического теста (экспресс-тест, RDT).

В случае SARS-CoV-2 целевым анализом, как правило, является нуклеокапсидный белок вируса (NP). Каждая вирусная частица содержит большое количество молекул NP по сравнению с другими белками вириона, таким образом использование NP позволяет повысить чувствительность определения АГ SARS-CoV-2.

В настоящее время определение АГ SARS-CoV-2 проводится в мазках со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки, помещенных непосредственно в экстракционный/инактивирующий буфер или транспортную среду.

Диагностические чувствительность и специфичность иммунохимического определения АГ SARS-CoV-2 могут быть ниже, чем у тестов на основе МАНК. Положительные результаты при определении АГ SARS-CoV-2 могут ожидать в тот же период развития заболевания, что и выявление РНК вируса: за 2 дня до и на протяжении 5-7 дней после появления симптомов. Положительный результат при этом может рассматриваться как подтверждение диагноза COVID-19, отрицательный результат не позволяет исключить COVID-19.

Экстракция АГ SARS-CoV-2

Качество определения АГ SARS-CoV-2 иммунохимическими методами и достоверность полученного результата зависят от полноты экстракции целевых белков-антигенов из биологических образцов и сохранения при этом их вторичной и третичной структур. Экстракция АГ SARS-CoV-2 проводится с использованием экстракционного/инактивирующего буфера, входящего в состав набора реагентов или рекомендованного производителем набора реагентов.

Определение АГ SARS-CoV-2 иммунохимическими методами должно проводиться в соответствии с инструкцией производителя применяемого набора реагентов, в том числе с применением приборов, указанных в инструкции.

6.2.2.3. Аналитический этап определения антител к SARS-CoV-2

Определение антител к возбудителю COVID-19 в биологическом материале иммунохимическими методами является непрямой методом диагностики, позволяющим установить этиологию заболевания и получить важные сведения для принятия клинических решений и оценки эпидемиологической ситуации (например, оценка популяционного иммунитета). Для определения антител к SARS-CoV-2 применяют ИФА, ИХЛА, ИХ, ЭХЛА.

Имунохимические методы определения антител к SARS-CoV-2 позволяют получить качественный результат (обнаружение или выявление антител) или

провести количественное определение антител в биологическом материале.

К важным конструктивным особенностям тест-систем для определения антител к SARS-CoV-2 относятся характеристики целевого анализата: определение антител различных классов к различным специфическим вирусным антигенам и их комбинациям, в частности, нуклеокапсидный (N) белок и spike (S или шип) белок, в составе которого особое внимание уделяется S1 субъединице и рецептор-связывающему домену (RBD).

Диагностические чувствительность и специфичность иммунохроматографического определения антител к SARS-CoV-2 могут быть ниже, чем у тестов на основе ИФА и ИХЛА ЭХЛА.

6.3. ПОСТАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

6.3.1. Общие требования к выполнению постаналитического этапа

Полученные результаты любыми методами, валидируются с учетом данных внутрилабораторного контроля качества, после чего уполномоченный сотрудник клинической лаборатории формулирует результаты исследования.

В соответствии с СП 3.1.3507-20 с изменениями от 13.11.2020 подтвержденным случаем COVID-19 считается случай, для которого был получен положительный результат лабораторного исследования любым прямым методом с использованием тест-систем/наборов реагентов, зарегистрированных в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Интерпретация результатов должна проводиться в соответствии с инструкциями производителей наборов реагентов/тест-систем и оборудования.

Заполнение журналов, оформление протоколов исследований, заключений должны проводиться в «чистой» зоне.

Результаты исследования (положительных, сомнительных, отрицательных) должны быть выданы не позднее, **чем через 48 часов после получения образцов биологического материала лабораторией**, за исключением случаев выбракованных образцов.

Результаты этиологических лабораторных исследований оформляются бланке медицинской организации в печатном виде (см. Приложения 19-20) и направляются заказчику (в том числе лечащему врачу или в медицинскую организацию), в электронном виде или на бумажном носителе, при соблюдении требований законодательства Российской Федерации по защите конфиденциальной информации и персональных данных.

6.3.2. Постаналитический этап МАНК

По завершении аналитического процесса поступающие с приборов (циклический амплификаторов/термостат) данные сохраняются как протокол исследований в электронном виде (в ЛИС или в иной электронной форме), или на бумажном носителе и как запись в журнале регистрации исследований (см. Приложение 12). Протокол каждого исследования на бумажном носителе должен содержать распечатку результатов исследования МАНК, а также результаты исследования контрольных образцов ВКО (для каждого образца), К- и К+ (для серии образцов).

6.3.3. Постаналитический этап иммунохимических методов исследований

Оценка результатов иммунохимических исследований (выявление АГ- SARS-CoV-2 и антител к SARS-CoV-2) проводится в соответствии с инструкцией производителя применяемых тест-систем/наборов реагентов и оборудования.

Интерпретация результатов иммунохимических исследований должна проводиться с учетом указанных в инструкции аналитических и диагностических характеристик используемого набора реагентов, а также при исследованиях для выявления АГ - SARS-CoV-2, распространенности COVID-19 в конкретной популяции (уровень позитивности или число случаев за предыдущие 7-10 дней), а также клинический и эпидемиологический анамнез пациента.

В большинстве случаев инструкции производителей по применению тестов на антигены указывают, что отрицательные результаты тестов следует считать «предполагаемыми», то есть предварительными. *Целесообразно подтвердить результаты определения АГ SARS-CoV-2 с помощью МАНК.*

Для определения уровней иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 количественными методами результаты исследований необходимо представлять с использованием условных единиц измерения, используемых производителем и международных единиц ВАУ/мл (binding antibody units). Единицы измерения ВАУ/мл были приняты ВОЗ в качестве международного стандарта (First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin (Human) (NIBSC code: 20/136).

При исследованиях для выявления антител ложноположительные результаты могут быть следствием наличия в крови пациента так называемых «перекрестно-реагирующих» антител, сходных по своим иммунохимическим свойствам со специфическими антителами (например, других коронавирусов, ревматоидным фактором). Ложноотрицательные результаты могут быть получены при исследовании биологических образцов, взятых

на серонегативном этапе развития инфекции, или при применении наборов реагентов (тест-систем) с низким уровнем чувствительности. Ложноотрицательные результаты могут быть получены при обследовании пациентов со сниженным иммунитетом.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты могут также появляться при нарушении правил проведения лабораторных исследований на всех этапах.

7. НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Федеральный закон от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»
2. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
3. Временные методические рекомендации по профилактике, диагностике и лечению коронавирусной инфекции (COVID 19), версия 11, утвержденные заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации от 07.05.2021
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 марта 2020 г. № 198н «О временном порядке организации работы медицинских организаций в целях реализации мер по профилактике и снижению рисков распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19»
5. Постановление главного государственного санитарного врача от 30.03.2020 № 9 «О дополнительных мерах по снижению рисков распространения COVID-19»
6. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.11.2013 № 164. Санитарные правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности) – до 1 сентября 2021г.
7. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 18.05.2010 № 58 Санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы. СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»
8. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 9.12.2010 № 163. Санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы. СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
9. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 16.03.2009 № 15. Санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы. СанПиН 2.1.7.2527-09 «Изменения № 1 к санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений»
10. 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», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 22.12.2009 г.

11. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2008 № 4 Санитарные правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (с изменениями на 29.06.2011 года) – до 1 сентября 2021г.
12. Постановление Госкомсанэпиднадзора России от 28 августа 1995 г. № 14 СП 1.2.036-95 «Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности»
13. СП 3.1.3597-20 «Санитарные правила профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 22.05.2020 N 15
14. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 13.11.2020 № 35 «О внесении изменений в постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 22.05.2020 № 15»
15. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 N 4 и вступающих в действие с 1 сентября 2021 г. (раздел IV. Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА) с 1 сентября 2021г.
16. Письмо Роспотребнадзора от 18.09.2020 №02/19400-2020-32 «Об отмене подтверждения результатов лабораторных исследований»
17. Приказ Государственного комитета по гражданскому строительству и архитектуре при Госстрое СССР от 20.07.1981 № 216. Строительные нормы СН 535-81 «Инструкция по проектированию санитарно-эпидемиологических станций»
18. Методические рекомендации МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 30.03.2020 г.
19. Методические рекомендации МР 3.1.0170-20. «3.1. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиология и профилактика COVID-19. Методические рекомендации», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 30.03.2020 г.
20. Письмо 06.03.2020 №02/3739-202 0-32 «О требованиях к организации лабораторных исследований на новую коронавирусную инфекцию (COVID-19)»
21. Методические рекомендации МР 3.1.0175-20. Изменения №1 в МР 3.1.0170-20 «Эпидемиология и профилактика COVID-19. Методические рекомендации», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 30.04.2020 г.
22. Методические указания МУК 4.2.3115 -13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 21.10.2013 г.

23. Методические указания МУ 3.1.2.3047-13 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 10.01.2013 г.
24. Методические указания МУ 3.4.3008-12 «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 28.03.2012 г.
25. Методические указания МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 23.12.2005 г.
26. Методические указания 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)», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 4.03.2004.
27. Письмо Росздравнадзора от 05.07.2021 г. № 02и-840/2 1 «О международном формате оценки уровня иммуноглобулинов, в том числе IgG, к SARS-CoV-2»
28. Руководство Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях», утвержденное Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 04.03.2004 г.
29. Клинические рекомендации «Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции». Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины», Москва, 2017.
30. Национальный Стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа», утвержденный Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. N 554-с
31. Национальный Стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности», утвержденный Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29.12.2010 г. № 1144-ст.
32. Национальный Стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р ИСО 15189-2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности», утвержденный Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27.04.2015 г. №297-ст.

8. РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю. Вирусный инфекции дыхательных путей// в кн. Пульмонология. Национальное руководство/Ред.: академик РАН А.Г. Чучалин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2016. – Глава 6, - с. 143-170
2. Львов Д.К., Колобухина Л.В., Дерябин П.Г. Коронавирусная инфекция. Тяжелый острый респираторный синдром// Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2015.- №4- с.35-42
3. Нетесова И. Г., Бобкова М.Р. Внутрिलाбораторный контроль качества неколичественных методов ИФА-определения серологических маркеров различных инфекций// Клиническая лабораторная диагностика – 2011, №2 <https://www.medlit.ru/j/kld/kld110235.htm> (обращение 29.02.2021)
4. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции у человека и животных / Ред.: академик РАН Д.К. Львов.- М.: МИА, 2013, - 1200 с
5. Панова А.Е., Куликова И.Б., Лагуткин Д.А и др. Коронавирусы - возбудители тяжелых респираторных заболеваний// Туберкулез и болезни легких-2020. Т. 98. № 7. С. 6-13
6. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г. и др. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). Инфекции и иммунитет, 2020, Т.10 (2), с.221-246
7. Яцышина С. Б., Творогова М. Г., Шипулин Г.А., Малеев В.В. Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции Лабораторная служба. 2017;6(3): 238-267
8. Aiping Wu, Yousong Peng, Baoying Huang, et al.-2020. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Cell Host&Microbe, V. 27, 3, pp. 325-328
9. Assiri A.M.D. Hospital Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. The New England Journal of Medicine. 2013; 369(5):407-16.
10. Cevik M., Tate M, Lloyd O. et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis// Lancet Microbe -. 2021 Jan;2(1):e13-e22 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33521734> (обращение 29.02.2021)
11. Corman, V. M., Muth, D., Niemeyer, D., & Drosten, C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. In: *Advances in Virus Research* -2018. -Vol. 100, pp. 163–188. Academic Press Inc., NY <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001> (обращение 29.02.2021)
12. Coronaviruses: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1282, Eds. H.J. Maier, Springer Science+Business, N.York, 2015, 283 p.
13. Evaluating and Testing Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), 2020 <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCov/hcp/clinical-criteria.html> (обращение

