

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН ФИЛИАЛ «НАУЧНО – ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
САНИТАРНО – ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И
МОНИТОРИНГА» РГП НА ПХВ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ»

**Г.Е. Нусупбаева, Н.Ж. Тлеумбетова, А.С. Муталиева, А.Ш.
Усербаев,
Д. А. Турегелдиева**

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСА SARS-CoV-2

(методические рекомендации)

**Алматы
2021**

УДК: 616.9

ББК: 52.63

Л12

Рецензенты:

1. Айкимбаев А.М. – д.м.н., профессор, консультант Научно – практического центра санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга

2. Нурмаханов Т.И. – заведующий лабораторией Природно-очаговых вирусных инфекций Национального научного центра особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева

Авторы:

Нусупбаева Г.Е. – магистр общественного здравоохранения, заместитель директора «Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК;

Тлеумбетова Н.Ж. – магистр естественных наук, заведующая референс лабораторией по контролю за вирусными инфекциями филиала «Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК;

Муталиева А.С. – магистр медицинских наук, врач - вирусолог референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями филиала «Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК;

Усербаев А.Ш. – магистр медицинских наук, врач - вирусолог референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями филиала «Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК;

Турегелдиева Д.А. – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией биологических моделей «Национального научного центра особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева» МЗ РК.

Л12. Лабораторная диагностика вируса SARS-CoV-2 / Нусупбаева Г.Е., Тлеумбетова Н.Ж., Муталиева А.С., Усербаев А.Ш., Турегелдиева Д.А. // Алматы: Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга, 2021 - 53 с.

ISBN 978-601-305-431-5

Настоящие Методические рекомендации содержат положения по основным элементам менеджмента лабораторий, стандартные условия проведения забора биологического материала, выполнение лабораторных исследований на вирус SARS-CoV-2 и предназначены в помощь медицинским работникам и сотрудникам лабораторной службы.

УДК: 616.9

ББК: 52.63

Утверждено и разрешено к изданию типографским способом РГП «Республиканский центр развития здравоохранения» (протокол заседания Департамента развития медицинской науки и образования РГП РЦРЗ №__ от «_» ___2021г.)

**©Нусупбаева Г.Е., Тлеумбетова Н.Ж., Муталиева А.С., Усербаев
А.Ш.,
Турегелдиева Д. А., 2021**

Перечень сокращений и условных обозначений

АСЕ2	ангиотензин превращающий фермент II типа
АТ2	альвеолярные клетки II типа
IgG	иммуноглобулины класса G
IgM	иммуноглобулины класса M
RBD	рецептор-связывающий домен
Аг	антиген
БББ	бокс биологической безопасности
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВДП	верхние дыхательные пути
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЭТ	диагностические экспресс - тесты
ЕИП	Единый интеграционный портал
ИВЛ	искусственная вентиляция легких
ИФА	иммуноферментный анализ
ИХЛА	иммунохемилюминесцентный анализ
к-ДНК	комплементарная ДНК
МАНК	метод амплификации нуклеиновых кислот
МО	медицинская организация
НДП	нижние дыхательные пути
НК	нуклеиновая кислота
НЦЭ	Национальный центр экспертизы
ОРВИ	острая респираторная вирусная инфекция
ОТ	обратная транскрипция
ПБА	патогенные биологические агенты
ПГГСВ	Постановление Главного государственного санитарного врача
ПОР	прогностическая ценность отрицательного результата
ППР	прогностическая ценность положительного результата
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РС	реакционная смесь
СИЗ	средства индивидуальной защиты
СОП	Стандартные операционные процедуры
ТД	территориальный департамент

Понятия, используемые в методических рекомендациях

In vitro (с лат. — «в стекле») — это технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся «в пробирке» — вне живого организма.

Ампликон - продукты ПЦР, синтезируемые в процессе амплификации копии ДНК-мишени.

Аэрозоли – система твердых (дым) или жидких (туман) частиц, содержащихся во взвешенном состоянии в воздухе и имеющих малые скорости осаждения;

Биобезопасность – принципы, технологии и практические методы обеспечения изоляции, которые применяются в целях предотвращения непреднамеренных контактов с биологическими агентами и токсинами или их случайной утечки в лабораториях;

Биозащита – обеспечение защиты, контроля и учета биологических агентов и токсинов в лаборатории с целью предотвращения их утери, кражи, неправильного использования, диверсии, несанкционированного доступа или преднамеренной несанкционированной утечки;

Бокс биологической безопасности (БББ) – вентилируемый шкаф, предназначенный для защиты пользователя и окружающей среды от аэрозолей, образующихся при работе с потенциально опасными и опасными микроорганизмами, оснащенный устройствами для фильтрации воздуха, выбрасываемого в атмосферу

Валидация (validation) – подтверждение, посредством представления объективных свидетельств, того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены.

Верификация (verification) – подтверждение, посредством представления объективных свидетельств, того, что установленные требования были выполнены.

Геномное секвенирование – группа методов определения нуклеотидной последовательности НК для получения формального описания её первичной структуры;

Гуморальный иммунный ответ организма представляет собой антитела против патогенов, в основном находящимся в крови и лимфе, а также в бесклеточной плазме или в сыворотке крови.

Диагностическая специфичность лабораторного теста – это число лиц, правильно классифицированных по результатам исследования, как не находящихся в определенном состоянии, деленное на истинное число всех лиц, не находящихся в определенном состоянии.

Диагностическая чувствительность лабораторного теста – это число лиц, правильно классифицированных по результатам исследования, как находящихся в определенном состоянии, деленное на число всех лиц, находящихся в определенном состоянии.

ДНК-микрочип, или ДНК-чип (англ. DNA microarray) —

представляет собой множество небольших одноцепочечных молекул — ДНК-зондов, которые ковалентно пришиты к твёрдому основанию

ДНК-полимераза – фермент, участвующий в репликации ДНК.

Заразная зона – помещение или группа помещений лаборатории, где осуществляются манипуляции с опасными патогенными биологическими агентами или вероятным на зараженность патогенным биологическим агентом материалом и их хранение.

Менеджмент (management) - скоординированная деятельность по руководству и управлению организацией.

Петлевая изотермальная амплификация – это техника амплификации НК в одной пробирке;

Прогностическая ценность отрицательного результата – характеристика точности теста, определяемая как доля правильных отрицательных результатов диагностического теста.

Прогностическая ценность положительного результата – вероятность наличия заболевания при положительном (патологическом) результате теста или доля правильных положительных результатов диагностического теста.

Псевдовирус – вирусоподобная частица, состоящая из оболочки вируса и нуклеиновой кислоты хозяина, образуются при совместном культивировании нескольких вирусов, у которых геном происходит от одной родительской формы, а наружная оболочка – от другой.

Рекомбинантный вирус – это вирус, в состав генома которого входят нуклеотидные последовательности геномов других вирусов или клеток.

Сероконверсия – это период времени, в течение которого специфические антитела обнаруживаются в крови.

Чистая зона – помещение или группа помещений лаборатории, где не проводятся манипуляции с опасными патогенными биологическими агентами.

Нормативные ссылки

СТ РК ГОСТ Р 52905-2009 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности»;

ГОСТ ISO 6710-2011 «Межгосударственный стандарт. Контейнеры для сбора образцов венозной крови одноразовые. Технические требования и методы испытаний»;

СТ РК ISO 15189-2015 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности»;

Закон Республики Казахстан от 16 мая 2014 года № 202-V «О разрешениях и уведомлениях» (с изменениями и дополнениями от 09.01.2018 г.);

Кодекс Республики Казахстан от 7 июля 2020 года № 360-VI «О здоровье народа и системе здравоохранения» (с изменениями по состоянию на 08.01.2021 г.);

Приказ МЗ РК от 8 сентября 2017 года № 684 «Об утверждении Санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества"»;

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 11 декабря 2020 года № ҚР ДСМ-257/2020 «Об утверждении Стандарта организации проведения лабораторной диагностики»;

СТ РК 3498-2019 «Опасные медицинские отходы. Требования к раздельному сбору, хранению, приему, транспортировке и утилизации (обезвреживанию)»;

Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Казахстан «О дальнейшем усилении мер по предупреждению заболеваний коронавирусной инфекцией среди населения Республики Казахстан»;

Приказ МЗ РК от 11 августа 2020 года № 96 «Об утверждении санитарных правил «Санитарно-эпидемиологические требования к объектам здравоохранения»»;

Приказ МЗ РК № 758 от 28.09.2015 г. об утверждении «Положения о деятельности организаций и (или) структурных подразделений организаций здравоохранения, осуществляющих лабораторную диагностику, а также объем и виды проводимых ими исследований».

Содержание

Перечень сокращений и условных обозначений	4
Понятия, используемые в методических рекомендациях.....	5
Нормативные ссылки	7
Введение.....	10
1 Основные элементы менеджмента лабораторий, проводящих исследования на вирус SARS-CoV-2	11
1.1 Лабораторные помещения.....	11
1.2 Требования к лабораторному персоналу	14
1.3 Биологическая безопасность.....	15
1.3.1 Общие положения	15
1.3.2 Принципы проведения уборки и дезинфекции	16
1.3.3 Требования к использованию средств индивидуальной защиты.....	18
1.3.4 Утилизация/уничтожение отходов.....	20
2. Сбор, хранение и транспортировка образцов для исследования на вирус SARS-CoV-2.....	20
2.1 Заявка на исследование	20
2.2 Виды биологического материала для исследования на вирус SARS-CoV-2.....	21
2.2.1 Материал из верхних дыхательных путей.....	21
2.2.2 Материал из нижних дыхательных путей	22
2.2.3 Образцы фекалий	22
2.2.4 Аутопсийный материал	22
2.2.5 Образцы сыворотки	22
2.3 Правила взятия образцов биологического материала.....	23
2.3.1 Мазки со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки у детей и взрослых	23
2.3.2 Слюна	24
2.3.3 Мокрота.....	24
2.3.4 Получение венозной крови для серологического исследования	24
2.4 Маркировка проб.....	24
2.5 Рекомендации по использованию транспортной среды для биологического материала на исследование методами амплификации нуклеиновых кислот.....	25
2.6 Правила подготовки проб венозной крови для транспортировки на исследование в лабораторию	25
2.7 Режим транспортировки проб с биологическим материалом	26
2.8 Прием проб в лабораторию	27
2.9 Бракераж проб	28
3 Подготовка образцов для проведения исследований	29
4 Методы амплификации нуклеиновых кислот	29
4.1 Объединение диагностического тестирования в пул для исследования МАНК.....	30
4.2 Подготовка к проведению экстракции нуклеиновых кислот.....	30

4.3 Реакция обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	31
5 Петлевая изотермальная амплификация / RT-LAMP (reverse transcription-coupled – Loop-Mediated Isothermal Amplification) (синтез нуклеиновых кислот с вытеснением цепи)	33
6 Геномное секвенирование вируса SARS-COV-2	34
6.1 Материал для секвенирования	35
6.2 Этапы проведения секвенирования	35
6.3 Частота и сроки проведения секвенирования	35
7 Серологические тесты	35
7.1. Диагностические экспресс – тесты, основанные на обнаружении антигена	35
7.2. Тестирование на определение антител к вирусу SARS-CoV-2	37
В зависимости от сложности анализов, тесты могут быть выполнены в течение 30 минут в полевых условиях или за несколько часов в лаборатории:	39
7.3 Иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA)	39
7.4 Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА)	40
7.5 Тесты обнаружения нейтрализующих антител	41
8 Выделение вируса SARS-CoV-2	41
9 Контроль качества лабораторных исследований	42
10 Регистрация случаев и выдача результатов тестирования	43
Заключение	44
Список использованных источников	45
Приложение 1	50
Приложение 2	51
Приложение 3	52

Введение

Новый коронавирус SARS-CoV-2 вызывает острое инфекционное заболевание COVID-19, преимущественно поражающее легкие. Впервые этот вирус обнаружен в городе Ухань провинции Хубэй в Китае в декабре 2019 года. SARS-CoV-2 является оболочечным вирусом, геном которого представлен однонитевой плюс-РНК, содержащей 30 тысяч пар оснований. Вирус SARS-CoV-2 относится к роду Betacoronavirus (Beta-CoV) семейства Coronaviridae, который относится ко II группе патогенности, как и другие представители данного семейства (вирус SARS-CoV, MERS-CoV) [1-2] в соответствии с Санитарными требованиями к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества по приказу МЗ РК №684 от 08.09.2017 г. У вируса SARS-CoV-2 существует механизм исправления и коррекции ошибок в РНК, что позволяет поддерживать частоту мутаций на относительно низком уровне. Геном вируса кодирует неструктурные (ряд из них необходим для образования репликационно-транскрипционного комплекса) и структурные белки, в том числе спайк-белок (S), белок оболочки (E), мембранный белок (M), нуклеокапсидный белок (N), а также белки, по-видимому, являющиеся вспомогательными [3-5].