- 29.02.2021)
14. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* – 2015.- 1282:1–23.
 15. de Groot R.C., Cowley R., Enjuanes J. et al.- 2012. Nidovirales. In: *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Chapter: Nidovirales.* – 2020.-Eds: A.M.Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E.J. Lefkowitz.- Elsevier Academic Press, pp.785-795
 16. Guidance for Corona Virus Disease 2019. Prevention, Control, Diagnosis and Management. National Health Commission (NHC) of the PRC, National Administration for Traditional Chinese Medicine of the PRC.- 2020.- 146 p
 17. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. WHO Interim guidance 19 March 2020. 7 p. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> (обращение 29.02.2021)
 18. Masters, P.S. & Perlman, S.-2013. Coronaviridae.- *Fields Virology*, 6th Edition – 2013.- Eds D. M. Knipe & P.M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA- p. 825-858
 19. Muge Cevik, Krutika Kuppali, Jason Kindrachuk, Malic Peiris. *Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2.* //BMJ, 2020;371:m3862, doi: 10.1136/bmj.m3862
 20. Rhedin S., Lindstrand A., Rotzén-Östlund M. et al. Clinical utility of PCR for common viruses in acute respiratory illness. *Pediatrics.* – 2014 - 133(3): e538-45.
 21. Thompson R. Pandemic potential of 2019-nCoV. *The Lancet Infectious Diseases.* - 2020, Volume 20, Issue 3, p. 280-284.
 22. Wahidi M.M., Lamb C., Murgu S. et al. Statement on the use of bronchoscopy and respiratory specimen collection in patients with suspected or confirmed COVID-19 infection. - American Association for Bronchology and Interventional Pulmonology (AABIP). <https://aabronchology.org/> (обращение 29.02.2021)
 23. World Health organization. FIFTY-SIXTH WORLD HEALTH ASSEMBLY WHA56.29 28 May 2003 Severe acute respiratory syndrome (SARS). [электронный ресурс] // URL: <https://www.who.int/csr/sars/en/ea56r29.pdf> (обращение 18.05.2020)
 24. World Health organization. MERS situation update, January 2020 [электронный ресурс] // URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html> (обращение 29.02.2021)
 25. World Health Organization. Novel Coronavirus 92019-CoV). Situation report22 (11 February 2020). URL: [http://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2\(29/02/2020\)](http://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2(29/02/2020)). (обращение 18.05.2020)
 26. HO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard/ [электронный ресурс: https://covid19.who.int/?gclid=CjwKCAjwwYP2BRBGEiwAkoBpAlnhE04LXmxyA-81JraG1LnXyH4G5mgXp2_0x6sgO_PDSlAFwVi2JhoCemQQAvD_BwE

(обращение 18.05.2020)

27. Centers of Disease Control and Prevention. Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2 (Dec 2020) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>
28. Centers of Disease Control and Prevention. Guidance for SARS-CoV-2 Point-of-Care and Rapid Testing (Mar 2021) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/point-of-care-testing.html>
29. EUROPEAN COMMISSION (2020) Guidelines on COVID-19 *in vitro* diagnostic tests and their performance. OJ C 122I , 15.4.2020, p. 1–7
30. World Health Organization. 2021. SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests: an implementation guide. ISBN 978-92-4-001774-0
31. World Health Organization. (Sep 2020). Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays: Interim guidance WHO/2019-nCoV/Antigen_Detection/2020.1

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.**Инструкция по поиску тест-систем/наборов реагентов
для этиологической диагностики COVID-19**

Информация о зарегистрированных в Российской Федерации медицинских изделиях для выявления РНК и антигенов SARS-CoV-2, антител к этому возбудителю размещена в Государственном реестре медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (далее – Государственный реестр), опубликованном на официальном сайте Росздравнадзора www.roszdravnadzor.ru в разделе «Электронные сервисы» <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch/>.

Для поиска медицинского изделия возможно воспользоваться поисковой строкой сервиса «Расширенный поиск».

Строка «Расширенный поиск» позволяет осуществлять навигацию по:

- номеру регистрационного удостоверения;
- дате регистрационного удостоверения;
- наименованию и стране производителя;
- виду номенклатурной классификации медицинского изделия и др.

При использовании поисковой строки сервиса «Расширенный поиск», требуется задать необходимые критерии поиска и нажать на кнопку «Вывести результаты».

Примеры видов Номенклатурной классификации медицинских изделий, представляющих собой диагностические наборы реагентов для выявления SARS-CoV-2

Диагностические наборы реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2

№ п/п	Вид Номенклатурной классификации	Наименование вида Номенклатурной классификации медицинских изделий
1.	142160	SARS Коронавирус нуклеиновая кислота ИВД, набор, анализ нуклеиновых кислот

Диагностические наборы реагентов для выявления иммуноглобулинов к SARS-CoV-2

№ п/п	Вид Номенклатурной классификации	Наименование вида Номенклатурной классификации медицинских изделий
1	142090	SARS Коронавирус антитела класса иммуноглобулин G (IgG) ИВД, реагент

2	142060	SARS Коронавирус антитела классов иммуноглобулин А (IgA)/IgG/IgM ИВД, реагент
3	142150	SARS Коронавирус антитела класса иммуноглобулин М (IgM) ИВД, набор, иммунофлуоресцентный анализ
4	142170	SARS Коронавирус антитела класса иммуноглобулин G (IgG)/IgM ИВД, контрольный материал

Экспресс-тесты для выявления иммуноглобулинов к SARS-CoV-2

№ п/п	Вид Номенклатурной классификации	Наименование вида Номенклатурной классификации медицинских изделий
1	142250	SARS Коронавирус антитела иммуноглобулин А (IgA)/IgG/IgM ИВД, набор, иммунохроматографический анализ, экспресс-анализ

Диагностические наборы реагентов для выявления антигена SARS-CoV-2

№ п/п	Вид Номенклатурной классификации	Наименование вида Номенклатурной классификации медицинских изделий
1	142010	SARS Коронавирус антигена ИВД, набор, иммунохроматографический анализ, экспресс-анализ

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.**Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения ПЦР-РВ исследования SARS CoV2, в соответствии с этапами проведения анализа**

Приведен пример материально-технического оснащения для «ручного» выделения РНК и одной их тест-систем/наборов реагентов. При применении других тест-систем/наборов реагентов и/или автоматических систем материально-техническое оснащение зон может отличаться от приведенного в примере.

Рабочая зона 1 приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала
Шкаф (бокс) биологической безопасности II класса защиты.
Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8°C и не выше минус 16°C (для хранения исследуемого материала). Возможно, отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8°C и морозильника, с камерой поддерживающей температуру не выше минус 16°C.
Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл; 50мл.
Набор автоматических пипеток переменного объема 100-1000; 10-100 мкл.
Микроцентрифуга /вортекс
Емкость с дезинфицирующим раствором, ветошь для обработки.
Одноразовые пластиковые контейнеры для медицинских отходов
Рабочая зона 2 выделения нуклеиновых кислот
Шкаф (бокс) биологической безопасности II класса защиты.
Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8°C и не выше минус 16°C (для хранения исследуемого материала). Возможно, отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8°C и морозильника, с камерой поддерживающей температуру не выше минус 16°C.
Микроцентрифуга / вортекс
Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл до 16000 об/мин.
Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
Штатив для микропробирок объемом 1,5/2,0 мл.
Термошейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 600–1300 об/мин и с диапазоном рабочих температур 60–90°C.

Набор автоматических пипеток переменного объема 100-1000; 20-200; 10-100.
Магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот для микропробирок объемом 1,5/2,0мл.
Емкость с дезинфицирующим раствором, ветошь для обработки.
Одноразовые пластиковые контейнеры для медицинских отходов
Рабочая зона 3 проведения обратной транскрипции, реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции
Амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа
ПЦР-бокс
Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8°C и не выше минус 16°C (для хранения исследуемого материала). Возможно, отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8°C и морозильника, с камерой, поддерживающей температуру не выше минус 16°C.
Штатив для микропробирок 1,5/2,0мл и 0,2мл.
Микроцентрифуга для стрипов.
Мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200 об/мин.
Набор автоматических пипеток переменного объема 10-100; 0,5-10.
Нож канцелярский и ножницы.
Емкость с дезинфицирующим раствором, ветошь для обработки.
Одноразовые пластиковые контейнеры для медицинских отходов

ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

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:

- ручки холодильников;
- рукоятки ламинарных шкафов;
- поверхность встряхивателя;
- рукоятки пипеток в зоне ПЦР;
- поверхность термостата;
- рукоятки пипеток в зоне выделения НК;
- ручки двери;
- корпус и блоки приборов для ПЦР;
- клавиатура компьютеров;
- 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 тампоном из вискозы смочить в подготовленной пробирке с 300 мкл ТЕ-буфера.
3. Вращательными движениями протереть поверхности объекта соответственно контрольным точкам.
4. После взятия смыва зонд поместить в микропробирки с ТЕ-буфером, вращать в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удалить зонд в емкость для отходов.
5. Для взятия смывов с каждой новой контрольной точки использовать отдельный зонд.
6. Провести ПЦР (без экстракции) 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+) контроли 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, который был использован в качестве среды для смывов.

Поверхности контрольных точек, где выявлены положительные результаты ПЦР-анализа смывов, подвергаются обработке раствором, содержащим дихлоризоциануровую кислоту 0,1% 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

Техника взятия биологических материалов и условия их хранения

Мазки со слизистой оболочки верхних дыхательных путей (носо- и ротоглотки)

Мазки со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки являются основным видом биоматериала для лабораторного исследования для диагностики COVID-19.

Не рекомендуется за 3–4 часа до взятия биоматериала употреблять пищу, пить, чистить зубы, полоскать рот/горло, промывать нос, жевать жевательную резинку, курить, использовать пастилки для освежения дыхания. 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.

Мазки со слизистой носоглотки берут сухим стерильным назофарингеальным зондом 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 (не менее 5 – 6 см у взрослых и 3–4 см – у детей).

Тем же зондом берут мазок из второго носового хода (для повышения количества вирусных частиц в образце).

После взятия материала конец зонда с тампоном опускают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой до места слома, 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, аккуратно прижимая язык пациента шпателем. После взятия материала рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку с транспортной средой и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда с тампоном отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку.

НЕЛЬЗЯ ОБРЕЗАТЬ ЗОНДЫ НОЖНИЦАМИ!

При использовании стандартных зондов при взятии больше одного образца, во избежание контаминации образцов, рекомендуется отламывать свободный конец зонда на высоте 6- 6,5 см и использовать пробирки высотой не ниже 8 см.

Транспортная среда в пробирках для взятия мазков должна быть выбрана, с учетом рекомендаций производителя применяемых тест-систем/наборов реагентов МАНК). Для повышения концентрации вируса носоглоточные и орофарингеальные мазки должны быть помещены в одну пробирку. Температура при транспортировке должна быть $+2^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С. Время хранения образцов до исследования не должна превышать 5 дней при $+2^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С, может быть больше при -20° С или -70° С.

Мокрота и индуцированная мокрота

При признаках заболевания нижних дыхательных путей исследуется мокрота. При наличии у больного мокроты при глубоком откашливании ее собирают в стерильные одноразовые герметично закрывающиеся контейнеры с горлышком шириной не менее 30 мм, объемом 30 – 50 мл. Мокроту собирают 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, после чего пациент откашливает мокроту в контейнер. Мокроту помещают в стерильные одноразовые пластиковые контейнеры.

Получение индуцированной мокроты. С целью облегчения отхождения мокроты используют упражнения дыхательной гимнастики. Наибольшего эффекта достигают с помощью ингаляций с использованием гипертонического раствора хлорида натрия. 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.

Допускается хранение и транспортировка образцов мокроты в течение 1 суток при температуре 2 – 8 $^{\circ}$ С, более длительно - при температуре не выше -20° С.

Эндотрахеальные аспираты

В случае если мокрота не откашливается, процедуру рекомендуется комбинировать с последующим получением аспиратов из трахеи (эндотрахеальные аспираты) - извлечение содержимого из трахеи с помощью стандартного отсоса с использованием стерильного катетера.

Получение эндотрахеального аспирата проводят натощак 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 взятия 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. Объем трахеального аспирата должен составлять не менее 3-5 мл; аспират помещают в стерильные одноразовые пластиковые контейнеры.

Хранение и транспортировка образцов может проводиться при температуре $+2^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С. Время хранения образцов до исследования не должна превышать 48 часов дней $+2^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С, более - при -20° С или -70° С.

Бронхоальвеолярный лаваж

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов, получаемые при фибробронхоскопии, собирается в стерильный одноразовый контейнер с закручивающейся герметичной пробкой. Транспортировка образцов может проводиться при температуре $+2^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С. Время хранения образцов до исследования не должна превышать 48 часов при $+2^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С, более – при -20° С или -70° С.

Аутопсийный материал

Для исследования забираются образцы тканей 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. Размер взятого образца должен быть не менее 1-3 см³. Ткани аутопсии, включая легкие, забирают стерильным индивидуальным инструментом из зоны поврежденной ткани стерильными инструментами (индивидуально для каждого органа). Помещаются в одноразовые стерильные пластиковые контейнеры с герметично завинчивающейся крышкой, с физиологическим раствором, содержащим противогрибковые и антибактериальные

препараты. Образцы замораживают и хранят при температуре не выше минус 20°C. Материал для исследования должен быть нативным (без фиксации формалином). Время хранения образцов до исследования не должна превышать 24 часов при +2⁰-+8⁰ С, более - при -20⁰ С или -70⁰ С.

Инструкции по взятию образца капиллярной крови из пальца:

Вымойте руки теплой мыльной водой и тщательно вытрите руки или используйте дезинфицирующее средство для рук на спиртовой основе.

Наденьте медицинские перчатки.

Попросите пациента опустить руку, при необходимости осуществите массажирование руки, чтобы улучшить приток крови к пальцам.

Для отбора образцов используйте средний или безымянный палец. Найдите место прокола - оно должно быть немного смещено от центра (с боковой стороны) на мясистой части кончика пальца.

Очистите место прокола салфеткой с дезинфицирующим раствором и дайте ему высохнуть на воздухе.

Используйте одноразовый скарификатор или ланцет для прокола пальца. Следуйте инструкциям производителя при их использовании.

После прокола пальца осторожно сожмите его основание, чтобы в месте прокола образовалась капля крови. Избегайте многократного или слишком сильного сжатия пальца. Вытрите первую каплю крови и следуйте инструкциям производителя по заполнению пробирки для взятия капиллярной крови или нанесите вторую каплю крови на тестовое устройство.

Утилизируйте использованные устройства сразу же после использования в специальный контейнер для острых предметов.

Сильно надавите на место прокола чистой марлей в течение 5-10 секунд после сбора образца, чтобы убедиться, что кровотечение остановилось. При необходимости можно нанести на место прокола медицинский лейкопластырь.

Правильно снимите перчатки и утилизируйте их в соответствующие емкости. Рекомендуется менять перчатки между пациентами. Перед тем, как прикасаться к чистым поверхностям, перчатки необходимо снять, чтобы избежать потенциального переноса крови на них.

Тщательно вымойте и высушите руки сразу после снятия перчаток и перед тем, как прикасаться к медицинским принадлежностям, предназначенным для использования другими людьми.

Время, режим транспортировки и хранения образцов до исследования зависит от

используемой тест-системы и указаны в инструкции к ней.

Инструкции по взятию образца венозной крови:

Придерживайтесь стандартного алгоритма действий для осуществления взятия образца венозной крови.

Для получения образцов венозной крови рекомендуется использование вакуумных систем, позволяющие максимально обезопасить медицинских работников и обследуемых, исключив прямой контакт с кровью пациента, обеспечит стандартизацию взятия (взятие образцов проводится по однотипной методике, точное соотношение объёма крови количеству реагента и чёткая идентификация по цветовому коду и этикетке).

Необходимо выбирать пробирки для получения того образца крови (сыворотка или определенная плазма), которая может быть использована при работе с конкретной тест-системой или набором реагентов.

Пробирки с кровью для иммунохимических исследований транспортируют в термоконтейнерах с надписью: «пробы крови для лабораторных исследований». В термоконтейнере должна поддерживаться температура от 4 до 8°C. Пробы крови от больного с установленным диагнозом COVID-19 помещают в дополнительный вторичный контейнер, затем – в термоконтейнер с надписью: «пробы с инфицированным материалом».

Образцы крови должны быть доставлены в лабораторию в кратчайшие сроки, с учетом. В журнале учета лабораторных исследований регистрируют время доставки проб в лабораторию. *Сроки, режим транспортировки и условия хранения образцов биологического материала для иммунохимических исследований определены производителями тест-систем/наборов реагентов и описаны в инструкции.*

Как правило, допустимо хранение образцов цельной крови:

- при температуре 20–25°C — не более 2 часов;
- при температуре 2–8°C — не более 6 ч с момента взятия материала.

Сроки хранения проб сыворотки при температуре 2–8°C – не более 4 дней. Хранение проб сывороток от 5 дней до 1 года осуществляют в замороженном виде при температуре не выше минус 18°C. Длительное хранение проб (более года) осуществляется при температуре не выше минус 40°C.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5.

Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала

1. гибкий назофарингеальный тампон на пластиковом аппликаторе. Используется для получения материала из носоглотки у детей и желательнее, у взрослых;
2. зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы) в индивидуальной упаковке, стерильный - зонд для сбора мазков из ротоглотки. Допустимо использовать для получения материала из носоглотки у взрослых;
3. одноразовые шпатели;
4. транспортная среда аликвотированная в одноразовые стерильные пробирки из полипропилена рекомендованная производителем тест-системы;
5. герметичные одноразовые полипропиленовые контейнеры для мокроты, аспириатов, БАЛ;
6. вакуумные системы для получения аспириатов;
7. небулайзер для проведения манипуляций с целью облегчения эвакуации мокроты;
8. респираторы типа FFP2 или их эквивалент;
9. очки для защиты глаз или защитный экран;
10. противочумный или ламинированный хирургический халат или комбинезон, шапочка;
11. бахилы;
12. перчатки латексные.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6.

Предварительная обработка биологического материала

При проведении предварительной обработки и подготовки материала необходимо учитывать рекомендации производителей рекомендуемых тест-систем/наборов реагентов.

Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки

Транспортный раствор с погруженными в него зондами с биоматериалом тщательно перемешивают на встряхивателе типа «Вортекс». Через 5 минут пробирку открывают и стерильной пипеткой переносят 1 млв микропробирку объемом 1,5-2,0 мл с замком (safe-lock).

Мокрота или аспират из трахеи

Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке реагентом рекомендованным производителем тест-системы.

Если производители применяемой тест-системы/набора реагентов МАНК рекомендуют другой метод пробоподготовки, следует выполнять их рекомендации.

Бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов

Образец перемешивают переворачиванием в контейнере, в котором поступил образец. 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 НК. При необходимости повторного проведения анализа оставшийся материал замораживают.

Аутопсийный материал

Секционный материал гомогенизируют в стерильных фарфоровых ступках, затем готовят 10 % суспензию в 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. Для повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

Для предварительной обработки секционного материала допускается использование гомогенизаторов, однако только в случае наличия соответствующих рекомендаций в инструкции к биологическому набору для ПЦР, по применению гомогенизатора конкретного производителя и известных параметров обработки, подобранных для конкретной ткани или органа (частота вибраций, время обработки, объем образца и, при необходимости, использование дополнительных реагентов).

ПРИЛОЖЕНИЕ 7.**Примеры направления на исследование
для этиологической диагностики COVID-19****Направление на проведение ПЦР-исследования для выявления РНК SARS-CoV -2
(в электронной форме или на бумажном носителе)**Наименование направляющего учреждения _____
_____.

Фамилия И.О. направившего врача * _____.

Дата назначения исследования г.

Фамилия пациента _____

Имя пациента _____

Отчество пациента _____

Год рождения Пол: М Ж

Адрес фактического места жительства _____

Материал: мазки из носо- ротоглотки другой** указать какой _____

Предварительный диагноз*** _____

Дата взятия материала г. Время :

Фамилия И.О., осуществившего взятие материала _____

Контактный телефон**** _____

**указать фамилию, имя, отчество (при наличии) и должности врача либо другого
уполномоченного представителя, назначившего лабораторное исследование****указать вид биологического материала*****указать предварительный диагноз заболевания: «пневмония» или «ОРВИ» или «обследование
контактировавших лиц на SARS-CoV-2»****** указать телефон, по которому может быть сообщена информация по исследованию образца в
экстренных случаях*

Пример направления на определение антигенов SARS-CoV-2/ антител к SARS-CoV -2 иммунохимическими методами

Направление на проведение исследования для выявления АГ SARS-CoV -2/антител к SARS-CoV -2 (в электронной форме или на бумажном носителе)

Наименование направляющего учреждения _____

Фамилия И.О. направившего врача * _____

Дата назначения исследования г.

Фамилия пациента _____

Имя пациента _____

Отчество пациента _____

Год рождения Пол: М Ж

Адрес фактического места жительства _____

Материал: мазки из носо- ротоглотки другой** указать какой _____

Предварительный диагноз*** _____

Дата взятия материала г. Время :

Фамилия И.О., осуществившего взятие материала _____

Контактный телефон**** _____

* указать фамилию, имя, отчество (при наличии) и должности врача либо другого уполномоченного представителя, назначившего лабораторное исследование

** указать предварительный диагноз заболевания: «пневмония» или «ОРВИ» или «обследование контактировавших лиц на SARS-CoV-2»

*** указать телефон, по которому может быть сообщена информация по исследованию образца в экстренных случаях

ПРИЛОЖЕНИЕ 8.**Форма сопроводительного листа для передачи биологических образцов в лабораторию**

Для передачи образцов внутри одного медицинского учреждения сопроводительный лист не требуется

СОПРОВОДИТЕЛЬНЫЙ ЛИСТ

доставки образцов в лабораторию для выявления

РНК SARS-CoV-2/ АГ SARS-CoV-2/антител к SARS-CoV-2 (оформляется в двух экземплярах)

Учреждение, направившее биоматериал _____

Дата доставки образцов _____

№ п/п	Заполняется ответственным за сбор в отделении медработником				Заполняется ответственным за прием биоматериала в лаборатории
	Фамилия Ф.И.О. пациента	Вид биолог. материала	Время сбора Дата/часы	Дополнительная информация*	Отметка о качестве
1	2	3	4	5	6
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Фамилия И.О. ответственного за сбор биологического материала _____

Фамилия И.О. принявшего материал _____

Дата получения образцов _____

* Например «cito»

ПРИЛОЖЕНИЕ 9.

Пример акта приема-передачи биологических образцов

АКТ

приема-передачи образцов ПБА для исследования на SARS-CoV-2 (в двух экземплярах)

Для передачи образцов внутри одного медицинского учреждения Акт приема-передачи не требуется

Наименование учреждения,
направившего образцы ПБА

Наименование учреждения и
лаборатории, принявших образцы
ПБА для исследования

Дата и время передачи образцов:

_____ 20____ . _____

Образцы в количестве _____
переданы

Образцы в количестве _____
приняты

Фамилия, имя, отчество и подпись
передавшего образцы сотрудника

Фамилия, имя, отчество и подпись
принявшего образцы сотрудника

ПРИЛОЖЕНИЕ 10.**Пример журнала выбраковки образцов**

(в электронной форме или на бумажном носителе)

ЖУРНАЛ ВЫБРАКОВКИ ОБРАЗЦОВ

Дата поступления образца	№ сопроводит. листа	№ образца	Ф.И.О. пациента	Материал	Причины выбраковки	Ф.И.О. и подпись сотрудника, выбраковавшего материал	Информация о выбраковке передана письменно/устно	Информация передрана ФИО	Дата передачи информации

Инструкция к заполнению:

Дата поступления образца – дата приема образца в лаборатории. Должна совпадать с датой приема образца в акте приема-передачи

№ сопроводительного листа – номер сопроводительного листа, в который внесен образец

№ образца – номер образца в сопроводительном листе

Ф.И.О. пациента – фамилия и инициалы имени и отчества пациента, от которого взят образец (из сопроводительного листа и направления)

Материал – вид материала (из сопроводительного листа и направления). Обозначается цифрой: мазок из носо-и/или ротоглотки;

- | | | |
|------------------------------|--|----------------|
| 1 - мокрота; | 4 - назофарингеальный аспират; | 7 - сыворотка; |
| 2 - бронхальвеолярный лаваж; | 5 - биопсийный или аутопсийный материал; | 8 - моча; |
| 3 - (эндо)трахеальный; | 6 - цельная кровь; | 9 - другое. |

Причины выбраковки – указать причины выбраковки цифрой:

- 1 - несовпадение данных в направлениях, сопроводительном листе и данных на контейнере с образцом;
- 2 - немаркированные или несущие неверную (нечитаемую) маркировку образцы;

3 - образцы, для которых не указана дата взятия биологического материала;

4 - образцы, хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением требований, установленных для данного типа биологического материала;

5 - образцы с нарушением целостности и/или герметичности тары (пробирок и др.) (в т.ч. пролитые образцы).