Основным источником инфекции является больной человек, в том числе находящийся в инкубационном периоде заболевания.

Основные пути передачи коронавируса SARS-CoV-2: воздушно-капельный и контактный. Воздушно-капельный (основной) – реализуется при кашле, чихании и разговоре на близком (менее 2 метров) расстоянии, контактный – во время рукопожатий и при других видах непосредственного контакта с инфицированным человеком, а также через пищевые продукты, поверхности и предметы, контаминированные вирусом.

Вирус SARS-CoV-2 попадает в организм человека через клетки-мишени, имеющие на своей поверхности рецепторы ангиотензин превращающего фермента II типа (ACE2). Такие рецепторы располагаются на клетках эпителия дыхательного тракта, почек, пищевода, мочевого пузыря, подвздошной кишки, сердца, ЦНС. Однако основной и быстро достижимой мишенью являются альвеолярные клетки II типа (AT2) легких, что определяет развитие пневмоний [6-8].

Клиническая картина инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, многообразна – от бессимптомной инфекции вплоть до тяжелого заболевания [9-18].

Лабораторное диагностирование инфекции вируса SARS-CoV-2 позволяет своевременно начать соответствующие меры профилактики и контролировать течение инфекции.

Данный документ содержит методические рекомендации по проведению лабораторных исследований на вирус SARS-CoV-2.

1 Основные элементы менеджмента лабораторий, проводящих исследования на вирус SARS-CoV-2

1.1 Лабораторные помещения

Лаборатории, где проводят исследование на детекцию COVID-19, размещают в отдельно стоящем здании или в изолированной части здания, имеющей независимый вход. На входной двери лаборатории должны быть обозначены название лаборатории и знак «Биологическая опасность» (красного или красно-оранжевого цвета). Входная дверь должна иметь запирающее устройство, и доступ в лабораторию ограничен персоналом, имеющим на это разрешение.

Лаборатории, проводящие диагностические исследования, оборудуют двумя входами – для сотрудников и для получения биологического материала. Планировочные решения помещений лабораторий и размещение оборудования должны обеспечивать поточность движения как ПБА, так и персонала.

Допускается получение биологического материала через передаточное окно или передаточный шлюз. Лаборатория делится на «заразную» и «чистую» зоны, между которыми оборудуется санитарный пропускник для смены защитной одежды и принятия душа.

Лаборатория оснащается дублирующей системой электроснабжения и автономным (резервным, аварийным) источником электропитания (дизель-генератор), который должен обеспечивать бесперебойную работу важных инженерных систем и оборудования.

«Чистая зона» лаборатории включает гардероб для личной одежды, комнаты персонала, кабинет заведующего лабораторией, моечную комнату, туалет, складские помещения, лаборантскую и другие помещения, где не проводятся манипуляции с диагностическим материалом.

«Заразная зона» лаборатории в соответствии с этапами проведения анализа должна включать следующий набор последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон/ комнат или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений:

- комната для приема образцов;
- рабочие ПЦР – зоны;
- комната для проведения электрофореза;
- комната для проведения секвенирования;
- комната для проведения серологических исследований;
- автоклавная.

В комнате для приема образцов проводят прием образцов, их маркировку, регистрацию в специальном журнале, либо в электронном формате, первичную подготовку, объединение или разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала. Допускается проведение в данной комнате приема, регистрации, разбора и первичной обработки биологического материала,

исследуемого другими методами диагностики (бактериологическими, вирусологическими, иммунологическими и т.д.).

Лаборатория, проводящая ПЦР диагностику, должна быть разделена как минимум на три отдельных функциональных зоны/помещения (рисунок 1) [19]:

-рабочая зона 1 - подготовка реагентов (с использованием избыточного давления для предотвращения контаминации из других функциональных зон лаборатории);

-рабочая зона 2 - экстракция нуклеиновых кислот (с использованием отрицательного давления для удержания нуклеиновых кислот в комнате);

-рабочая зона 3 - амплификация и обнаружение продукта (с использованием отрицательного давления для удержания амплифицированных нуклеиновых кислот в комнате).

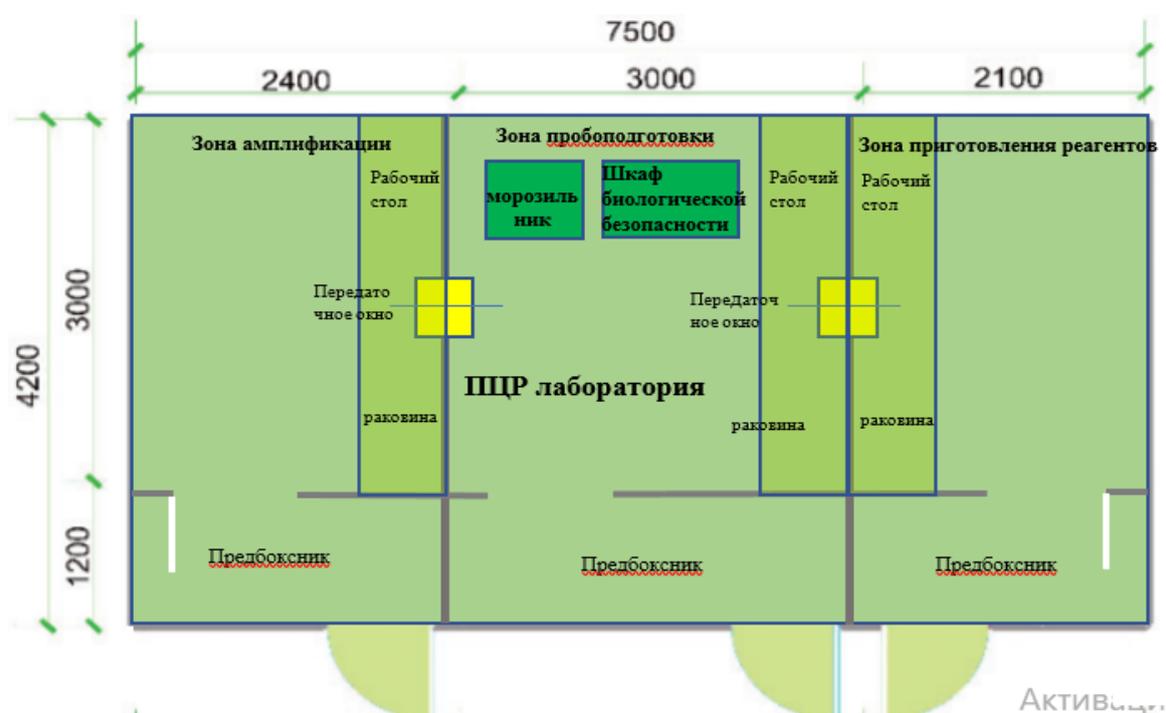


Рисунок 1 - Примерная схема планировки ПЦР лаборатории

В рабочей зоне 1 осуществляют приготовление реакционных смесей для проведения обратной транскрипции и ПЦР, аликвотирование реакционных смесей в пробирки для ПЦР. Для предотвращения перекрестного загрязнения и избежания повторного замораживания/оттаивания, исходные растворы реагентов следует разделить на аликвоты на меньшие объемы. В помещении должно быть избыточное давление для предотвращения контаминации. Персонал должен закончить выполнение задач в этой комнате, прежде чем начать работу в рабочих зонах 2 -3 и не должен возвращаться из этих зон в рабочую зону 1.

В рабочей зоне 2 проводят экстракцию и очистку нуклеиновых кислот. Далее выделенные образцы и контроли добавляются в пробирки,

содержащие реакционные смеси в данной рабочей зоне. Пробирки для ПЦР следует закрывать крышкой сразу после добавления образца.

Рабочая зона 3 предназначена для амплификации нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации. Рабочая зона 3 должна быть оснащена термоциклером или ПЦР машиной в режиме реального времени. Перчатки и лабораторные халаты необходимо постоянно носить во время нахождения в данной зоне и снимать перед выходом из комнаты, не допуская контаминации ампликонами других помещений. В этой зоне должно поддерживаться отрицательное давление.

Следует соблюдать однонаправленный рабочий процесс, чтобы снизить риск контаминации (рисунок 2).

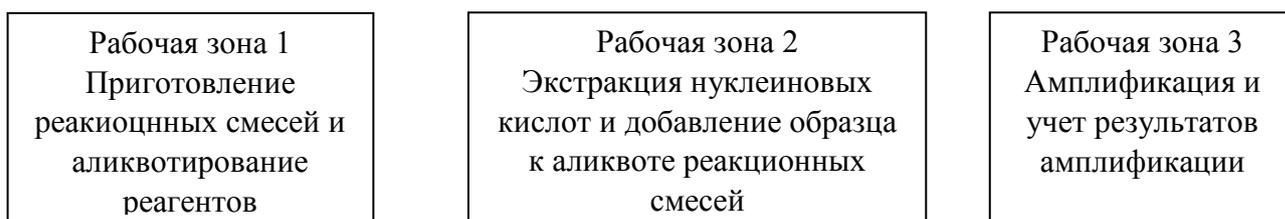


Рисунок 2 - Рабочий процесс ПЦР лаборатории

Комната для проведения электрофореза предназначена для учета результатов продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза и (или) гибридизационно-ферментным методом детекции.

Комната для проведения секвенирования предназначена для учета результатов продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования и (или) на ДНК-чипах. Объединение комнат для проведения электрофореза и секвенирования запрещено [23], их располагают изолированно от рабочих ПЦР зон 1-3 для предотвращения их контаминации продуктами амплификации через воздушный поток.

Для проведения исследований методом амплификации нуклеиновых кислот (далее – МАНК) соблюдается следующее:

1) каждая зона имеет свой набор мебели, холодильников/морозильников, лабораторного оборудования, реагентов, автоматических пипеток (дозаторов), наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, защитной одежды, обуви, одноразовых перчаток без талька, уборочного инвентаря и другого расходного материала, используемых только в данной комнате;

2) перенос оборудования, расходных материалов, реактивов, перчаток, халатов из одной зоны в другую не допускается;

3) вся работа по МАНК проводится в одноразовых перчатках без талька, которыми обеспечивается каждый этап работы;

4) условия хранения реагентов для проведения всех этапов МАНК соответствуют требованиям инструкции от производителя по применению реагентов. Клинические образцы хранятся отдельно от реагентов.

Автоклавная комната предназначена для обеззараживания исследуемого материала и контаминированных объектов. При возможности между «заразной» и «чистой» зонами устанавливается проходной автоклав с автоматической блокировкой дверей.

Все двери помещений в «заразной зоне» должны быть оснащены доводчиками, а также открываются только к наружу.