Ф.И.О. и подпись сотрудника, выбраковавшего материал - указать Ф.И.О. и подпись сотрудника лаборатории, выбраковавшего материал

Информация о выбраковке передана письменно/устно – указать способ передачи информации о выбраковке цифрой:

1 - письменно;

2 - устно по телефону.

Информация передана ФИО – указать Ф.И.О. сотрудника, направившего образцы подразделения/медицинского учреждения, направившего выбракованный образец, которому передана информация о выбраковке

Дата передачи информации – дата передачи информации о выбраковке

ПРИЛОЖЕНИЕ 11.**Пример журнала регистрации поступивших в лабораторию тест-систем/наборов реагентов**

(в электронной форме или на бумажном носителе)

№	Дата поступления в лабораторию	Наименование набора реагентов/ номер регистрационного удостоверения *	Серия/ лот	Срок годности	Номер первого образца* *	Номер последнего образца ***	Примечание

**наименования набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот и/или для выявления специфических фрагментов нуклеиновых кислот и номер регистрационного удостоверения*

*** номер образца, с которого начали использовать набор реагентов*

**** номер образца, на котором прекратили использовать набор реагентов*

ПРИЛОЖЕНИЕ 12.

Примерная форма лабораторного журнала регистрации результатов исследования биологического материала на SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ

(наименование учреждения
здравоохранения)

(адрес)

(отделение)

ЛАБОРАТОРНЫЙ ЖУРНАЛ

регистрации результатов исследования биологического материала на SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ

(в электронной форме или на бумажном носителе)

Начат: «__» _____ 20__ г.

Окончен: «__» _____ 20__ г.

№ п/п	Дата взятия биоматериала	Дата проведения исследования	Лабораторный регистрационный номер	ФИО пациента	Год рождения	Адрес / отделение	Материал ¹	Номер партии исследований	Результат контроля качества		Результат ⁵	ФИО врача ⁶	Дата выдачи результата
									ВКО ⁴ «+» - пройден «-» не пройден	Маркеры РНК SARS CoV-2 «+» - положит «-» - отрицат, сомнительный			
*Наименование тест-системы для выделения НК _____									РУ _____	серия _____	срок годности _____		
*Наименование тест-системы для обнаружения SARS-Cov-2 _____									РУ _____	серия _____	срок годности _____		
				ФИО пациента				1	+ пройден				
				ФИО пациента				1	- не пройден				
				ПКО ²				1		+ пройден			
				ОКО ³				1		- пройден			
				ФИО				2					
				ФИО				2					
				ПКО				2					
				ОКО				2					

* Заполняется на каждую новую партию наборов реагентов.

Инструкция по заполнению

¹ Материал для исследования: 1- мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки; 2- промывные воды бронхов, полученные при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж); 3- (эндо)трахеальный, назофарингеальный аспират; 4 – мокрота, биопсийный или аутопсийный материал легких; 5- цельная кровь, сыворотка; 6- моча

² ПКО – положительный контрольный образец. В графу «Специфические фрагменты» вносится результат исследования «+» или «-». Если результат положительный, вносится «пройден», если отрицательный – «не пройден». Контроль с применением ПКО ставится для каждой партии исследуемых образцов (один на партию). При отрицательном значении ПКО возможно ложноотрицательные результаты в этой партии. Все образцы этой партии должны быть повторно исследованы, начиная с экстракции нуклеиновых кислот.

³ *ОКО* – отрицательный контрольный образец. В графу «Специфические фрагменты» вносится результат исследования «+» или «–». Если результат отрицательный, вносится «пройден», если положительный – «не пройден». Контроль с применением *ОКО* ставится для каждой партии исследуемых образцов (один на партию). При положительном значении *ПКО* результаты исследования могут быть ложноположительными. Все образцы этой партии должны быть повторно исследованы, начиная с экстракции нуклеиновых кислот.

⁴ *ВКО* – внутренний контрольный образец. Вносится результат «пройден» (если результат тестирования *ВКО* положительный), или «не пройден» (если результат тестирования *ВКО* отрицательный). *ВКО* контролирует эффективность выделения НК (качество образцов, наличие ингибиторов, качество работы исполнителя, потери материала на этапе отмывок, ошибки дозирования), качество амплификации в каждом образце.

⁵ Результат исследования вносится в журнал в кратком виде:

- SARS-CoV-2 обнаружен / не обнаружен;

результат сомнителен;

- результат не валиден;
- рекомендуется повторное выделение РНК и амплификация;
- рекомендуется повторное взятие материала.

Результат оформляется с учетом результатов исследования *ПКО*, *ВКО*, данных о качестве собранного материала, времени его доставки и хранения до поступления в лабораторию, наличия прочих отклонений от установленных правил исследования.

⁶ Ф.И.О. специалиста, вносящего результат исследования.

ПРИЛОЖЕНИЕ 13.

Примерная форма лабораторного журнала регистрации результатов определения антител к SARS-CoV-2 в биологическом материале

(наименование учреждения
здравоохранения)

(адрес)

(отделение)

ЛАБОРАТОРНЫЙ ЖУРНАЛ

регистрации результатов исследования биологического материала на выявление антител к SARS-CoV-2 иммунохимическими методами

№ п/п	Дата взятия биоматериала	Дата проведения исследования	Лабораторный регистрационный номер	ФИО пациента	Год рождения	Адрес / отделение	Материал ¹	Номер партии исследованных	Результат контроля качества	Результат исследования (с указанием вида антител к вSARS CoV-2) ³	ФИО врача ⁴	Дата выдачи результата
* Наименование тест-системы для выявления АТ к SARS-Cov-2 _____ РУ _____ серия _____ срок годности _____												
				ФИО пациента				1				
				ФИО пациента				1				
				ПКО ¹				1	+ пройден			
				ОКО ²				1	- пройден			
				ФИО				2				
				ФИО				2				
				ПКО				2	+ пройден			
				ОКО				2	- не пройден			

Инструкция по заполнению

¹ ПКО – положительный контрольный образец, при его наличии в составе набора реагентов. В графу «Результат» вносится результат исследования «+» или «-». Если результат положительный, вносится «пройден», если отрицательный – «не пройден». Контроль с применением ПКО ставится для каждой партии исследуемых образцов (один на партию). При отрицательном значении ПКО возможно ложноотрицательные результаты в этой партии. Все образцы этой партии должны быть повторно исследованы.

² ОКО – отрицательный контрольный образец. В графу «Результат» вносится результат исследования «+» или «-». Если результат отрицательный, вносится «пройден», если положительный – «не пройден». Контроль с применением ОКО ставится для каждой партии исследуемых образцов (один на партию). При положительном значении ОКО результаты исследования могут быть ложноположительными. Все образцы этой партии должны быть повторно исследованы

³ *Результат оформляется с учетом результатов исследования ПКО, ВКО, данных о качестве собранного материала, времени его доставки и хранения до поступления в лабораторию, наличия прочих отклонений от установленных правил исследования.*

⁴ *Ф.И.О. специалиста, составляющего заключение.*

ПРИЛОЖЕНИЕ 14.

Примерная форма лабораторного журнала регистрации результатов определения антигенов SARS-CoV-2 в биологическом материале

(наименование учреждения
здравоохранения)

(адрес)

(отделение)

ЛАБОРАТОРНЫЙ ЖУРНАЛ

**регистрации результатов определения АГ SARS-CoV-2 в биологическом материале
(в электронной форме или на бумажном носителе)**

Начат: «__» _____ 20__ г.

Окончен: «__» _____ 20__ г.

№ п/п	Дата взятия биоматериала	Дата проведения исследования	Лабораторный регистрационный номер	ФИО пациента	Год рождения	Адрес / отделение	Номер партии исследованной	Результат контроля качества	Результат исследования ³	ФИО врача ⁴	Дата выдачи результата
*Наименование тест-системы для обнаружения АГ SARS-Cov-2 _____ РУ _____ серия _____ срок годности _____											
				ФИО пациента			1				
				ФИО пациента			1				
				ПКО ¹			1	+ пройден			
				ОКО ²			1	- пройден			
				ФИО			2				
				ФИО			2				
				ПКО			2				
				ОКО			2				

* Заполняется на каждую новую партию наборов реагентов.

Инструкция по заполнению

¹ ПКО – положительный контрольный образец, при его наличии в составе набора реагентов. В графу «Результат» вносится результат исследования «+» или «-». Если результат положительный, вносится «пройден», если отрицательный – «не пройден». Контроль с применением ПКО ставится для каждой партии исследуемых образцов (один на партию). При отрицательном значении ПКО возможно ложноотрицательные результаты в этой партии. Все образцы этой партии должны быть повторно исследованы.

² ОКО – отрицательный контрольный образец. В графу «Результат» вносится результат исследования «+» или «-». Если результат отрицательный, вносится «пройден», если положительный – «не пройден». Контроль с применением ОКО ставится для каждой партии исследуемых образцов (один на партию). При положительном значении ПКО результаты исследования могут быть ложноположительными. Все образцы этой партии должны быть повторно исследованы

3 Результат исследования вносится в журнал в кратком виде:

- SARS-CoV-2 обнаружен / не обнаружен;*
- результат сомнителен;*
- результат не валиден;*
- рекомендуется повторная экстракция АГ и исследование;*
- рекомендуется повторное взятие материала.*

Результат исследования оформляется с учетом результатов исследования ПКО, ВКО, данных о качестве собранного материала, времени его доставки и хранения до поступления в лабораторию, наличия прочих отклонений от установленных правил исследования.

4 Ф.И.О. специалиста, вносящий результат исследования.

ПРИЛОЖЕНИЕ 15.**Пример описания стандартной операционной процедуры «Ручное выделение РНК SARS-CoV2»**

Ниже представлен пример формы стандартной операционной процедуры (СОП). Содержание разделов в приведенном примере может отличаться от описания процедуры в других лабораториях. Содержание СОП должно соответствовать выполнению процедуры в конкретной лаборатории, применяемому оборудованию, инструкциям производителей применяемых в лаборатории тест-систем и оборудования.

Название медицинской организации
Название лаборатории

СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

Название СОП	Ручное выделение НК набором «XXXX ¹ », NNNN ²		
СОП №: ³	00067	Дата вступления в силу:	23.03.2020
Версия № ⁴	1	Количество копий 3	Копия №1 ⁵
Дата вступления в силу после пересмотра	Не пересматривался	Страницы с 1 по 11	

Составили: ФИО Подпись(и): _____ Дата: _____	Проверил(и): ФИО Подпись(и): _____ Дата: _____
Утвердил: заведующий лабораторией Ф.И.О. уполномоченного лица (если назначен): _____ Подпись: _____ Дата: _____	Утвердил: заместитель по качеству Ф.И.О. уполномоченного лица (если назначен): _____ Подпись: _____ Дата: _____
Ежегодное подтверждение (если никаких обновлений / поправок не сделано) Ф.И.О.: _____ Подпись: _____ Дата: _____	Ежегодное рассмотрение (если никаких обновлений / поправок не сделано) Ф.И.О.: _____ Подпись: _____ Дата: _____

- 1 Название набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот
- 2 Название производителя набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот
- 3 Номер документа в системе документов лаборатории клинической микробиологии
- 4 Номер версии документа – СОП может пересматриваться. Пересмотренный документ будет иметь тот же номер, но другой номер версии
- 5 Номер копии, находящийся в кабинете заведующего лабораторией – из раздела б

История изменений:

Дата	Версия	Разделы	Поправки
дата	1	Формат СОП	1. СОП был создан впервые

СОДЕРЖАНИЕ**1. ЦЕЛИ****2. ОБОЗНАЧЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ, СИМВОЛЫ****3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ**

- 3.1. Медицинские требования
- 3.2. Образование и обучение(инструктаж)
- 3.3. Дополнительные требования

4. ОПИСАНИЕ

- 4.1. Клинические показания
- 4.2. Материал
- 4.3. Оборудование
- 4.4. Принцип метода
- 4.5. Реагенты и расходные материалы
- 4.6. Подготовка наборов реагентов
- 4.7. Контроли
- 4.8. Обработка образцов
 - 4.8.1. Обработка образцов мазков рото- и носоглотки из транспортной среды
 - 4.8.2. Обработка образцов из сухих мазков рото- и носоглотки.
 - 4.8.3. Обработка образца из мокроты и бронхоальвеолярного лаважа
- 4.9. Выделение НК
- 4.10. Уборка рабочего места и утилизация отходов

5. СВЯЗАННЫЕ ДОКУМЕНТЫ**6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКЗЕМПЛЯРОВ СОП****1. ЦЕЛИ**

Данный СОП описывает процедуру ручного выделения НК набором «XXXX».

2. ОБОЗНАЧЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ, СИМВОЛЫ

СОП	Стандартная операционная процедура
НК	Нуклеиновая кислота
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
БББ	Бокс биологической безопасности
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ОТ-ПЦР	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПКО	Положительный контрольный образец
ВКО	Внутренний контрольный образец
ОКО	Отрицательный контрольный образец

ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

3.1. Медицинские требования

В соответствии с Федеральными законами и санитарными правилами к работе с патогенными микроорганизмами II и III групп патогенности допускаются специалисты, не имеющие медицинских противопоказаний к работе в медицинской микробиологической лаборатории, в том числе к вакцинации. Контроль за состоянием здоровья сотрудников включает:

- ежедневное термометрирование;
- ежегодная диспансеризация;
- исследование мазков из носо- ротоглотки на содержание SARS-CoV-2.

Индивидуальные медицинские карты сотрудников хранятся у цехового врача.

3.2. Образование и обучение (инструктаж)

К работе допускаются:

- специалисты с высшим образованием, прошедших обучение в соответствии с действующим профессиональным стандартом специалиста клинической лабораторной диагностики, врачи–бактериологи или врачи–медицинские микробиологи, биологи, имеющие удостоверение о повышении квалификации по специальностям «клиническая лабораторная диагностика» и/или «бактериология»;
- специалисты со средним медицинским образованием, имеющие сертификат или свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Лабораторная диагностика» или «Бактериология»;
- все специалисты, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19 методами МАНК должны пройти инструктаж по работе с ПБА II группы патогенности» и иметь дополнительное профессиональное образование (повышение квалификации) по применению методов молекулярно-генетических

методов для диагностики инфекционных заболеваний.

3.3. Дополнительные требования

Все сотрудники лаборатории, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19 должны пройти инструктаж и дать согласие на работу с микроорганизмами II группы патогенности.

4. ОПИСАНИЕ

4.1. Клинические показания

Набор реагентов «XXXX» предназначен для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из клинических образцов.

4.2. Материал

- Мазки из рото- и носоглотки;
- мокрота;
- бронхоальвеолярный лаваж.

4.3. Оборудование

- магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот;
- штативы для микропробирок вместимостью 2,0 мл и 0,2 мл;
- штатив для пробирок на 2,0 мл;
- термошейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 600–1300 об/мин и температуре (60–90)°С;
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс»;
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом (с диапазонами 100-1000; 20-200; 10-100 мкл);
- отсасыватель медицинский;
- ламинарный бокс 2 класса биологической защиты;
- настольная микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin»;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8)°С.

4.4. Принцип метода

Принцип действия набора «XXXX» состоит в температурной обработке пробы многокомпонентным лизирующим раствором, разрушающим комплекс нуклеиновых кислот с белками, с последующим спиртовым осаждением нуклеиновых кислот на магнитные частицы, спиртовыми отмытками и последующей элюцией. После этого проба готова к постановке реакции ПЦР или ОТ-ПЦР.

4.5. Реагенты и расходные материалы:

- набор «Экстракция 100»;
- пипетки Пастера стерильная 3мл;
- спирт 95%, этанол;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром на 1000мкл;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром на 200мкл;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром на 100мкл;
- одноразовые наконечники для пипеток без защитного фильтра на 200мкл;
- одноразовые полипропиленовые пробирки типа Eppendorf на 2,0 мл
- готовый раствор дезинфектанта с вирулицидным действием;
- контейнер с дезинфицирующим раствором;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые;
- респиратор 3 класса защиты (FFP3);
- одноразовый хирургический халат;
- одноразовые нарукавники.

4.6. Подготовка наборов реагентов

Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре (18–25)°С в течение 30 минут.

Извлечь из набора для ПЦР «XXXX» флакон (пробирку) с ПКО. Вскрыть флакон с ВКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышку и пробку поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 1 мл РВК, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать при температуре (18–25)°С 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать. После разведения поставить дату на крышке и хранить при температуре (2–8)°С не более 1 месяца.

**Внимание:**

После разведения ВКО хранить при температуре (2–8)°С не более 1 месяца.

Лизирующий раствор перед началом работы прогреть при температуре (50–60)°С до растворения осадка. Перемешать на встряхивателе типа «Вортекс» содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором добавить 80 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

**Внимание:**

Лизирующий раствор после вскрытия и добавления суспензии сорбента хранению не подлежит.

4.7. Контроли

Для каждой партии образцов должны быть использованы:

- **Положительный контроль (ПКО).** В промаркированную пробирку «ПКО» внести 70 мкл ОКО и 30 мкл ПКО.
- **Отрицательный контроль (ОКО).** В промаркированную пробирку «ОКО» внести 100мкл ОКО.
- **Внутренний положительный контроль.** В каждую промаркированную пробирку (во все анализируемые образцы, ПКО и ОКО) внести по 30мкл раствора из пробирки «ВКО».

4.8. Обработка образцов

Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контрольные образцы)



Внимание:
Подготовку образцов и тестирование проводить только в БББ с использованием СИЗ.

4.8.1. Обработка образцов мазков рото- и носоглотки из транспортной среды

Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок. Перенести 100мкл образца в промаркированную 2мл пробирку.

4.8.2. Обработка образцов из сухих мазков рото- и носоглотки

Промаркированные 2 мл пробирки внести по 300мкл лизирующего раствора с сорбентом. Опустить сухой тампон в пробирку с лизирующим раствором с сорбентом. Сделать несколько вращательных движение тампона в растворе. Сбросить тампон в емкость для отходов.

4.8.3. Обработка образца из мокроты и бронхоальвеолярного лаважа

К образцу биоматериала добавить равный объем 95% этилового спирта, тщательно перемешать, выдержать при температуре (18-26)°С 10 минут. Еще раз тщательно перемешать. Перенести 100 мкл полученной взвеси в промаркированную 2мл пробирку.

4.9. Выделение НК:

- В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 300 мкл лизирующего раствора с сорбентом. Перемешать содержимое пробирок на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10–15 секунд. Выдержать в термошейкере с частотой вращения 1300 об/мин при 65°С в течение 10 минут. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

**Внимание:**

В случае, если образец лизировался не полностью, перенести содержимое в чистую пробирку, стараясь не захватить осадок.

- В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 400 мкл осадителя НК. Перемешать содержимое пробирок на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10–15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин при температуре (18–25)°С в течение 5 мину.
- Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.
- В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки №1. Перемешать содержимое пробирок на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10–15 секунд. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 2 минут.
- Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.
- В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешать содержимое пробирок на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10–15 секунд. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 2 минут.
- Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.
- Высушить осадки в открытых пробирках при температуре (18–25)°С в течение 2–3 минут.
- В каждую пробирку к осадку добавить элюирующий раствор. Если из выделенной биопробы будет производиться от 1 до 3 определений возбудителей инфекций следует добавить 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно перемешать на встряхивателе типа «Вортекс», ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере с частотой вращения 1300 об/мин при 65°С в течение 5 минут. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Пробы готовы к постановке ПЦР или ОТ-ПЦР-анализа.

**Внимание:**

Выделенная НК хранению не подлежит. Готовить в день проведения ПЦР (ОТ-ПЦР).

4.10. Уборка рабочего места и утилизация отходов

Перед удалением пробирок с выделенной НК и образцами необходимо их

дезинфицирующим средством. Рабочие поверхности БББ, оборудование и поверхности дозаторов обрабатываются дезинфицирующим средством.



Внимание:

Все образующиеся отходы в процессе подготовки и выделения НК относятся к отходам «класса В» (чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы)

Использованный расходный материал дезинфицируются и утилизируются как биологически опасный материал согласно СОП «Утилизация отходов».

5. СВЯЗАННЫЕ ДОКУМЕНТЫ

- СОП «Биобезопасность»,
- СОП «Утилизация отходов»,
- СОП «Бокс биологической безопасности»,
- СОП «Действия при аварийной ситуации»,
- СОП «Дезинфекция»,
- СОП «Сбор и доставка биоматериала»,
- СОП «Эксплуатация и обслуживание центрифуги Eppendorf minispin»,
- СОП «Эксплуатация и обслуживание термошейкера – термостатируемый встряхивателя»,
- СОП «Эксплуатация и обслуживание миницентрифуга- встряхиватель типа «Вортекс» Microspin FV-2400»,
- СОП «Эксплуатация дозатора переменного объема»,
- Инструкция для пользователя (прилагается к набору).

6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКЗЕМПЛЯРОВ СОП

Подразделения	№ копии
Кабинет заведующей лабораторией	1
Комната для работы с документацией	2
Отделение лаборатории, проводящей исследование по выделению РНК	3

ПРИЛОЖЕНИЕ 16.**Пример описания стандартной операционной процедуры
«Выявление РНК SARS-CoV2 методом ПЦР»**

Ниже представлен пример формы стандартной операционной процедуры (СОП). Содержание разделов в приведенном примере может отличаться от описания процедуры в других лабораториях. Содержание СОП должно соответствовать выполнению процедуры в конкретной лаборатории, применяемому оборудованию, инструкциям производителей применяемых в лаборатории тест-систем и оборудования.

НАЗВАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
Название лаборатории

СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

Название СОП	Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 YYYY⁶ РНК SARS-CoV-2»		
СОП №:⁷	00068	Дата вступления в силу:	23.03.2002
Версия №⁸	1	Количество копий ³	Копия №1⁹
Дата вступления в силу после пересмотра	Не пересматривался		Страницы с 1 по 11

Составили: ФИО Подпись(и): _____ Дата: _____	Проверил(и): ФИО Подпись(и): _____ Дата: _____
Утвердил: заведующий лабораторией Ф.И.О. уполномоченного лица (если назначен): _____ _____ Подпись: _____ Дата: _____	Утвердил: заместитель по качеству Ф.И.О. уполномоченного лица (если назначен): _____ _____ Подпись: _____ Дата: _____
Ежегодное рассмотрение (если никаких обновлений / поправок не сделано) Ф.И.О: _____ Подпись: _____ Дата: _____	Ежегодное рассмотрение (если никаких обновлений / поправок не сделано) Ф.И.О: _____ Подпись: _____ Дата: _____

6 Название тест-системы и ее производителя

7 Номер документа в системе документов лаборатории клинической микробиологии

8 Номер версии документа – СОП может пересматриваться. Пересмотренный документ будет иметь тот же номер, но другой номер версии

9 Номер копии, находящийся в кабинете заведующего лабораторией – из раздела 6

История изменений:

Дата	Версия	Разделы	Поправки
дата	1	Формат СОП	2. СОП был создан по новому формату

СОДЕРЖАНИЕ**1. ЦЕЛИ****2. ОБОЗНАЧЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ, СИМВОЛЫ****3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ**

- 3.1. Требования к персоналу
- 3.2. Образование и обучение(инструктаж)
- 3.3. Дополнительные требования

4. ОПИСАНИЕ

- 4.1. Клинические показания
- 4.2. Материал
- 4.3. Оборудование
- 4.4. Принцип метода
- 4.5. Реагенты и расходные материалы
- 4.6. Подготовка наборов реагентов
- 4.7. Проведение анализа
- 4.8. Анализ и учет результатов
 - 4.8.1. Условия анализа и учета результатов
 - 4.8.2. Учет результатов
 - 4.8.3. Уборка рабочего места и утилизация отходов

5. СВЯЗАННЫЕ ДОКУМЕНТЫ**6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКЗЕМПЛЯРОВ СОП****1. ЦЕЛИ**

Данный СОП описывает процедуру выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «YYYY».

2. ОБОЗНАЧЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ, СИМВОЛЫ

СОП	Стандартная операционная процедура
НК	Нуклеиновая кислота
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
БББ	Бокс биологической безопасности
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ОТ-ПЦР	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПКО	Положительный контрольный образец
ВКО	Внутренний контрольный образец
ОКО	Отрицательный контрольный образец

3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

3.1. Медицинские требования

В соответствии с Федеральными законами и санитарными правилами к работе с патогенными микроорганизмами II и III групп патогенности допускаются специалисты, не имеющие медицинских противопоказаний к работе в медицинской микробиологической лаборатории, в том числе к вакцинации. Контроль за состоянием здоровья сотрудников включает:

- ежедневное термометрирование;
- ежегодная диспансеризация;
- исследование мазков из носо- ротоглотки на содержание SARS-CoV-2.

Индивидуальные медицинские карты сотрудников хранятся у цехового врача

3.2. Образование и обучение (инструктаж)

- К работе допускаются:
- специалисты с высшим образованием, прошедших обучение в соответствии с действующим профессиональным стандартом специалиста клинической лабораторной диагностики, врачи–бактериологи или врачи–медицинские микробиологи, биологи, имеющие удостоверение о повышении квалификации по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика» и/или «Бактериология»;
- специалисты со средним медицинским образованием, имеющие сертификат или свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Лабораторная диагностика» или «Бактериология»;
- все специалисты, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19 методами МАНК должны пройти инструктаж по работе с ПБА II группы патогенности» и иметь дополнительное профессиональное образование (повышение квалификации) по применению методов молекулярно-генетических

методов для диагностики инфекционных заболеваний.

3.3. Дополнительные требования

Все сотрудники лаборатории, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19 должны пройти инструктаж и дать согласие на работу с микроорганизмами II группы патогенности.

4. ОПИСАНИЕ

4.1. Клинические показания

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «YYYU» предназначен для качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 в клинических образцах (мазки со слизистой носа и задней стенки глотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж) методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

4.2. Материал

- Выделенная РНК.

4.3. Оборудование

- амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа (с каналами детекции: «FAM», «ROX»);
- ПЦР-бокс;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (на 100 мкл);
- штатив для пробирок на 2,0 мл;
- мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200 об/мин;
- мини центрифуга под стрипованные пробки;
- пипетка полуавтоматическая (дозаторы механические) одноканальная с переменным объемом (с диапазонами 10-100 мкл);
- контейнер с дезинфицирующим раствором;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8)°С;
- нож канцелярский, ножницы.

4.4. Принцип метода

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК

коронавируса SARS-CoV-2), заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой. В основе используемого метода регистрации лежит измерение уровня флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение уровня флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной кДНК гибрида ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей кДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи зонд расщепляется с 5'-конца, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию уровня флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания уровня флуоресценции определяется исходным количеством РНК SARS-CoV-2 в образце.

4.5. Реагенты и расходные материалы:

- набор «YYYY»;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром на 100мкл;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые;
- одноразовый хирургический халат.

4.6. Подготовка наборов реагентов

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26)°С не менее 30 минут.

Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: (1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.



Внимание:

Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим. После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8)°С не более 3 месяцев.

4.7. Проведение анализа

- необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные

образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе;



Внимание:

Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая пленка должна оставаться чистой!

- в каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной РНК. Заклеить пробирки оптической пленкой;
- поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты;
- поместить пробирки в амплификатор;
- запрограммировать прибор для проведения реакции ОТ-ПЦР (программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору):
- 1 стадия: 45°C – 30 минут;
- стадия: 94°C – 1 минута;
- стадия: 50 циклов (94°C – 10 секунд, 60°C – 20 секунд). *Измерение флуоресценции проводить при 60°C;*
- выбрать канал детекции результатов амплификации кДНК ВКО и кДНК возбудителя инфекции: «ROX» – для регистрации сигнала кДНК SARS-CoV-2; «FAM» – для регистрации сигнала кДНК ВКО;
- запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами, согласно инструкции к используемому прибору;
- запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

4.8 Анализ и учет результатов

4.8.1. Условия анализа и учета результатов

- В ПКО программа должна фиксировать: – нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла Ct ВКО; – нарастание сигнала амплификации кДНК SARS-CoV-2 (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;
- в ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации по каналу «ROX». Если для ОКО определяется значение Ct по каналу «ROX», то это свидетельствует о наличии контаминации;
- в каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО.

4.8.2. Учет результатов

- Вычислить $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение $Ct \text{ ВКО}$ всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения $Ct \text{ ВКО}$, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений;
- Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим РНК SARS-CoV-2), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» не определяется. Если для такого образца значение $Ct \text{ ВКО}$ превышает значение $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения РНК.
- Анализируемый образец считается положительным, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.
- Если для анализируемого образца определяется Ct больше 40, рекомендуется проведение дополнительных исследований (исследование вновь забранного материала или исследование с использованием другого набора реагентов).
- В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

4.8.3 Уборка рабочего места и утилизация отходов

Перед удалением пробирок с выделенной НК и образцами необходимо их дезинфицирующим средством. Рабочие поверхности БББ, оборудование и поверхности дозаторов обрабатываются дезинфицирующим средством;

Использованный расходный материал дезинфицируются и утилизируются как биологически опасный материал согласно СОП «Утилизация отходов».

5. СВЯЗАННЫЕ ДОКУМЕНТЫ

- СОП «Биобезопасность»,
- СОП «Утилизация отходов»,
- СОП «Бокс биологической безопасности»,
- СОП «Действия при аварийной ситуации»,
- СОП «Дезинфекция»,
- СОП «Эксплуатация и обслуживание мини-шейкера планшетного типа»,
- СОП «Эксплуатация и обслуживание микроцентрифуги «Циклотемп-903»,
- СОП «Эксплуатация дозатора переменного объема»,

- СОП «Эксплуатация и обслуживание амплификатора CFX96»,
- Инструкция для пользователя (прилагается к набору).

6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКЗЕМПЛЯРОВ СОП

Подразделения	№ копии
Кабинет заведующей лабораторией	1
Комната для работы с документацией	2
Отделение лаборатории	3

ПРИЛОЖЕНИЕ 17.**Пример описания стандартной операционной процедуры «Выявление антигенов SARS-CoV2 иммунохимическими методами»**

Ниже представлен пример формы стандартной операционной процедуры (СОП). Содержание разделов в приведенном примере может отличаться от описания процедуры в других лабораториях. Содержание СОП должно соответствовать выполнению процедуры в конкретной лаборатории, применяемому оборудованию, инструкциям производителей применяемых в лаборатории тест-систем и оборудования.

Название медицинского учреждения
Название лаборатории

СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

Название СОП	Выявление АГ SARS-CoV-2 YYYY¹⁰		
СОП №:¹¹	00000	Дата вступления в силу:	01.01.1900
Версия №¹²	1	Количество копий 3	Копия №1¹³
Дата вступления в силу после пересмотра	Не пересматривался	Страницы с 1 по 11	

Составили: ФИО Подпись(и): _____ Дата: _____	Проверил(и): ФИО Подпись(и): _____ Дата: _____
Утвердил: заведующий лабораторией Ф.И.О. уполномоченного лица (если назначен): _____ Подпись: _____ Дата: _____	Утвердил: заместитель по качеству Ф.И.О. уполномоченного лица (если назначен): _____ Подпись: _____ Дата: _____
Ежегодное рассмотрение (если никаких обновлений / поправок не сделано) Ф.И.О.: _____ Подпись: _____ Дата: _____	Ежегодное рассмотрение (если никаких обновлений / поправок не сделано) Ф.И.О.: _____ Подпись: _____ Дата: _____

¹⁰ Название набора реагентов и его производителя

¹¹ Номер документа в системе документов лаборатории клинической микробиологии

¹² Номер версии документа – СОП может пересматриваться. Пересмотренный документ будет иметь тот же номер, но другой номер версии

¹³ Номер копии, находящийся в кабинете заведующего лабораторией – из раздела б

История изменений:

Дата	Версия	Разделы	Поправки
дата	1	Формат СОП	3. СОП был создан по новому формату

1. ЦЕЛИ

Данный СОП описывает процедуру выявления АГ SARS-CoV-2 методом ИФА/ИХЛА/иммунохроматографии «YYYY».

2. ОБОЗНАЧЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ, СИМВОЛЫ

СОП	Стандартная операционная процедура
АГ	Белок-антиген
БББ	Бокс биологической безопасности
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ИФА/ИХЛА	Иммуноферментный/иммунохемилюминесцентный анализ
ПКО	Положительный контрольный образец
ОКО	Отрицательный контрольный образец

3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ**3.1. Медицинские требования**

В соответствии с Федеральными законами и санитарными правилами к работе с патогенными микроорганизмами II и III групп патогенности допускаются специалисты, не имеющие медицинских противопоказаний к работе в медицинской микробиологической лаборатории, в том числе к вакцинации. Контроль за состоянием здоровья сотрудников включает:

- ежедневное термометрирование;
- ежегодная диспансеризация;
- исследование мазков из носо- ротоглотки на содержание SARS-CoV-2.

Индивидуальные медицинские карты сотрудников хранятся у цехового врача

3.2. Образование и обучение (инструктаж)

- К работе допускаются:
- специалисты с высшим образованием, прошедших обучение в соответствии с действующим профессиональным стандартом специалиста клинической лабораторной диагностики, врачи–бактериологи или врачи–медицинские микробиологи, биологи, имеющие удостоверение о повышении квалификации по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика» и/или «Бактериология»;
- специалисты со средним медицинским образованием, имеющие сертификат или свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Лабораторная диагностика» или «Бактериология»;
- все специалисты, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19 иммунохимическими методами должны пройти инструктаж по работе с ПБА II группы патогенности»

3.3. Дополнительные требования

Все сотрудники лаборатории, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19 должны пройти инструктаж и дать согласие на работу с микроорганизмами II группы патогенности.

4. ОПИСАНИЕ

4.1. Клинические показания

Набор реагентов для выявления АГ коронавируса SARS-CoV-2 методом ИФА/ИХЛА/иммунохроматографии «УУУУ» предназначен для качественного определения нуклеопротеина (NP) коронавируса SARS-CoV-2 в клинических образцах (мазки со слизистой носа и задней стенки глотки) методом, основанным на сэндвич-иммуноанализе с колориметрической/хемилюминесцентной/визуальной детекцией.

4.2. Материал

- Предварительно обработанный лизирующим раствором биологический материал.

4.3. Оборудование

- Автоматическая станция, соответствующая выбранному набору реагентов или прибор для учета результатов при ручной постановке ИФА/ИХЛА или прибор для учета результатов экспресс-тестов (если требуется), указанный в инструкции

- производителя;
- бокс биологической безопасности III класса защиты или бокс биологической безопасности II класса защиты;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (на 100 мкл);
- штатив для пробирок на 2,0 мл;
- мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения до 400 об/мин и возможность нагрева до 50°C;
- пипетка полуавтоматическая (дозаторы механические) одноканальная с переменным объемом (с диапазонами 10-100 мкл);
- пипетка полуавтоматическая (дозаторы механические) одноканальная с переменным объемом (с диапазонами 100-1000 мкл);
- пипетка полуавтоматическая (дозаторы механические) восьмиканальный с переменным объемом (с диапазонами 50-300 мкл);
- контейнер с дезинфицирующим раствором;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8)°C;
- нож канцелярский, ножницы.