Помещения «заразной зоны» оборудуются бактерицидными облучателями для обеззараживания воздуха и поверхностей в соответствии с руководством по использованию ультрафиолетового бактерицидного излучения. В условиях жаркого климата разрешается установка кондиционеров в помещениях рабочих зон лаборатории при условии их выключения на время проведения работ с использованием МАНК с последующей дезинфекционной обработкой рабочего места. В помещениях «заразной» зоны, где проводятся работы с ПБА, не допускается установка системы водоснабжения, не защищенной техническими средствами для предотвращения обратного тока воды.

Из помещений «заразной» зоны запрещается слив (сток) необеззараженных жидкостей и жидких отходов в канализационную сеть.

Все манипуляции в комнате для приема образцов и рабочей зоне 2, включая манипуляции, сопровождающиеся риском образования аэрозолей (встряхивание, центрифугирование и т.д.) при обработке биологического материала и выделении нуклеиновых кислот, выполняются в боксах биологической безопасности II класса. Работы в рабочей зоне 1 и комнатах для проведения электрофореза и секвенирования выполняются в боксах биологической безопасности I- II класса защиты или ПЦР-боксе.

Исследования сывороток крови людей на определение антител к вирусу SARS-CoV-2 проводятся в отдельном серологическом боксе или в БББ II класса.

1.2 Требования к лабораторному персоналу

Эффективное управление персоналом обеспечивает биобезопасность (путем привлечения к работе пригодного персонала) и биозащиту (путем привлечения к работе надежного персонала) в лаборатории. В лабораториях при работе с опасными ПБА создаются комфортные и безконфликтные условия для персонала. Специалисты лаборатории должны быть осведомлены о существующих в лаборатории опасностях и связанных с ними рисках, а также безопасных рабочих процедурах, мерах безопасности, готовности к чрезвычайным ситуациям и реагировании на них. Специалисты, принятые на работу, проходят инструктаж по вопросам безопасности и охране труда в соответствии с Правилами и сроками проведения обучения,

инструктирования и проверок знаний по вопросам безопасности и охраны труда работников, утвержденными приказом Министра здравоохранения и социального развития РК от 25 декабря 2015 года № 1019 [21].

Пригодность персонала обеспечивается медико-биологическими мероприятиями, которые включают комплекс профилактических, лечебных и противозидемических мер:

1) сбор образцов, исследование биологического материала, подозрительного и/или содержащего микроорганизмы I–IV групп патогенности, имеют право проводить специалисты с высшим и средним медицинским, биологическим, ветеринарным и иным образованием, получившие дополнительное специальное образование на лицензированных курсах повышения квалификации по ПЦР-диагностике;

2) для работы с автоклавом допускаются лица, прошедшие обучение по работе с сосудами, работающими под давлением;

3) сотрудники лаборатории, работающие с зараженным или вероятным на зараженность биологическим материалом, в конце рабочего дня проходят термометрию температуры тела с фиксацией результатов в журнале и заверением подписи ответственного за термометрию;

4) при появлении респираторных симптомов или повышении температуры сотрудник лаборатории оповещает руководителя организации и немедленно изолируется до приезда скорой помощи;

5) выходить из помещений лаборатории в защитной одежде в период работы с заразным или подозрительным на зараженность биологическим материалом не допускается;

6) при авариях во время работы с ПБА пострадавшему своевременно должна быть оказана помощь в рамках специфических мероприятий, с применением средств «аварийной аптечки» и изоляции. А также в каждой лаборатории должен быть план действий при аварийной ситуации;

7) обо всех случаях заболевания сотрудников в результате аварии или лабораторного заражения во время работы с ПБА руководитель организации обязан немедленно информировать ТД [22].

1.3 Биологическая безопасность

1.3.1 Общие положения

Требования к биобезопасности к лабораториям, осуществляющим диагностику COVID-19, организуются в соответствии с принадлежностью вируса ко II группе патогенности. Деятельность лаборатории осуществляется на основании санитарно-эпидемиологического заключения, разрешающего проведение работ с возбудителями II группы патогенности.

Ответственность за организацию комплекса мероприятий по биологической безопасности по лаборатории в целом обеспечивает высшее руководство медицинской организации, заведующие лабораториями и специалист по биобезопасности [20].

Лаборатории на территории РК, выполняющие работы с биологическим материалом от больных и/или с подозрением на инфекции SARS-CoV-2, должны обязательно соблюдать требования нормативных правовых актов:

- Приказ МЗ РК от 8 сентября 2017 года № 684 «Об утверждении Санитарных правил «Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества» (далее – СанПин №684)

- Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Казахстан «О дальнейшем усилении мер по предупреждению заболеваний коронавирусной инфекцией среди населения Республики Казахстан» №67 от 25 декабря 2020 года

- Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 11 декабря 2020 года № ҚР ДСМ-257/2020 «Об утверждении Стандарта организации проведения лабораторной диагностики».

Несоблюдение требований вышеперечисленных нормативных документов приводит к возникновению угрозы жизни и здоровью человека, способствует распространению новых случаев инфекции SARS-CoV-2.

1.3.2 Принципы проведения уборки и дезинфекции

Принципы проведения уборки в лаборатории

В лаборатории необходимо поддерживать чистоту и порядок. Уборка позволяет удалить патогенные микроорганизмы или значительно уменьшить микробную контаминацию поверхностей, и является важным элементом санитарного содержания помещений. Механическая очистка при помощи воды, мыла способствует полному или частичному удалению неорганических и органических загрязнений, однако не приводит к гибели микроорганизмов [24]. Органическое загрязнение может препятствовать непосредственному контакту дезинфекционного средства с поверхностью и лишать определенные средства их бактерицидных свойств или снижать их эффективность.

Хранение материалов, которые не предназначены для работы или не могут легко обеззараживаться (журналов, книг, корреспонденции) должно быть сведено к минимуму.

В чистой зоне лаборатории уборку проводят с использованием моющих средств, в заразной зоне лаборатории используют растворы дезинфицирующих средств с последующим УФ-облучением помещений. Для каждой зоны используют отдельные промаркированные комплекты уборочного инвентаря. Уборочный инвентарь для каждой зоны следует хранить отдельно в специально отведенных и оборудованных местах.

Для полноценной уборки помещения необходимо производить ее поэтапно, начиная с наименее загрязненных (наиболее чистых) зон и перемещаясь к наиболее загрязненным (многочисленные загрязнения),

обрабатывая поверхности в направлении от расположенных выше к расположенным ниже, чтобы любой контаминированный материал, в конечном счете, попадал на пол, откуда его впоследствии удаляют. В присутствии значительного количества органических веществ во время уборки рабочие растворы моющих и дезинфекционных средств загрязняются, и их эффективность постепенно снижается; таким образом, длительное использование рабочего раствора может приводить к обсеменению обрабатываемых поверхностей патогенными микроорганизмами. По этой причине после обработки зон/помещений необходимо приготовить новый рабочий раствор моющего и (или) дезинфекционного средства [25].

Рабочие поверхности очищают и обеззараживают дезинфектантом в конце рабочего дня, а также после каждого разбрызгивания потенциально опасного ПБА. Рабочие поверхности, посуда, материалы и оборудование, которые стали проницаемыми для биологических материалов (треснувшие, впученные, со сколами и другое), подлежат замене или ремонту.

Принципы дезинфекции в лаборатории

Для дезинфекции используют зарегистрированные в Республике Казахстан дезинфицирующие средства. Приготовление и применение рабочих растворов дезинфекционных средств должно производиться согласно рекомендациям производителя в отношении разведения, а также времени контакта. При неправильном разведении (недостаточном или избыточном) дезинфекционного средства эффективность рабочего раствора может снижаться. Применение высококонцентрированных растворов может создавать более высокий риск вредного химического воздействия для пользователей, а также приводить к повреждению поверхностей. При правильном расходе рабочего раствора обрабатываемая поверхность остается влажной и не используется в течение времени, необходимого для инактивации патогенных микроорганизмов. Средства для дезинфекции, активные в отношении используемых возбудителей, должны всегда находиться в достаточном количестве в зонах, где осуществляется работа или хранение заразного материала.

Выбор дезинфекционного средства определяется видом микробного загрязнения, рекомендованной концентрацией рабочего раствора и временем контакта с поверхностью, устойчивостью материала поверхности к воздействию дезинфекционного средства, параметрами токсичности, удобством использования и стабильностью средства [25].

При выборе дезинфекционного средства для обработки поверхностей в МО необходимо руководствоваться логарифмическим показателем (десятичный порядок) снижения концентрации вирусного возбудителя COVID-19 [26]. В целях снижения концентрации коронавирусных частиц [27] не менее чем на четыре порядка ($>4 \log_{10}$), дезинфекция поверхностей в помещениях после уборки может производиться при помощи указанных ниже дезинфекционных средств в соответствующих концентрациях; кроме того, эти средства активны в отношении других патогенных

микроорганизмов, имеющих медицинское значение и встречающихся в МО.

- Этанол 70 %;

- Хлорсодержащие средства (например, гипохлорит) 0,1 % (1000 чнм) для обеззараживания незагрязненных помещений или 1% (10000 чнм) для обеззараживания значительного объема растекшейся крови, либо биологических жидкостей. При использовании данных дезинфекционных средств рекомендуемое время контакта должно составлять не менее 10 минут, либо соответствовать указанному производителем. Допускается применение других дезинфекционных средств при условии, что производителем заявлена их активность в отношении соответствующих микроорганизмов, в особенности оболочечных вирусов. В ходе приготовления рабочих растворов при их разведении и использовании необходимо руководствоваться рекомендациями производителей в отношении техники безопасности, а также допустимости или недопустимости смешивания с химическими дезинфекционными средствами других типов [25].

Обеспечение безопасности персонала в ходе приготовления и применения дезинфекционных средств

В целях безопасного обращения с дезинфекционными средствами и приготовления рабочих растворов необходимо следовать инструкции производителя, а также применять соответствующие средства индивидуальной защиты (СИЗ) во избежание вредного воздействия химических веществ. Приготовление рабочих растворов должно производиться в хорошо проветриваемых помещениях. Не следует смешивать различные дезинфекционные средства во время приготовления или использования рабочих растворов в связи с риском раздражения дыхательных путей, а также образования потенциально ядовитых газов, в частности, при смешивании с растворами гипохлоритов. Для персонала, осуществляющего приготовление или применение растворов дезинфекционных средств, необходимы специализированные СИЗ ввиду использования высоких концентраций дезинфектантов, а также длительного времени экспозиции ими в продолжение рабочего дня.

1.3.3 Требования к использованию средств индивидуальной защиты

Средства индивидуальной защиты (далее - СИЗ) – это специальным образом сконструированная одежда и оборудование (защитные очки, лицевые щитки, респираторы/маски, перчатки), ношение которых призвано защитить носящего от инфицирования. СИЗ должны быть подобраны в соответствии с размером одежды персонала. Запрещается носить лабораторную обувь с открытым носком и костюм с короткими рукавами, запрещается носить лабораторную одежду вне зон лаборатории.

СИЗ в «чистой» зоне. В «чистой» зоне лаборатории персонал носит

медицинский костюм, состоящий из верхней и нижней частей, лабораторную обувь, перчатки, при необходимости – шапочку и халат. Медицинский костюм надевается в гардеробной и хранится отдельно от личной одежды в специально отведенном чистом, сухом месте для предотвращения загрязнения.

СИЗ в «заразной» зоне. Перед одеванием СИЗ снимаются все украшения. Для работы в «заразной» зоне персонал дополнительно надевает следующие виды СИЗ – защитный халат по типу хирургического или комбинезон, шапочка, респиратор, очки или лицевой щиток, вторая пара перчаток, бахилы или отдельная обувь для «заразной» зоны, при необходимости – фартук и нарукавники.

СИЗ для «заразной» зоны надевается в санпропуснике при входе в «заразную» зону и при входе в «заразный» бокс. При выходе из «заразной» зоны СИЗ снимается в емкости/мешки для обеззараживания и последующей утилизации. Зоны для одевания и снятия защитной одежды не должны пересекаться.

СИЗ используются однократно, если не указано производителем или не согласовано для многократного использования. СИЗ необходимо менять при его повреждении или загрязнении. Многоцветные СИЗ (например, защитные очки/щитки) необходимо обеззараживать после каждого использования в соответствии с инструкциями производителя.

Перчатки (латексные, виниловые, из сополимерных материалов) надевают при выполнении всех процедур, которые могут сопровождаться непосредственным контактом кожи рук с биологически опасным материалом или зараженными животными. Перчатки следует снимать перед выходом из лаборатории и обеззараживать вместе с другими отходами перед их удалением.

При выполнении процедур, требующих защиты глаз и лица (разбрызгивание веществ, воздействие аэрозолей при аварии), необходимо определить и использовать средства защиты, соответствующие оцениваемому риску.

В случае выявленного или предполагаемого контакта с ПБА, загрязненная одежда должна быть обеззаражена до сдачи ее в стирку.

Медицинским и лабораторным специалистам необходимо соблюдать гигиену рук до и после любого прямого контакта с пациентом, контакта с потенциально инфекционным материалом, с поверхностями вокруг пациента с подтвержденным или предполагаемым COVID-19, перед надеванием и после снятия СИЗ, в том числе перчаток. Последовательность при снятии СИЗ следующая: снять перчатки и халат, помыть/обработать руки, снять защитный щиток (очки) и маску (респиратор), помыть/обработать руки (руки моются/обрабатываются дважды при снятии СИЗ) [22]. Следует отметить, что использование перчаток не заменяет гигиену рук (при видимом загрязнении рук - вода с мылом 40-60 сек, если видимое загрязнение отсутствует - антисептик на основе 70 % этанола 20-40 сек.).

При визите на домашний очаг СИЗ, до использования, следует перевозить в чистом контейнере. После использования в домашнем очаге снимается на выходе и складывается в пакет для отходов класса В.

Мытье рук персонала осуществляется путем подачи жидкого мыла с диспенсера и высушивание рук производится разовыми бумажными полотенцами. После окончания работы руки персонала обрабатываются дезинфицирующим раствором или 70° спиртом.

В грязной зоне находятся маркированный контейнер для сбора медицинских отходов класса В (для сбора использованных СИЗ), раковина для мытья рук и антисептики для обработки рук [22].

1.3.4 Утилизация/уничтожение отходов

Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с требованиями СТ РК 3498-2019 «Опасные медицинские отходы. Требования к отдельному сбору, хранению, приему, транспортировке и утилизации (обезвреживанию)». Все медицинские отходы, в т.ч. биологические выделения пациентов с подозрением на /или с COVID-19, утилизируются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями, применяемыми к отходам класса «В».

2. Сбор, хранение и транспортировка образцов для исследования на вирус SARS-CoV-2

2.1 Заявка на исследование

Территориальный департамент, медицинские организации и лаборатории независимо от формы собственности, осуществляющие забор биологических материалов на проведение лабораторного исследования на вирус SARS-CoV-2 МАНК обязаны заполнить направление с заполнением всех данных исследуемого согласно форме, указанной в **Приложении 1** и обеспечить регистрацию электронного направления в Едином интеграционном портале (ЕИП) НЦЭ (с момента предоставления доступа) [22].

Если в лаборатории внедрена программа «электронная лабораторная информационная система», то направление на лабораторное исследование оформляют в электронном виде через систему удаленной электронной регистрации после авторизации в системе.

В направлении указывают:

- название МО;
- контактное лицо от МО, Ф.И.О., номер телефона; ИИН пациента
- Ф.И.О. пациента, пол, дата рождения, контактный телефон;
- дата и время взятия образца;
- дата и время отправки образца в лабораторию;

- лицо, отбравшее биологический материал: должность, Ф.И.О., подпись;
- лицо, принявшее биологический материал: должность, Ф.И.О., подпись;
- дата и время доставки биологического материала;

2.2 Виды биологического материала для исследования на вирус SARS-CoV-2

Вид биологического материала, в наибольшей степени пригодного для исследования, определяется клинической картиной и временем, прошедшим с момента появления симптомов заболевания.

Выделяют следующие виды образцов:

- из верхних дыхательных путей (ВДП) (мазки из ротоглотки, мазки из носоглотки, носоглоточные секреты, слюна);
- из нижних дыхательных путей (НДП) (мокрота, секреты дыхательных путей, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеальный аспират);
- кровь, биопсийный или аутопсийный материал, включая ткань легких, фекалии.

2.2.1 Материал из верхних дыхательных путей

Материал из ВДП пригоден для выявления инфекции на ранней стадии, особенно у пациентов с бессимптомным или легким течением заболевания, максимальная концентрация вируса SARS-CoV-2 в ВДП приходится практически на то же время, что и от начала момента появления симптомов заболевания, после чего она начинает постепенно снижаться. Рекомендовано выполнять забор биологического материала в эти сроки, несмотря на то, что в МАНК РНК вируса SARS-CoV-2 может обнаруживаться и гораздо позднее (в среднем до 7 дней и максимум – до 2 недель от начала заболевания, при условии сохранения признаков поражения ВДП). У госпитализированных пациентов биологический материал для исследования следует собирать как можно раньше при поступлении (не позднее вторых суток), т.к. в более поздние сроки вирусная концентрация снижается. У некоторых пациентов вирусная РНК может определяться на протяжении всего нескольких дней, тогда как у других лиц она определяется в течение нескольких недель и, возможно, месяцев. Наличие вирусной РНК, которое наблюдается продолжительное время, не является однозначным свидетельством постоянной контагиозности.

Показано, что чувствительность теста на определение респираторных вирусов возрастает, и надежность результата повышается при исследовании материала комбинированного мазка из носоглотки и ротоглотки, взятого у

одного и того же пациента [28-32]. Для получения комбинированного мазка материал из двух мазков собирают в одну пробирку [33].

2.2.2 Материал из нижних дыхательных путей

Материал из НДП более предпочтителен на более поздних этапах COVID-19, а также при обследовании пациентов, у которых результат исследования материала из ВДП отрицателен, однако имеются веские основания для клинического подозрения на COVID-19 [29, 34-37]. Материалом из НДП может служить мокрота в случае ее спонтанного образования (стимуляция образования мокроты не рекомендуется, так как это увеличивает риск передачи инфекции по аэрозольному механизму [38]) и/или эндотрахеальный аспират либо промывные воды бронхов у пациентов с более тяжелым течением респираторного заболевания. Ввиду высокого риска образования аэрозолей при отборе проб необходимо соблюдать осторожность. Наличие показаний к назначению инвазивной процедуры устанавливает врач.

2.2.3 Образцы фекалий

В случае отрицательных результатов исследования материала из ВДП и НДП и наличии клинического подозрения на инфекцию COVID-19, начиная со второй недели после возникновения симптомов заболевания для исследования образцов фекалий могут применяться МАНК [39]. При исследовании фекалий необходимо удостовериться в том, что метод экстракции и МАНК валидированы для материала данного типа.

2.2.4 Аутопсийный материал

При проведении патологоанатомического исследования возможно выполнение мазков, сбор аутопсийного материала при помощи тонкой биопсионной иглы либо образцов тканей, в том числе легких, для патогистологического и микробиологического исследования [40-46].

2.2.5 Образцы сыворотки

В случае если имеются веские основания подозревать инфекцию, вызванную вирусом SARS-CoV-2, у пациента с отрицательным результатом МАНК, допускается сбор парных образцов сыворотки. Образцы, один из которых получен в острый период заболевания, а другой — в фазу реконвалесценции спустя 2–4 недели, могут способствовать выявлению сероконверсии или повышения титра антител. Данная пара образцов может применяться в дальнейшем для ретроспективного определения инфекции

COVID-19, особенно в случае невозможности ее выявления при помощи МАНК.

2.3 Правила взятия образцов биологического материала

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфекционными и работу с ними (взятие диагностического материала, его упаковку, маркировку и транспортировку) осуществлять в соответствии с СанПин № 684.

При получении образцов из ВДП соблюдать меры предосторожности в отношении капель, брызг и контактов с контаминированными поверхностями. При получении образцов из НДП следует учитывать повышенный риск воздушного пути заражения, поэтому их взятие допустимо в легко выполнимых условиях (например, у пациентов на ИВЛ). Рекомендовано избегать индукции мокроты.

2.3.1 Мазки со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки у детей и взрослых

С целью повышения чувствительности исследования забор биологического материала проводится двумя разными зондами сначала с носоглотки, а затем из ротоглотки, и объединяют их вместе (концы зондов с тампонами после взятия мазков помещают в одну пробирку с транспортной средой) и исследуют как один образец. **Нельзя** использовать зонды на деревянной основе и с хлопковыми тампонами, поскольку они могут инактивировать вирусы, и ингибировать реакцию ПЦР. Нужно использовать аппликатор из синтетического материала – дакрона или полиэстера! У детей берут сухим стерильным назофарингеальным велюр - тампоном на пластиковом аппликаторе, у взрослых сухим стерильным зондом из синтетического материала на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия, 3–4 см для детей, не менее 5 см для взрослых. После забора биологического материала конец зонда с тампоном опускают на глубину 1 см в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой, конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки, опустив рукоятку зонда вниз. Пробирку герметично закрывают.

Мазки из ротоглотки берут сухим стерильным зондом из синтетического материала тампоном вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки,

аккуратно прижимая язык пациента шпателем. При взятии мазков с ротоглотки избегать касания тампона языка, щек, зубов. После забора биологического материала рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку с транспортной средой и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда с тампоном (1 см) отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку.

2.3.2 Слюна

Соберите 1–5 мл слюны в стерильный герметичный контейнер с завинчивающейся крышкой. Консервант не требуется.

2.3.3 Мокрота

При глубоком откашливании собирают в стерильные одноразовые герметично закрывающиеся контейнеры натошак после чистки зубов и полоскания полости рта водой. Медицинский работник должен стоять на расстоянии 1-2 м от пациента. Сбор проводить в хорошо проветриваемом помещении.

2.3.4 Получение венозной крови для серологического исследования

Взятие венозной крови для исследования на иммуноглобулины к вирусу SARS-CoV-2 можно проводить в любое время суток. За 12 часов до взятия пациенту желательно не употреблять жирную пищу.

Рекомендуется взятие крови в вакуумные пробирки с консервантом (активатор свертывания или разделительный гель).

Непосредственно перед взятием венозной крови производится дезинфекция кожи в месте венепункции циркулярными движениями от центра к периферии дважды салфеткой спиртовой одноразовой. Необходимо дождаться полного высыхания спирта (антисептического раствора) (30–60 с) и провести манипуляцию. После венепункции аккуратно перемешать содержимое заполненной пробирки, переворачивая ее необходимое число раз. Перемешивание проводят осторожно, во избежание гемолиза. Сразу после заполнения и извлечения вакуумной пробирки из держателя ее нужно аккуратно перевернуть несколько раз на 180° для перемешивания пробы [47].

2.4 Маркировка проб

Требования к маркировке проб с биологическим материалом:

— проба должна подлежать маркировке несмываемым маркером, с указанием персонального идентификационного номера пробы, ФИО

пациента, вида биологического материала и даты сбора образца;

— если в лаборатории внедрено штрихкодирование, то медицинский /лабораторный специалист, проводящий взятие образца, должен наклеить один из парных штрих - кодов на центральную часть пробирки таким образом, чтобы считывание было возможно, второй из парных штрих-кодов наклеить на нижнюю часть бланка направления.