4.4. Принцип метода

Принцип анализа основан на использовании двух антител, распознающих отдельные эпитопы измеряемого анализата таким образом, что они способны связываться с анализатом одновременно. «Связывающие» (capture) антитела, специфичные к измеряемому веществу, иммобилизуют ковалентно или нековалентно на белковосвязывающую поверхность твердой фазы: нитроцеллюлозной мембраны в случае экспресс-тестов, пластиковых ячеек в случае использования автоматических анализаторов или 96-тилуночных планшетов в случае ручного выполнения исследования. Любые свободные участки связывания на поверхности твердой фазы затем блокируются добавлением неиммунореактивных соединений (белков, сахаров, аминокислот, поверхностно-активных веществ и т.д.). На следующем этапе добавляются исследуемые образцы, а также контрольные и стандартные образцы, содержащие целевой анализат. При этом происходит аффинное связывание анализата «связывающими» антителами, иммобилизованными на твердой фазе. Связанный анализат выявляется с помощью «детектирующих» антител, которые связываются с другим эпитопом анализата, создавая таким образом «сэндвич». Для использования в ИФА и ИХЛА «детектирующее» антитело иногда непосредственно конъюгируют с ферментом, таким как пероксидаза хрена (HRP) или щелочная фосфотаза (AP). Часто «детектирующее» антитело конъюгируют с биотином, что позволяет проводить

процедуру детекции с использованием конъюгатов стрептавидина с ферментами. Также для выявления «детектирующих» антител могут быть использованы конъюгированные с ферментами вторичные антитела, не реагирующие со «связывающими» антителами. Непосредственное конъюгирование «детектирующих» антител с коллоидным золотом или окрашенными латексными частицами, использование конъюгированных с коллоидным золотом или окрашенными латексными частицами стрептавидина или вторичных антител используется для безприборной детекции при создании экспресс-тестов. В случае проведения ИФА или ИХЛА требуется добавление субстрата, который под действием фермента будет образовывать окрашенный или хемилюминесцирующий продукт. Оптическая плотность полученного окрашенного раствора или интенсивность свечения может быть измерена спектрофотометрически или хемилюминометрически соответственно. Результирующая оптическая плотность или интенсивность свечения прямопропорционально соотносится с количеством связавшегося с «связывающими» антителами антигена.

4.5. Реагенты и расходные материалы:

- набор «YYYY»;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром на 100мкл;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые;
- одноразовый хирургический халат.

4.6. Подготовка наборов реагентов

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26)°С не менее 30 минут.

В случае использования автоматических станций загрузить реагенты на борт прибора, в случае использования наборов реагентов для ручного исследования – оставить в рамке-держателе необходимое количество 8-милуночных стрипов или лунок, в случае использования экспресс-тестов – извлечь из упаковки необходимое количество стрипов или кассет (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: (1 ОКО и 1 ПКО).



Внимание:

Неиспользованные 8милуночные стрипы или стрипы/ кассеты упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим. После первого вскрытия упаковки хранить согласно инструкции производителя.

4.7. Проведение анализа

4.7.1. В случае использования автоматических станций выбрать необходимое исследование в меню прибора и запустить прибор

4.7.2. в случае ручной постановки ИФА/ИХЛА

- в каждую лунку внести дозатором указанное в инструкции к набору реагента количество подготовленного биологического материала или контрольных и стандартных образцов, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром. Заклеить стрипы/лунки пленкой;
- поместить в мини-шейкер планшетный, запрограммированный на поддержание температуры и скорости вращения, указанных в инструкции по применению набора реагентов. Инкубировать указанное в инструкции по применению время;
- удалить жидкость из лунок;
- провести отмывку лунок с помощью 8-ми канального дозатора или вошера для планшетов согласно инструкции по применению набора реагентов;
- с помощью 8-миканального дозатора внести во все стрипы/лунки указанное в инструкции к набору реагента количество раствора конъюгата, Заклеить стрипы/лунки пленкой;
- поместить в мини-шейкер планшетный, запрограммированный на поддержание температуры и скорости вращения, указанных в инструкции по применению набора реагентов. Инкубировать указанное в инструкции по применению время;
- удалить жидкость из лунок;
- провести отмывку лунок с помощью 8-ми канального дозатора или вошера для планшетов согласно инструкции по применению набора реагентов;
- с помощью 8-ми канального дозатора внести во все стрипы/лунки указанное в инструкции к набору реагента количество раствора субстрата. Заклеить стрипы/лунки пленкой;
- поместить в мини-шейкер планшетный, запрограммированный на поддержание температуры и скорости вращения, указанных в инструкции по применению набора реагентов. Инкубировать указанное в инструкции по применению время;
- в случае использования ИФА остановить ферментативную реакцию, с помощью 8-ми канального дозатора внести во все стрипы/лунки указанное в инструкции к набору реагента количество останавливающего раствора;
- провести учет результатов, измерив оптическую плотность или

хемилюминесценцию как описано в инструкции к набору реагентов.

4.7.4. в случае использования экспресс-тестов – в соответствующую зону каждого стрипа/кассеты внести дозатором указанное в инструкции к набору реагента количество подготовленного биологического материала или контрольных образцов, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром. Для исследования каждого образца биологического материала или контрольного образца использовать отдельный стрип/кассету;

- инкубировать стрипы/кассеты как описано в инструкции по применению используемого набора реагентов
- провести учет результатов с использованием описанного в инструкции по применению набора реагентов оборудования или визуально.

4.8 Анализ и учет результатов

4.8.1. Условия анализа и учета результатов

- в ПКО должен фиксироваться сигнал, укладываемый в интервал значений, указанный в инструкции или во вкладыше к набору реагентов, или наблюдаются контрольная и тестовая полосы, интенсивность окрашивания которых соответствует указанной в инструкции или во вкладыше к набору реагентов. Если наблюдается несоответствие, то все результаты по данной постановке исследования считаются недостоверными;
- в ОКО должен фиксироваться сигнал, укладываемый в интервал значений, указанный в инструкции или во вкладыше к набору реагентов, или наблюдается контрольная и тестовая полосы, интенсивность окрашивания которых соответствует указанной в инструкции или во вкладыше к набору реагентов. Если наблюдается несоответствие, то все результаты по данной постановке исследования считаются недостоверными;

4.8.2. Учет результатов

Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим АГ SARS-CoV-2), если для этого образца полученное значение оптической плотности или хемилюминесценции ниже указанного в инструкции или во вкладыше к набору реагентов или наблюдается только контрольная полоса.

Анализируемый образец считается положительным (содержащим АГ SARS-CoV-2), если для этого образца полученное значение оптической плотности или хемилюминесценции выше указанного в инструкции или во вкладыше к набору реагентов или наблюдаются контрольная и тестовая полосы интенсивности, соответствующей указанной в инструкции или во вкладыше к набору реагентов.

4.8.3. Уборка рабочего места и утилизация отходов

Перед удалением использованных 8-луночных стрипов, кассет, пробирок с предобработанным и исходным биологическим материалом необходимо выдержать их в дезинфицирующем средстве. Рабочие поверхности БББ, оборудование и поверхности дозаторов обрабатываются дезинфицирующим средством;

Использованный расходный материал дезинфицируются и утилизируются как биологически опасный материал согласно СОП «Утилизация отходов».

5. СВЯЗАННЫЕ ДОКУМЕНТЫ

- СОП «Биобезопасность»,
- СОП «Утилизация отходов»,
- СОП «Бокс биологической безопасности»,
- СОП «Действия при аварийной ситуации»,
- СОП «Дезинфекция»,
- СОП «Эксплуатация и обслуживание мини-шейкера планшетного типа»,
- СОП «Эксплуатация и обслуживание микроцентрифуги»,
- СОП «Эксплуатация дозатора переменного объема»,
- СОП «Эксплуатация и обслуживание автоматической станции»
- СОП «Эксплуатация и обслуживание спектрофотографа /хемилюминометра»,
- Инструкция для пользователя (прилагается к набору).

6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКЗЕМПЛЯРОВ СОП

Подразделения	№ копии
Кабинет заведующей лабораторией	1
Комната для работы с документацией	2
Отделение лаборатории	3

ПРИЛОЖЕНИЕ 18.**Пример описания стандартной операционной процедуры «Определение антител к SARS-CoV2 иммунохимическими методами»**

Ниже представлен пример формы стандартной операционной процедуры (СОП). Содержание разделов в приведенном примере может отличаться от описания процедуры в других лабораториях. Содержание СОП должно соответствовать выполнению процедуры в конкретной лаборатории, применяемому оборудованию, инструкциям производителей применяемых в лаборатории тест-систем и оборудования.

**Название медицинской организации
Название лаборатории**

СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

Название СОП	Выявление АГ SARS-CoV-2 YYYY¹⁴		
СОП №:¹⁵	00000	Дата вступления в силу:	01.01.1900
Версия №¹⁶	1	Количество копий 3	Копия №1¹⁷
Дата вступления в силу после пересмотра	Не пересматривался	Страницы с 1 по 11	

Составили: ФИО Подпись(и): _____ Дата: _____	Проверил(и): ФИО Подпись(и): _____ Дата: _____
Утвердил: заведующий лабораторией Ф.И.О. уполномоченного лица (если назначен): _____ _____ Подпись: _____ Дата: _____	Утвердил: заместитель по качеству Ф.И.О. уполномоченного лица (если назначен): _____ _____ Подпись: _____ Дата: _____
Ежегодное рассмотрение (если никаких обновлений / поправок не сделано) Ф.И.О.: _____ Подпись: _____ Дата: _____	Ежегодное рассмотрение (если никаких обновлений / поправок не сделано) Ф.И.О.: _____ Подпись: _____ Дата: _____

¹⁴ Название набора реагентов и его производителя

¹⁵ Номер документа в системе документов лаборатории клинической микробиологии

¹⁶ Номер версии документа – СОП может пересматриваться. Пересмотренный документ будет иметь тот же номер, но другой номер версии

¹⁷ Номер копии, находящийся в кабинете заведующего лабораторией – из раздела б

История изменений:

Дата	Версия	Разделы	Поправки
<i>дата</i>	<i>1</i>	<i>Формат СОП</i>	<i>4. СОП был создан по новому формату</i>

1. ЦЕЛИ

Данный СОП описывает процедуру выявления иммуноглобулинов класса А к SARS-CoV-2 методом ИФА набором реагентов «YYYY».

2. ОБОЗНАЧЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ, СИМВОЛЫ

СОП	Стандартная операционная процедура
БББ	Бокс биологической безопасности
ИФА	Иммуноферментный анализ
ПКО	Положительный контрольный образец
ОКО	Отрицательный контрольный образец

3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ**3.1. Медицинские требования**

В соответствии с Федеральными законами и санитарными правилами к работе с патогенными микроорганизмами **II и III групп патогенности** допускаются специалисты, не имеющие медицинских противопоказаний к работе в медицинской микробиологической лаборатории, в том числе к вакцинации. Контроль за состоянием здоровья сотрудников включает:

- ежедневное термометрирование;
- ежегодная диспансеризация;
- исследование мазков из носо- и ротоглотки на содержание SARS-CoV-2.

Индивидуальные медицинские карты сотрудников хранятся у цехового врача.

3.2. Образование и обучение (инструктаж)

К работе допускаются:

- специалисты с высшим образованием, прошедших обучение в соответствии с действующим профессиональным стандартом специалиста клинической лабораторной диагностики, врачи–бактериологи или врачи–медицинские микробиологи, биологи, имеющие удостоверение о повышении квалификации по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика» и/или «Бактериология»;
- специалисты со средним медицинским образованием, имеющие сертификат или свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Лабораторная диагностика» или «Бактериология»;
- все специалисты, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19 иммунохимическими методами должны пройти инструктаж по работе с ПБА II группы патогенности.

3.3. Дополнительные требования

Все сотрудники лаборатории, допущенные к проведению исследований для диагностики COVID-19 должны пройти инструктаж и дать согласие на работу с микроорганизмами II группы патогенности.

4. ОПИСАНИЕ

4.1. Клинические показания

Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов класса А к коронавирусу SARS-CoV-2 методом ИФА «YYYY» предназначен для качественного определения иммуноглобулинов класса А (IgA) к SARS-CoV-2 в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа. Набор можно использовать при диагностике COVID-19 в качестве вспомогательного средства.