До момента транспортировки, взятые образцы необходимо хранить в холодильнике, при температурном режиме от 2 до 4 градусов.

2.5 Рекомендации по использованию транспортной среды для биологического материала на исследование методами амплификации нуклеиновых кислот

Согласно рекомендациям ВОЗ транспортная среда состоит из среды 199 или раствора Хенкса, 7,5% раствора БСА, раствора NEPES и антибиотиков. Входящий в данный состав транспортных сред компоненты препятствуют разрушению клеток человека и возбудителей инфекционных болезней, тем самым сохраняет их нуклеиновые кислоты, позволяя провести исследование с максимальной чувствительностью. Приготовленные по данному составу среды также описаны в методических рекомендациях «Методы лабораторной диагностики гриппа и ОРВИ» МЗ РК от 31.10.2008 г. и до настоящего времени успешно применялись для сбора клинических образцов для диагностики гриппа, ОРВИ, а также коронавирусной инфекции.

В настоящее время на рынке существуют огромное количество коммерческих вирусных транспортных сред для сбора биологических материалов для исследования МАНК.

Согласно ряду последних исследований, сбор мазка из носоглотки и ротоглотки на вирус SARS-CoV-2 в стерильный физиологический раствор (0,9% - хлорида натрия) столь же эффективно, как и использование коммерческих транспортных сред [48].

Таким образом, для транспортировки биологических материалов пациента на исследование методами амплификации нуклеиновых кислот с целью определения РНК вируса SARS-CoV-2 рекомендованы к использованию вирусные транспортные среды, содержащие противогрибковые и противомикробные добавки. При недоступности вирусологической транспортной среды допускается применение других растворов после их валидации. В качестве такого раствора может применяться физиологический раствор с фосфатным буфером, стерильный 0,9% физиологический раствор, минимальная питательная среда, со сроком хранения до 7 — 14 дней при +4°C до использования для сбора [49-51].

2.6 Правила подготовки проб венозной крови для транспортировки на исследование в лабораторию

Подготовка проб на серологическое исследование:

- после взятия венозной крови пробирку перемешивают несколько раз и устанавливают вертикально в штатив;
- после истечения не менее 15–20 мин. после взятия кровь центрифугируют при 3 тыс. об/мин. в течение 15 минут;
- после центрифугирования образцы крови устанавливают в штатив;
- штативы с образцами помещают в транспортный контейнер, транспортируют в вертикальном положении при температуре $+2^{\circ} - +8^{\circ}\text{C}$;
- направления на каждый образец и реестр проб помещают отдельно в полиэтиленовый пакет или в специальный отдельный наружный карман транспортировочного контейнера, категорически запрещено заворачивать пробирки с кровью в направительные бланки.

2.7 Режим транспортировки проб с биологическим материалом

Медицинские работники, выполняющие сбор и упаковывание клинических образцов для транспортировки в действующую лабораторию, должны быть обучены требованиям и правилам биологической безопасности при сборе и работе с биологическим материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами II группы патогенности, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты.

Биологические материалы для тестирования вируса SARS-CoV-2 хранятся в охлажденном состоянии ($4-8^{\circ}\text{C}$) и доставляются в лабораторию для исследования в течение 24-72 часов с момента отбора. В случае невозможности доставки проб в течение этого срока, рекомендуется хранить и транспортировать пробы в замороженном виде при температуре -70°C (и ниже) (при этом должна постоянно поддерживаться низкая температура). В случае отправки мазков в стерильном физиологическом растворе, а не в транспортной среде для вирусов, время доставки должно быть сокращено до 24 часов. Важно соблюдать правила обращения с образцами во время транспортировки, а также в лаборатории. Согласно рекомендациям ВОЗ режим хранения и транспортировки представлен в **Приложении 2**.

РНК более чувствительна к деградации, чем ДНК, поэтому для того, чтобы свести к минимуму деградацию РНК, во время транспортировки и хранения должны быть обеспечена соответствующая температура.

Образцы, взятые у пациента, следует транспортировать в лабораторию филиала НЦЭ, либо другую лабораторию, определенную для тестирования на вирус SARS-CoV-2, с соблюдением требований тройной упаковки согласно санитарным правилам «Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества», утвержденного приказом МЗ РК от 8 сентября 2017 года № 684.

Базовый принцип тройной упаковки должен применяться для всех инфекционных материалов. Он подразумевает три уровня (слоя) защиты:

- первичный контейнер, водонепроницаемый и герметичный контейнер, содержащий материалы для исследования. Контейнер упаковывается в достаточное количество адсорбирующего материала, чтобы в случае повреждения контейнера адсорбировать всю жидкость [51];

- вторичная упаковка (полиэтиленовый пакет), прочная водонепроницаемая герметичная упаковка, которая закрывает и защищает первичный контейнер (первичные контейнеры). В одну вторичную упаковку можно поместить несколько первичных контейнеров, каждый из которых должен быть завернут в мягкий материал; при этом в упаковке должен находиться адсорбирующий материал в количестве, достаточном для того, чтобы поглотить всю жидкость в случае повреждения контейнера.

- наружная упаковка - прочный термоизолирующий контейнер. Вторичную упаковку помещают в наружную упаковку для транспортировки с достаточным количеством амортизирующего материала. Наружная упаковка во время транспортировки защищает содержимое от неблагоприятных внешних воздействий – например, от механического повреждения. Для обеспечения температурных условий транспортировки в контейнер помещают охлаждающие элементы. На внешней стороне контейнера укрепляют этикетку с указанием адреса, телефона, электронной почты получателя и условия транспортирования.

Организация – отправитель – является ответственным за соблюдение требований правил упаковки и транспортирования до пункта пересылки, а также за правильность упаковки и отправления ПБА.

При необходимости транспортирования образцов с биологическим материалом внутри одного здания пробирки/контейнеры с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные влагонепроницаемые контейнеры-переноски, подвергающиеся обеззараживанию.

2.8 Прием проб в лабораторию

При доставке проб в лабораторию сотрудник лаборатории должен сверить количество направлений с количеством проб, зарегистрировать эти данные в журнале приема биологического материала, поставить свою подпись и получить подпись курьера.

Распаковка образцов проводится в БББ. Сотрудники, которые получают и распаковывают образцы, должны быть надлежащим образом осведомлены об опасностях, связанных с COVID-19; знать особенности обращения с разбившимися или протекающими контейнерами, а также уметь обращаться с разлитыми биологическими материалами и дезинфицирующими средствами для устранения любых загрязнений.

После доставки образца в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий биологический материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, маркировку пробирок с

образцами биологического материала, их целостность и зарегистрировать поступивший биологический материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме. При регистрации нумерация образцов должна быть идентична нумерации в бланках направлений на молекулярно-биологическое и/или серологическое исследование.

2.9 Бракераж проб

Критерии выбраковки проб на МАНК:

- немаркированные или несущие неверную (нечитаемую) маркировку;
- пробы, для которых не указана дата получения биологического материала;
- пробы, хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением требований, установленных для данного типа биологического материала;
- с нарушением целостности и/или герметичности пробирок (в т. ч. пролитые образцы);
- направление, прилагаемое к образцу, и/или сопроводительный лист отсутствует или заполнен(-о) не до конца, или проба не соответствует биоматериалу, например, вместо мокроты слюна.

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

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

Критерии выбраковки проб на серологическое исследование:

- незаполненные обязательные поля в направлении на анализ;
- невозможность прочесть в направлении / реестре данные пациента, отсутствие названия медицинской организации, направившей пробы;
- отсутствие штрих-кодов на направлении и/или пробирке;
- видимый хилез, гемолиз;
- отсутствие направления к пробе с биологическим материалом;
- неоформленный (пустой) бланк направления;
- биологический материал взят в несоответствующую емкость (не с тем консервантом, антикоагулянтом, в приспособленной посуде и др.);
- нарушены временные параметры доставки биологического материала после сбора или взятия;
- нарушены условия транспортировки (не в термоконтейнере, горизонтальная транспортировка проб, нарушена герметичность проб) [53].

Согласно приказу № ҚР ДСМ-175/2020 МЗ РК «Об утверждении форм первичной медицинской документации организаций здравоохранения»

от 30 октября 2020 года лаборатории медицинских организаций должны иметь бракеражный журнал (280/у) в бумажном формате.

3 Подготовка образцов для проведения исследований

Несмотря на то, что динамика инфекции, в том числе выделение вируса с различными жидкостями организма, изучена не полностью, на сегодняшний день установлено, что в пробах из ВДП (мазки из носоглотки или ротоглотки) вирус поддается обнаружению, как минимум, за 48 часов до появления симптомов (на предсимптоматической стадии) и в течение 12-14 дней (как минимум, 6-7 дней) после появления симптомов, а в пробах из НДП, включая мокроту, трахеальный аспират, бронхоальвеолярный лаваж и т.д.– до 20 дней и более (рисунок 3) [73].

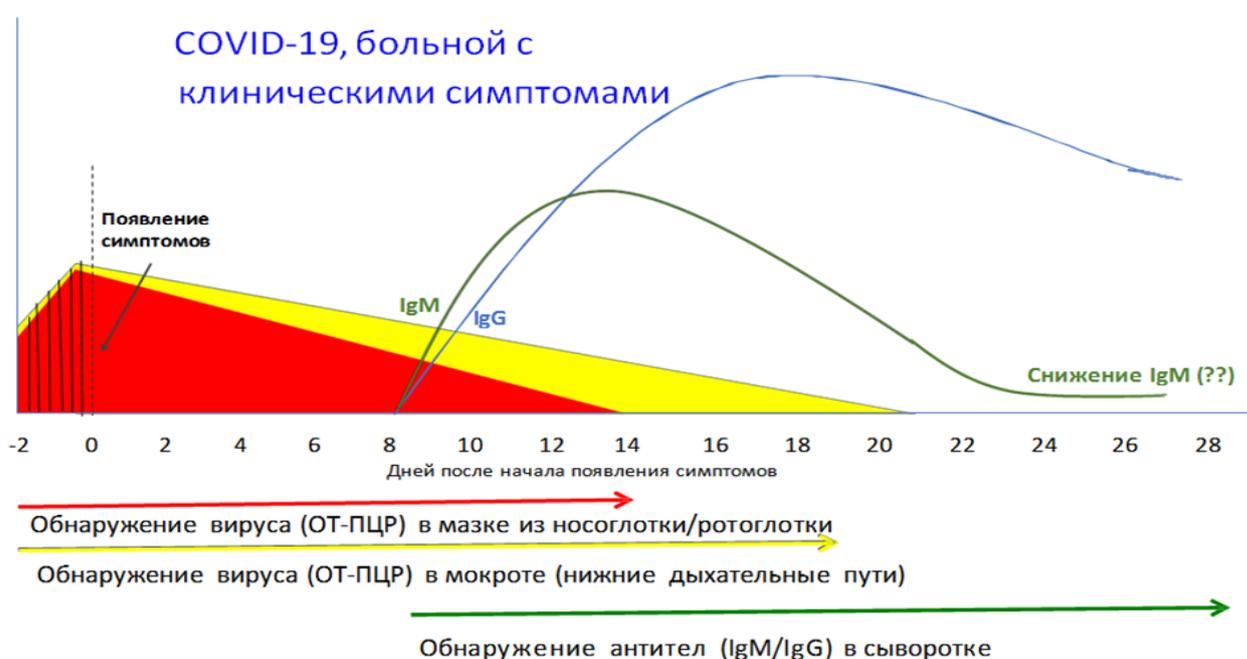


Рисунок 3 - Динамика инфекции COVID-19 [73]

4 Методы амплификации нуклеиновых кислот

В настоящее время в основе подтверждения острой инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, лежит определение уникальных последовательностей вирусного генома методами амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), например, методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). К числу мишеней относятся области генов вируса N, E, S и RdRP [47].