4.2. Образцы для анализа

Для анализа использовать образцы сыворотки крови человека или образцы плазмы крови человека (возможность использования конкретного антикоагулянта должна быть обозначена в инструкции к набору реагентов).

Срок и режим хранения образцов сыворотки (плазмы) крови перед анализом должны быть указаны в инструкции к набору реагентов.

В случае необходимости выполнить подготовку образца сыворотки (плазмы) крови согласно инструкции к набору реагентов.

4.3. Оборудование

- Прибор для учета результатов ИФА (спектрофотометр или анализатор

иммуноферментный, или другой прибор, указанный в инструкции к набору реагентов);

- бокс биологической безопасности III класса защиты или бокс биологической безопасности II класса защиты;
- термостатируемый планшетный шейкер орбитального типа, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин;
- дозатор одноканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости от 10 до 5000 мкл;
- дозатор многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкостей от 10 до 300 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером для взятия образца;
- промывочное устройство для планшетов (вошер);
- контейнер с дезинфицирующим раствором*;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру $(2-8)^\circ\text{C}$;
- другая необходимая лабораторная посуда или расходные материалы, указанные в инструкции к набору реагентов.

**Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.*

4.4. Принцип метода

Принцип анализа основан на двухстадийном «непрямом» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. На первой стадии анализа, содержащиеся в исследуемых образцах специфические антитела (в том числе IgA) связываются с иммобилизованным на поверхности лунок планшета рекомбинантным антигеном SARS-CoV-2. На второй стадии конъюгат моноклональных антител к IgA человека с пероксидазой хрена (ферментом?) взаимодействует с комплексами «антиген–IgA». Далее производится добавление субстрата, который под действием фермента будет образовывать окрашенный продукт в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген–IgA-конъюгат». После остановки реакции посредством добавления стоп-реагента оптическая плотность полученного окрашенного раствора может быть измерена спектрофотометрически. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgA к SARS-CoV-2 в анализируемом образце.

4.5. Реагенты и расходные материалы:

- набор «YYYY»;

- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром для взятия образца;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- одноразовый хирургический халат.

4.6. Подготовка наборов реагентов

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать компоненты набора при температуре (18-26)°С не менее 30 минут.

В случае использования автоматических иммуноферментных анализаторов загрузить реагенты на борт прибора.

При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. После первого вскрытия упаковки компоненты хранить согласно инструкции производителя.

В случае необходимости подготовить компоненты набора к проведению анализа согласно инструкции по применению (например, выполнить разведение компонента).

Не допускается использовать совместно реагенты из наборов разных фирм-производителей.

4.7. Проведение анализа

4.7.1. В случае использования автоматических анализаторов выбрать необходимое исследование в меню прибора и запустить прибор.

4.7.2. В случае ручной постановки ИФА:

В каждую лунку внести дозатором указанное в инструкции к набору реагента количество подготовленной сыворотки (плазмы) крови, контрольных образцов и других компонентов набора, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром.

Заклеить стрипы/лунки пленкой и инкубировать указанное в инструкции по применению время в термостатируемом шейкере, запрограммированном на поддержание температуры и скорости вращения, предписанных инструкцией к набору реагентов.

Удалить жидкость из лунок. Выполнить отмывку лунок с помощью многоканального дозатора или вошера для планшетов согласно инструкции по применению набора реагентов.

Внести во все стрипы/лунки указанное в инструкции к набору реагентов количество раствора конъюгата. Заклеить стрипы/лунки пленкой и инкубировать указанное в инструкции по применению время в термостатируемом шейкере, запрограммированном на поддержание температуры и скорости вращения,

предписанных инструкцией к набору реагентов.

Удалить жидкость из лунок. Выполнить отмывку лунок с помощью многоканального дозатора или вошера для планшетов согласно инструкции по применению набора реагентов.

Внести во все стрипы/лунки указанное в инструкции к набору реагентов количество раствора субстрата. Заклеить стрипы/лунки пленкой и инкубировать указанное в инструкции по применению время в термостатируемом шейкере, запрограммированном на поддержание температуры и скорости вращения, предписанных инструкцией к набору реагентов.

Внести во все стрипы/лунки указанное в инструкции к набору реагентов количество стоп-реагента для остановки реакции.

Провести учет результатов, измерив оптическую плотность как описано в инструкции к набору реагентов.

4.8 Анализ и учет результатов

4.8.1. Условия анализа и учета результатов

В ПКО должен фиксироваться сигнал, укладывающийся в интервал значений, указанный в инструкции к набору реагентов. Если наблюдается несоответствие, то все результаты по данной постановке исследования считаются недостоверными.

В ОКО должен фиксироваться сигнал, укладывающийся в интервал значений, указанный в инструкции к набору реагентов. Если наблюдается несоответствие, то все результаты по данной постановке исследования считаются недостоверными.

4.8.2. Учет результатов

Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим иммуноглобулины класса А к SARS-CoV-2), если для этого образца полученное значение оптической плотности/коэффициента позитивности ниже указанного в инструкции к набору реагентов.

Анализируемый образец считается положительным (содержащим иммуноглобулины класса А к SARS-CoV-2), если для этого образца полученное значение оптической плотности/коэффициента позитивности выше указанного в инструкции к набору реагентов.

4.9. Уборка рабочего места и утилизация отходов

Перед удалением использованных стрипов, пробирок и пр. с предобработанной и исходной сывороткой (плазмой) крови необходимо выдержать их в дезинфицирующем средстве. Рабочие поверхности, оборудование и поверхности дозаторов обрабатываются дезинфицирующим средством.

Использованный расходный материал дезинфицируются и утилизируются как биологически опасный материал согласно СОП «Утилизация отходов».

5. СВЯЗАННЫЕ ДОКУМЕНТЫ

- СОП «Биобезопасность».
- СОП «Утилизация отходов».
- СОП «Бокс биологической безопасности».
- СОП «Действия при аварийной ситуации».
- СОП «Дезинфекция».
- СОП «Эксплуатация и обслуживание шейкера планшетного типа».
- СОП «Эксплуатация и обслуживание микроцентрифуги».
- СОП «Эксплуатация дозатора переменного объема».
- СОП «Эксплуатация и обслуживание автоматической станции».
- СОП «Эксплуатация и обслуживание спектрофотометра / иммуноферментного анализатора».
- Инструкция для пользователя (прилагается к набору).

6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКЗЕМПЛЯРОВ СОП

Подразделения	№ копии
Кабинет заведующей лабораторией	1
Комната для работы с документацией	2
Отделение лаборатории	3

ПРИЛОЖЕНИЕ 19.**Примеры оформления результатов исследования биологического материала для диагностики COVID-19 (выявление РНК и антигенов SARS-CoV-2)****РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА SARS-CoV-2 методом амплификации нуклеиновых кислот**

(в электронной форме или на бумажном носителе)

Наименование медицинской организации,

Наименование лаборатории, выполняющей исследование, адрес, телефон, e-mail

Ф И.О. пациента: _____ дата рождения _____

Пол М Ж (нужное отметить галочкой)

Адрес/отделение _____

Биологический материал _____

Дата сбора материала _____ лабораторный номер _____

Метод исследования: ОТ-ПЦР-РВ ОТ-LAMP (нужное подчеркнуть)

Результат: SARS-CoV-2 обнаружен ; не обнаружен ; сомнительный

Наименование тест-системы: для выделения НК _____

Наименование тест-системы: для обнаружения SARS-CoV-2 _____

Комментарии: _____

Дата выдачи результата “ ____ ” _____ 20 ____ г.

ФИО врача _____ Подпись _____

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА АГ- SARS-CoV-2

(в электронной форме или на бумажном носителе)

Наименование медицинской организации,

Наименование лаборатории, выполняющей исследование, адрес, телефон, e-mail

Ф И.О. пациента: _____ дата рождения _____

Пол М Ж (нужное отметить галочкой)

Адрес/отделение _____

Биологический материал _____

Дата сбора материала _____ лабораторный номер _____

Метод исследования: ИФА ИХЛА ИХ (нужное подчеркнуть) _____

Результат: SARS-CoV-2 обнаружен ; не обнаружен ; сомнительный

Наименование тест-системы: для выделения НК _____

Комментарии: _____

Дата выдачи результата “ ____ ” _____ 20 ____ г.

ФИО врача _____ Подпись _____

ПРИЛОЖЕНИЕ 20.**Пример оформления результатов исследования
об исследовании биологического материала с
целью выявления антител к SARS-CoV-2****РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА АНТИТЕЛА К
SARS-CoV-2 ИММУНОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (количественный анализ)**

(в электронной форме или на бумажном носителе)

Наименование медицинской организации,

Наименование лаборатории, выполняющей исследование, адрес, телефон, e-mail

Ф.И.О. пациента: _____ дата рождения _____

Пол М Ж (нужное отметить галочкой)

Адрес/отделение _____

Метод исследования: ИФА ИХЛА ИХ ЭХЛА (нужное подчеркнуть)

Показатель	Концентрация, ОЕ/мл /BAU/мл	Референсные значения*	Результат
Антитела IgA к SARS-CoV-2			
Антитела IgM к SARS-CoV-2			
Антитела IgG к SARS-CoV-2			
Суммарные антитела к SARS-CoV-2			

Наименование тест-системы: для выявления и количественного определения антител к SARS-CoV-2

IgA _____

IgM _____

IgG _____

Комментарии: _____

Дата выдачи результата “ _____ ” _____ 20 ____ г.

ФИО врача _____ Подпись _____

*Данные из инструкции к набору реагентов

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
НА АНТИТЕЛА К SARS-CoV-2 (качественный анализ)
(в электронной форме или на бумажном носителе)**

Наименование медицинской организации,

Наименование лаборатории, выполняющей исследование, адрес, телефон, e-mail

Ф И.О. пациента: _____ дата рождения _____

Пол М Ж (нужное отметить галочкой)

Адрес/отделение _____

Метод исследования: ИФА ИХЛА ИХ ЭХЛА (нужное подчеркнуть)

Адрес/отделение _____

Биологический материал _____

Дата сбора материала _____ лабораторный номер _____

Результат:

Показатель	Результат
Антитела IgA к SARS-CoV-2	
Антитела IgM к SARS-CoV-2	
Антитела IgG к SARS-CoV-2	
Суммарные антитела к SARS-CoV-2	

Наименование тест-системы: для выявления и количественного определения антител к SARS-CoV-2

IgA _____

номер регистрационного удостоверения _____ серия/лот _____ срок годности _____

IgM _____

номер регистрационного удостоверения _____ серия/лот _____ срок годности _____

IgG _____

номер регистрационного удостоверения _____ серия/лот _____ срок годности _____

Рекомендации: _____

Дата выдачи результата “ _____ ” _____ 20____ г.

ФИО врача _____ Подпись _____

СОСТАВ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ

Рабочая группа выражает глубокую благодарность В.Н. Малахову (директору АСНП «Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований») за его участие в обсуждении документа и ценные замечания и предложения

Аглетдинов Эдуард Феликсович – заместитель генерального директора АО «Вектор-Бест» по научной работе

Бурцева Елена Ивановна – руководитель лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа, заместитель руководителя Центра экологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ), руководитель Национального центра по гриппу, сотрудничающего с ВОЗ подразделения «Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского» ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Вавилова Татьяна Владимировна - заведующая кафедрой лабораторной медицины и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, главный внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике Минздрава России.

Винокуров Анатолий Сергеевич – врач бактериолог отделения лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

Долгих Татьяна Ивановна - главный эксперт АСНП «Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований».

Калинина Ольга Викторовна - профессор кафедры лабораторной медицины и генетики, декан медико-биологического факультета Института медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Лагуткин Денис Анатольевич – младший научный сотрудник научной лаборатории микробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

Панова Анна Евгеньевна – заведующая отделением лабораторной диагностики, заведующая научной лабораторией микробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

Стуколова Ольга Алексеева - научный сотрудник, руководитель научной группы протеомного анализа отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора

Тарасенко Ольга Анатольевна – заместитель директора ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники» Росздравнадзора

Шульгина Марина Владимировна – советник директора по науке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России