В лабораториях, выполняющих МАНК вируса SARS-CoV-2, проведение работ организовать в соответствии с общими правилами, установленными в СанПин №684.

4.1 Объединение диагностического тестирования в пул для исследования МАНК

Существует несколько способов работы с объединенной пробой. В случае если результат тестирования отрицателен, образцы, объединенные в пуле, считаются отрицательными. В случае получения в диагностическом пуле положительных результатов проводится индивидуальная диагностика каждого образца, объединенного в пул. Объединение образцов материала может быть использовано в группах населения с низкой/крайне низкой расчетной распространенностью инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Согласно ПГГСВ допускается проведение скрининговых исследований путем объединения диагностического тестирования в пул в закрытых организованных группах населения.

Тем не менее, данная методика непригодна для случаев или когорт пациентов, имеющих распространенность инфекции более 15 % [71], вызванной вирусом SARS-CoV-2. По мере увеличения распространенности COVID-19 экономия средств на стратегии объединения уменьшается, поскольку большее количество объединенных проб даст положительные результаты, и каждый образец, объединенный в пул, следует тестировать индивидуально. Не рекомендуется использовать методику объединения образцов материала, полученных у различных пациентов, в рутинной клинической практике или при отслеживании контактов [55-58].

Кроме того, необходимо принимать во внимание риск перекрестного загрязнения материала, а также возможного усложнения рабочих процедур и увеличения объема работы. На основании имеющихся в настоящее время данных допускается применение интраиндивидуальной схемы объединения проб (несколько образцов материала, взятых у одного пациента, объединяют и исследуют как одну пробу) для материала, полученного из ВДП. Объединение по интраиндивидуальной схеме мокроты, фекалий и материала из ВДП не рекомендуется ввиду того, что мокрота может содержать соединения, вызывающие ингибирование ОТ-ПЦР-РВ.

4.2 Подготовка к проведению экстракции нуклеиновых кислот

В лаборатории, где выделяют нуклеиновые кислоты (рабочая зона 2) должен быть холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой на минус 16-20°C. В холодильнике размещают реактивы и тест-системы, которые используются во 2 рабочей зоне. Ежедневно, 2 раза в сутки (утром и вечером) отмечается температура холодильного оборудования, холодильных и морозильных комнат/камер и результаты записываются в специальный лабораторный журнал учета температурного режима ответственным лабораторным сотрудником. Каждый холодильник снабжается двумя

термометрами, которые устанавливаются в верхней и нижней части холодильника. Термометры подвергаются ежегодной метрологической поверке. На случай возникновения чрезвычайных ситуаций и/или неисправности холодильного оборудования, холодильных и морозильных комнат или камер, или отключения электроэнергии, разрабатывается план экстренных мероприятий по обеспечению условий холодной цепи для хранения реактивов и тест-систем, который утверждается руководителем организации/лаборатории. На случай отключения электроэнергии предусматривается автоматическое подключение холодильного оборудования, холодильных и морозильных комнат или камер к системе бесперебойного электроснабжения (генератор). Для соблюдения условий холодной цепи при хранении и транспортировке реактивов и тест-систем, предусматриваются резервное холодильное оборудование, холодильные комнаты или камеры, запасные части к ним, термоконтейнеры, хладоэлементы [54].

Внимание! Все оборудование одного рабочего места должно быть промаркировано и использоваться исключительно на данном рабочем месте (т.е. выносить оборудование и перемещать его с одного места на другое запрещено). Перемещение оборудования значительно затрудняет контроль за загрязнением рабочего места (контроль контаминации). В зоне выделения нуклеиновых кислот обязательно должен быть контейнер для опасных медицинских отходов (класса В).

4.3 Реакция обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Приготовление реакционных смесей (далее – РС) для проведения обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот осуществляют в рабочей зоне 1. Перед началом работы необходимо прочитать инструкцию, разморозить реагенты, открутить на вортексе и осадить капли. Напоминаем, что ферменты не перемешиваются на вортексе, есть риск повреждения ферментов. Все компоненты РС следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых, контрольных образцов и с запасом на один образец (N+1). Реагенты смешиваются в определенном порядке - согласно инструкции и в чистой пробирке, которая затем подписывается. Если у вас мультипрайм и необходимо приготовить несколько смесей, сразу подписать на крышке наименование смеси, чтобы не перепутать при внесении. Согласно инструкции, смесь тщательно перемешивается, и осаждаются капли на стенках пробирки и крышки.

Теперь можно доставать пробирки (на 0,2 или 0,1 мл) для проведения ПЦР-реакции и вносить РС (объем указан в инструкции). Пробирки,

содержащие РС перенести в рабочую зону 2 и до добавления выделенных образцов хранить в холодильнике при температуре +4-8°C.

Внесение выделенных образцов проводится в рабочей зоне 2. Напоминаем, что пробирки с сорбентом лучше открутить на центрифуге еще раз перед самым внесением пробы в смесь, чтобы избежать захвата сорбента. Плотнo закрываем пробирки и подписываем. Используем штатив для переноса пробирок к приборам.

В рабочей зоне 3 проводится реакция обратной транскрипции, амплификации и детекция продуктов амплификации.

В случае необходимости проведения обратной транскрипции (отдельно от этапа амплификации) важно обеспечить корректные условия хранения выделенной РНК до момента ее внесения в подготовленную РС для ОТ. Это обусловлено нестабильностью нуклеиновой кислоты, особенно при комнатной температуре (хранение – не более 30 минут), поэтому полученный препарат РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции ОТ. На этапе составления РС для ОТ пробирки с выделенной РНК желательно убрать в холодильник (при +2 ... +8 °С – хранение до 4 часов). Реагенты для ОТ и/или амплификации, режим хранения которых соответствует –18 ... –20 °С, также не рекомендуется долго держать вне морозильной камеры.

Вообще, если процесс ОТ и/или амплификации существенно отдален по времени от процесса выделения НК, то допускается длительное хранение выделенных НК (очищенные препараты РНК и ДНК, кДНК) при температуре до –20 °С в течение 1 месяца, при –70 °С – до 6 месяцев. При этом важно учитывать, что любой выбранный режим хранения сопряжен с деградацией препарата НК и, как следствие, приводит к снижению чувствительности МАНК. Особенно критичным это может быть для низкокопийных образцов (высокий риск ложноотрицательных результатов). Рекомендацией в данной ситуации может быть строгое следование инструкциям конкретного производителя наборов реагентов для выделения, ОТ и амплификации. При этом образцы проб, содержащих нуклеиновые кислоты и (или) ампликоны, хранят отдельно от реагентов в разных холодильниках.

В целом зональность ПЦР-лаборатории должна обеспечить поточность движения (однонаправленное движение) исследуемого материала, проб нуклеиновых кислот, продуктов амплификации.

При использовании планшетного термоциклера не надо маркировать крышки пробирок, во избежание загрязнения оптики. Порядок размещения пробирок записывается на отдельном бумажном шаблоне.

Приборы должны быть снабжены стационарными компьютерами, источниками бесперебойного питания.

Факторы, влияющие на получение ложноотрицательного результата в ПЦР-анализе:

- неудовлетворительное качество образцов в связи с низким объемом содержащегося материала, т. к. на различных стадиях заболевания

распределение вирусной нагрузки разное;

- получение образцов на поздних стадиях заболевания либо отбор проб из анатомической области, в которой на момент процедуры не имелось вирусных частиц;

- нарушение требований преаналитического этапа ПЦР-анализа (условий и правил взятия биологического материала в соответствующую транспортную среду, маркировки и регистрации проб, соблюдения температурного режима хранения, транспортировки, временного режима доставки проб к месту исследования от момента взятия биологического материала и др.), т. к. РНК вируса SARS-CoV-2 нестабильна и легко разрушается;

- нарушение требований аналитического этапа ПЦР-анализа (инструкции выполнения исследования, соблюдения температурного режима амплификации), чувствительность используемой тест-системы или технические факторы, связанные с выполнением теста, например, мутация вируса или ингибирование ПЦР;

- нарушение требований постаналитического этапа ПЦР-анализа (учет и интерпретация результата исследования).

Факторы, влияющие на получение ложноположительного результата в ПЦР-анализе:

- нарушение санитарных норм и правил при зонировании ПЦР лаборатории;

- нарушение требований аналитического этапа ПЦР-анализа (контаминация реагентов используемой тест-системы, контаминация проб), специфичность используемой тест-системы;

- нарушение требований постаналитического этапа ПЦР-анализа (учет и интерпретация результата исследования);

- технические ошибки (перепутали пробы).

5 Петлевая изотермальная амплификация / RT-LAMP (reverse transcription- coupled – Loop-Mediated Isothermal Amplification) (синтез нуклеиновых кислот с вытеснением цепи)

Петлевая изотермальная амплификация предназначена для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в образцах, полученных из назальных и/или фарингеальных мазков, или раствора бронхоальвеолярного лаважа.

Принцип технологии данного теста, не отличается от классической ПЦР - это наращивание количества целевых фрагментов ДНК и их детекция. Однако в изотермической амплификации, в отличие от классической ПЦР, где необходимы циклы нагрева и охлаждения, все происходит при одной температуре. Это позволяет многократно увеличивать скорость реакции.

Процедура этапов тестирования:

- экстракция РНК вируса SARS-CoV-2 из анализируемых образцов;
- петлевая изотермальная амплификация при постоянной температуре 60–65°C, с использованием специфических олигонуклеотидных последовательностей и модифицированной ДНК-полимеразы I из термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*, в результате происходит быстрое накопление продуктов реакции (15–60 мин.), существует возможность ее совмещения с обратной транскрипцией;
- анализ полученных результатов и их интерпретация.

6 Геномное секвенирование вируса SARS-COV-2

Секвенирование может применяться для изучения динамики вспышки заболевания, в том числе изменений масштабов эпидемии, динамики ее географического распространения, а также проверки гипотез о путях передачи инфекции. Регулярное определение последовательности вируса SARS-CoV-2 в образцах из биологических материалов может быть полезным для мониторинга мутаций вирусного генома, способных повлиять на эффективность диагностических тестов (таблица 1) [66].

Таблица 1

Задачи геномного секвенирования вируса SARS-CoV-2 для нужд общественного здравоохранения

Малозатратные мероприятия, после выполнения которых повторное секвенирование либо не требуется, либо проводится в разовом порядке в рамках последующего наблюдения	Мероприятия, требующие систематического проведения секвенирования в течение более длительного периода	
<p>Идентификация вируса SARS-CoV-2 как возбудителя болезни.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Создание тестов на SARS-CoV-2. - Поддержка разработки лечебных препаратов и вакцин. - Установление времени появления вируса SARS-CoV-2 в качестве возбудителя инфекции человека и исследование его происхождения (текущая деятельность). - Реинфекция: <ul style="list-style-type: none"> • оценка и углубление понимания данного феномена; • на индивидуальном уровне 	<p>Эволюция вируса SARS-CoV-2 и ее влияние на:</p> <ul style="list-style-type: none"> - сдвиги в поведении вируса (фенотипические изменения), например, изменения трансмиссивности или патогенности; - иммунитет (как результат вакцинации или перенесенной инфекции); - действие средств диагностики (молекулярные, серологические и антигенные тесты); - терапевтические вмешательства (например, применение моноклональных антител). 	<p>Мониторинг распространения и активности вируса:</p> <ul style="list-style-type: none"> - изучение географического распространения и реинтродукции между популяциями; - расследование вспышек в конкретных условиях и среди определенных групп (например, в больницах); - мониторинг зоонозной реинтродукции в обоих направлениях с преодолением межвидовых барьеров; - мониторинг природной водной среды и сточных вод; - поддержка процессов традиционного эпиднадзора: расчет периода передачи и оценка движущих факторов, а также определение уровня передачи в

– дифференциальный диагноз между затяжной инфекцией и реинфекцией.		популяции.
--	--	------------

6.1 Материал для секвенирования

Материалом служат положительные в ПЦР в режиме реального времени образцы на SARS-CoV-2 с Ct значением не более 25 и количество образцов для секвенирования минимум 15 положительных образцов в неделю.

6.2 Этапы проведения секвенирования

Рабочий алгоритм полногеномного секвенирования вируса SARS-CoV-2 схематично показан на рисунке 4.

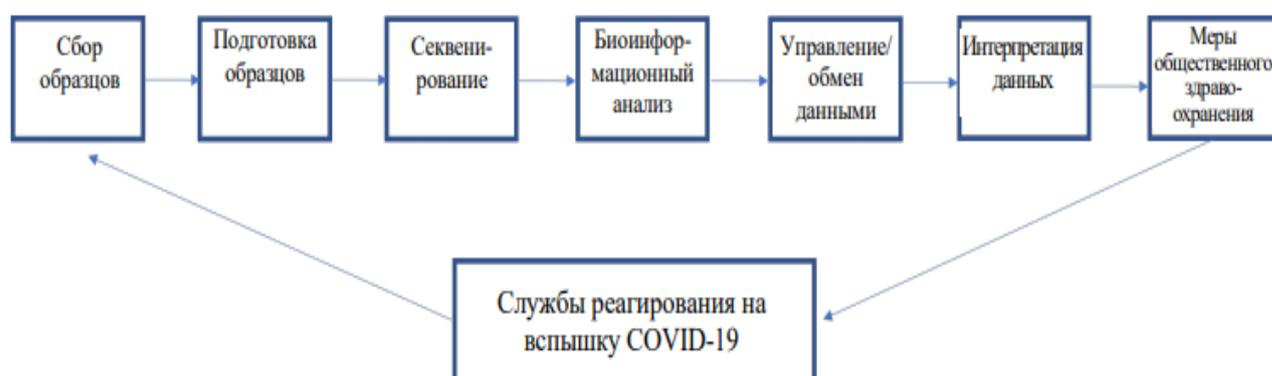


Рисунок 4 - Рабочий алгоритм полногеномного секвенирования вируса SARS-CoV-2.

6.3 Частота и сроки проведения секвенирования

Рекомендуется систематическое проведение секвенирования не менее 1 раза в месяц в течение более длительного периода. Перед проведением отбора образцов у исследуемых контингентов необходимо проводить письменное анкетирование (опрос), для дальнейшего анализа изменений генетической структуры вируса SARS-CoV-2 (Приложение 3).

7 Серологические тесты

7.1. Диагностические экспресс – тесты, основанные на обнаружении антигена

Диагностические экспресс - тесты на основе обнаружения антигенов (ДЭТ-Аг) предназначены для непосредственного обнаружения белков вируса

SARS-CoV-2, создаваемых размножающимся вирусом и попадающих в выделения из респираторного тракта [47].

В большинстве ДЭТ-Аг для SARS-CoV-2 применяется сэндвич-метод иммунологического анализа, состоящий из простого в применении тест-формата иммунохроматографического анализа. ДЭТ-Аг обычно представляют собой пластиковую кассету с лунками для пробы и буфера, матричной полоской из нитроцеллюлозы, с тестовой линией с нанесенными антителами, специфическими для целевых комплексов антиген-антитело, а также контрольной линией с нанесенным антителом, специфическим для конъюгированного антитела. В случае с ДЭТ-Аг на SARS-CoV-2, исследуемым веществом зачастую является нуклеокапсидный белок вируса SARS-CoV-2.

После забора пробы респираторного материала и нанесения ее на тестовую полоску, сотрудник сможет получить результат в течение 10—30 минут.

В отличие от МАНК, амплификации определяемой мишени не происходит, в связи, с чем данный вид тестов характеризуется более низкой чувствительностью. В связи с этим отрицательный результат ДЭТ-Аг не следует считать основанием для исключения случая заражения, следовательно, в качестве подтверждающего теста для симптоматических пациентов рекомендуется проведение дополнительного МАНК.

Специфичность доступных ДЭТ-Аг, как правило, такая же, как у МАНК, высокая – это означает, что ложноположительные результаты маловероятны.

ДЭТ-Аг работают лучше всего, когда человек проходит тестирование на ранних стадиях заражения вирусом SARS-CoV-2 (в течение первых 5–7 дней), когда вирусная нагрузка обычно самая высокая (значения $Ct \leq 25$ или >106 геномных вирусных копий /мл) [59-60].

Это дает возможность раннего диагностирования и прерывания передачи путем точечной изоляции и группирования наиболее заразных больных и их ближайших контактных лиц [61]. У пациентов, которые обращаются за помощью позже, чем через 5–7 дней после дебюта симптомов, чаще обнаруживается более низкая вирусная нагрузка, что, в свою очередь, повышает вероятность ложноотрицательного результата ДЭТ-Аг.

Применение ДЭТ-Аг не рекомендуется в условиях или популяциях с низкой ожидаемой распространенностью заболевания (например, скрининг в пунктах пропуска, аэропортах, сдача крови, плановая операция). Так как, распространенность вируса SARS-CoV-2 значительно различается среди пересекающих границу лиц, что делает невозможным определение прогностических ценностей положительного (ППР) (доля правильных положительных результатов диагностического теста) или отрицательного (ПОР) (доля правильных отрицательных результатов диагностического теста) результатов теста.

Алгоритм определения на антиген представлен на рисунке 5.

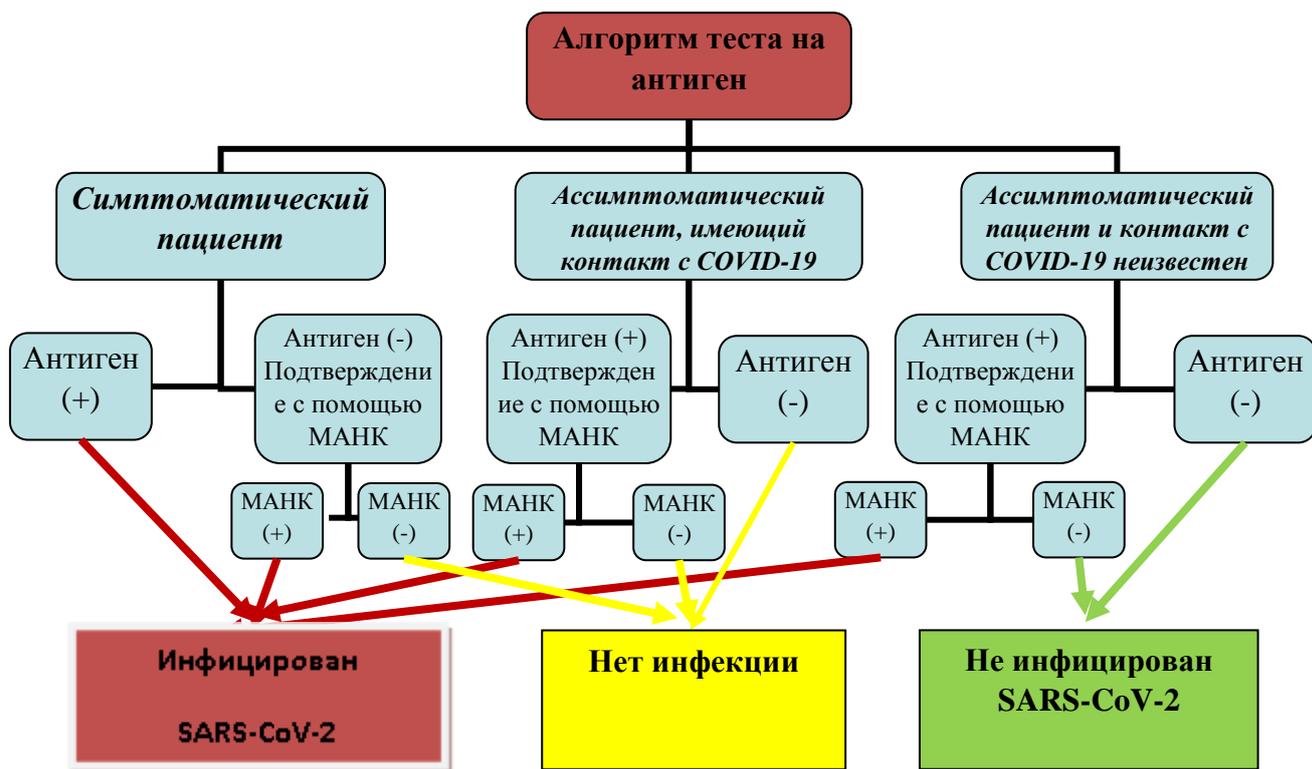


Рисунок 5 - Алгоритм теста на антиген

7.2. Тестирование на определение антител к вирусу SARS-CoV-2

Согласно Временным рекомендациям ВОЗ «Роль иммунохимических экспресс-тестов для определения антигенов в диагностике инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2», экспресс тест для определения антигена вируса SARS-CoV-2 рекомендуется к применению в случаях:

- при отсутствии возможности использования МАНК. В таких случаях ДЭТ-Аг должны отвечать минимальным характеристикам чувствительности $\geq 80\%$ и специфичности $\geq 97\%$;

- при расследовании предполагаемых вспышек COVID-19 в отдаленных районах, труднодоступных учреждениях и полузакрытых коллективах, когда проведение МАНК не доступно для оперативного применения;

- при реагировании на подтвержденные вспышки COVID-19 (случаи подтверждены с помощью МАНК) в закрытых и полузакрытых коллективах;

- для скрининга лиц из групп риска и их оперативной изоляции в случае положительного результата тестирования (с последующим отслеживанием контактных лиц), а также направления образцов, охарактеризованных как отрицательные при использовании ДЭТ-Аг, на исследование с использованием МАНК в приоритетном порядке;

- для мониторинга динамики заболеваемости в коллективах во время вспышек заболеваний, особенно среди работников закрытых учреждений и работников здравоохранения, либо в районах с массовым характером распространения болезни;

- при широкой циркуляции вируса SARS-CoV-2 среди населения ДЭТ-Аг могут использоваться для раннего выявления и изоляции лиц с положительными результатами тестирования в организациях здравоохранения, домах-интернатах, тюрьмах, школах, а также среди медицинских работников, в том числе непосредственно занятых в ликвидации вспышки инфекции, и для отслеживания контактов. При отрицательных результатах тестирования, у пациентов с симптомами инфекции с применением ДЭТ-Аг рекомендуется проводить подтверждающее исследование с использованием МАНК [62];

- для тестирования контактных лиц без симптомов заболевания допускается, но при этом отрицательный результат тестирования с применением ДЭТ-Аг не должен являться основанием для прекращения карантина в отношении контактного лица.

Кроме того, экспресс тесты для определения антигена вируса SARS-CoV-2 могут быть использованы для экспресс - диагностики в приемных покоях стационаров (экстренная госпитализация), при наличии симптомов, не исключая COVID 19, для определения дальнейшей тактики ведения больного, в каретах скорой медицинской помощи, мобильными бригадами.

Серологические исследования не должны применяться в качестве самостоятельного средства диагностики острой инфекции вируса SARS-CoV-2 в клинической практике или при отслеживании контактов. Интерпретация выполненного теста должна производиться специалистом, и она будет зависеть от ряда факторов, в том числе длительности заболевания, клинических проявлений, эпидемиологических характеристик и распространенности инфекции в конкретных условиях, типа применяемого теста, метода валидации и достоверности результатов.

Серологический метод основан на определении наличия антител классов IgM/ IgG к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке крови. Данный метод выявляет разрешившуюся или перенесенную вирусную инфекцию вируса SARS-CoV-2 косвенно, измеряя гуморальный (постинфекционный) иммунный ответ человека на вирус. В случае с вирусом SARS-CoV-2 антитела IgM и IgG возникают почти одновременно в сыворотке крови в течение 2-3 недель после начала заболевания. Наличие антител к вирусу SARS-CoV-2 указывает на предыдущую инфекцию. Серологический метод является дополнительным методом исследования, не заменяет ОТ-ПЦР в качестве основного инструмента для диагностики активной инфекции вируса SARS-CoV-2, но имеет важное значение для мониторинга и своевременного реагирования на пандемию COVID-19.

Антигенными мишенями к тест-системам серологического метода являются два белка вируса SARS-CoV-2, против которых обнаруживаются

антитела, это белки S (спайковый гликопротеин) и N (нуклеокапсидный фосфопротеин). Белок S содержит две субъединицы, S1 и S2. Субъединица S1 содержит RBD (рецептор-связывающий домен), который опосредует связывание вируса с чувствительными клетками, тем самым обеспечивается проникновение вируса внутрь клетки. RBD – основная мишень для нейтрализующих антител. N-белок образует рибонуклеопротеидные комплексы в процессе сборки вириона, связываясь с геномом вирусной РНК, его основная функция – регулировать транскрипцию вирусной РНК во время репликации, способствуя синтезу собственных белков, вмешиваясь в метаболизм трансляцию белка и пролиферацию инфицированной клетки-хозяина, является наиболее широко экспрессируемым иммунодоминантным белком, который взаимодействует с РНК.

Количественная оценка антител класса IgG к спайковому (S) белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови позволяет судить о наличии поствакцинального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, так как вакцины-кандидаты, нацелены на выработку нейтрализующих антител против белка S или RBD [63]. Оценку поствакцинального иммунитета целесообразно проводить не ранее чем через 21 день после введения второго компонента вакцины.

Для определения иммунного ответа человека на вирус используются следующие типы анализов [64]:

Обнаружение связывающих антител классов IgM/ IgG к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке крови серологическим методом (ИФА, ИХЛА и др.).

В данном методе используются очищенные белки вируса SARS-CoV-2, а не живой вирус, и их можно проводить в лабораториях с более низким уровнем биобезопасности (например, III групп патогенности).

В зависимости от сложности анализов, тесты могут быть выполнены в течение 30 минут в полевых условиях или за несколько часов в лаборатории:

Тесты на месте (Point-of-care, ПОС) обычно представляют собой устройства с боковым потоком, которые выявляют IgG и IgM или общие антитела в сыворотке, плазме, цельной крови и / или слюне. Данный тест используется в пунктах оказания медицинской помощи, это означает, что процесс диагностического тестирования на вирус SARS-CoV-2 происходит во время оказания медицинской помощи пациентам и имеют дополнительные преимущества, включая скорость диагностики и простоту использования.

Лабораторные тесты используют иммуноферментный анализ (ИФА) или хемилюминесцентный иммуноанализ (ИХЛА) для обнаружения антител.

7.3 Иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA)

Несмотря на то, что регистрация результатов проводится в количественных показателях, в связи с отсутствием стандартизации антител

к различным антигенам, все существующие иммунохимические тесты на антитела к вирусу SARS-CoV-2 являются качественными (т.е. интерпретируются как «положительный» или «отрицательный»), даже если результат пропорционален количеству выявляемого анализата [64].

ИФА в диагностике вируса SARS-CoV-2 на текущий период времени разработан в качественном варианте и выполняется в лабораторных условиях. В качестве пробы для ИФА-исследования используют образцы сыворотки или плазмы крови.

В результате прохождения реакции образуется окрашенный продукт окисления, производящий результирующий сигнал, отражающий наличие специфических антител в образце пациента. В контексте COVID-19 методом ИФА наиболее часто определяют наличие у пациента антител IgM или IgG к вирусу SARS-CoV-2.

Учет результата производится относительно величин критического значения оптической плотности и соответственно коэффициента позитивности, полученных по формулам вычисления. В случае пограничного результата рекомендовано повторное исследование этих образцов параллельно с образцами данных пациентов, взятыми через 2–5 дней.

7.4 Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА)

ИХЛА является аналогом ИФА. В диагностике COVID-19 привлекателен тем, что, предположительно, позволяет определить количественный уровень содержания антител IgM или IgG к вирусу SARS-CoV-2 коронавируса в клиническом образце (сыворотке, гепаринизированной или цитратной плазме) на автоматизированных анализаторах.

Обнаружение на 1-й и 14-й день в сыворотке крови пациента титров антигенспецифичных IgM свидетельствует о том, что пациент встречался с вирусом SARS-CoV-2, а выявление титров антигенспецифичных IgG используют в качестве индикатора для ретроспективной диагностики и эпидемиологического исследования.

При положительных результатах IgM, IgG (индикаторов инфекции) нельзя исключить:

- возможность получения ложноположительного результата (кросс-реактивность);
- следы ранее перенесенной инфекции;
- первичное инфицирование или рецидив, в случае наличия клинических симптомов;
- бессимптомное течение COVID-19, в случае отсутствия клинических симптомов у пациента.

Как правило, обнаружение специфических антител после заражения вирусом SARS-CoV-2 указывает на то, что существует стимуляция антигеном, но не обязательно инфекционное заболевание, поэтому этот

метод является эффективным дополнением к обнаружению нуклеиновых кислот и является лишь косвенным доказательством заболевания COVID-19.

Кинетика гуморального ответа в диагностике вируса SARS-CoV-2 на текущий период времени:

- наличие антител не свидетельствует о контагиозности пациента;
- у большинства пациентов наблюдается иммунный ответ на контакт с вирусом;
- около 50 % пациентов с умеренными симптомами COVID-19 демонстрируют сероконверсию между 7–11-м днем от начала симптомов;
- максимальная вероятность сероконверсии у пациентов с ярко выраженными симптомами наблюдается на 14-й день, у пациентов с мало выраженными симптомами пик антител может сдвигаться;
- у госпитализированных пациентов с тяжелыми формами заболевания антитела могут появляться между 5–6-м днями после симптомов;
- появление антител (сероконверсия) сопровождается постепенным снижением вирусной нагрузки, а не резкой элиминацией вируса, т. к. наличия только сывороточных антител недостаточно для элиминации вируса;
- иммунный ответ выше у пациентов после 40 лет;
- оптимальным является выявление IgM и/или IgG для всех пациентов после 15 дня [64].

7.5 Тесты обнаружения нейтрализующих антител

Тесты обнаружения нейтрализующих антител определяют функциональную способность антител предотвращать заражение вирусом внутри клетки (*in vitro*). Тесты включают инкубацию сыворотки или плазмы с живым вирусом с последующим инфицированием и инкубацией клеток. Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие вирусов на чувствительные клетки, что связано с блокадой вирусных антигенов антителами, т.е. их нейтрализацией. Тестирование проводится в лабораториях, имеющих условия на работу с микроорганизмами II группы патогенности, а также требуется высококвалифицированный персонал.

8 Выделение вируса SARS-CoV-2

Выделение вируса в качестве рутинной диагностической процедуры не рекомендуется. Все процедуры, предусматривающие выделение вируса в культуре клеток, должны выполняться квалифицированным персоналом в лабораториях третьего уровня биологической безопасности (BSL-3 или II групп патогенности). При посеве образцов материала от пациентов, потенциально зараженных вирусом SARS-CoV-2, либо другими

респираторными вирусами, необходимо произвести тщательную оценку рисков, так как репродукция вируса SARS-CoV-2 может происходить в разнообразных клеточных линиях [65].

9 Контроль качества лабораторных исследований

Внешний контроль качества лабораторных исследований

Согласно ППГСВ РК «О дальнейшем усилении мер по предупреждению заболеваний коронавирусной инфекцией среди населения Республики Казахстан», в целях обеспечения качества лабораторных исследований на COVID-19 филиалом НПЦСЭЭМ НЦОЗ реализуется программа Внешняя оценка качества (далее – ВОК), в части подтверждение (ретестирование) 10 положительных (для исключения ложноположительных) и 10 отрицательных (для исключения ложноотрицательных) образцов на вирус SARS-CoV-2 за истекший месяц.

Другим элементом ВОК является проведение профессионального тестирования, когда внешняя организация рассылает группе лабораторий наборы шифрованных проб для анализа. Также, когда сложно провести профессиональное тестирование или применить метод перепроверки /ретестирования, то рекомендуется провести мониторинговые визиты в лаборатории [72].

Внутренний контроль качества лабораторных исследований

В целях обеспечения надлежащего качества диагностической работы лаборатории, например, при внедрении нового метода тестирования или инструмента, использовании новой партии материалов, поступлении на работу новых сотрудников, необходимо проводить процедуру валидации или верификации.

Лаборатории, которые заказывают праймеры и зонды, должны проводить входное тестирование или валидацию для определения функциональности и потенциальной контаминации [67].

При проведении МАНК в ручном режиме необходимо обеспечить внутренний контроль каждой пробы для МАНК.

Для оценки качества деконтаминационных мероприятий и выявления возможной контаминации лаборатории или продуктами амплификации контроль проводят путем отбора смывов с поверхностей.

Смывы с поверхностей берут стерильными ватными тампонами (минимальный размер площади 10x10 см). Перед отбором смывов тампоны смачивают стерильным физиологическим раствором или ТЕ-буфером (10 mM Tris, 1 mM Этилендиаминтетрауксусной кислоты (далее – ЭДТА)), после чего вращательными движениями протирают рабочие поверхности оборудования, мебели, дверных ручек, телефонов. Особое внимание уделяют помещениям для сотрудников (комнаты приема пищи, туалет и другие). После отбора смыва тампон помещают в микропробирку типа «эппендорф» с

300-400 мкл ТЕ-буфера, вращательными движениями смывают отобранный материал в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора, и отгеснив избыток жидкости из тампона о стенки пробирки его удаляют.

Полученные суспензии центрифугируют при 8000 g (12000 оборотов в минуту (далее - об/мин)) в течение 1 минуты. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с аэрозольным барьером и вносят в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения НК используют 0,1-0,2 мл надосадочной фракции.

10 Регистрация случаев и выдача результатов тестирования

Лаборатории независимо от формы собственности, осуществляющие проведение тестирования на COVID-19 предоставляют результаты исследований на вирус SARS-CoV-2 в электронном или бумажном виде в течение 3 дней с момента их поступления в лабораторию биологического материала. А также в течении 3-х часов предоставляют копию протокола о положительном результате и отчет по исследованиям в ТД и УЗ. Лаборатории должны иметь интеграцию лабораторных и медицинских информационных систем с информационной системой НЦЭ и обеспечить передачу результатов проведенных исследований COVID-19 (по каждому исследованию) согласно требованиям НЦЭ для обеспечения единого учета результатов исследования.

Отчетность по выполнению тестирования подлежащего контингента методом ПЦР предоставляется лабораториями независимо от форм собственности в ТД ежедневно не менее 2-х раз (с 10.00 до 12.00 часов, с 18 до 19.00 часов) согласно представленной форме [47].

Заключение

Лабораторная диагностика вируса SARS-CoV-2 играет важнейшую роль в оказании качественной медицинской помощи для сохранения и укрепления здоровья населения Республики Казахстан. Во многом успех борьбы с эпидемией зависит от раннего выявления заболевания и скорейшего начала его лечения. Использование необходимых диагностических тестов в лабораторной диагностике вируса SARS-CoV-2 поможет установить точный диагноз и принять правильное решение в лечении пациентов с использованием необходимых медицинских препаратов, что приведет к более эффективному распределению ресурсов и улучшению показателей в сфере здравоохранения, а также своевременной организации противоэпидемических мероприятий по COVID-19.

Данный документ разработан с учетом современных представлений о характеристике вируса SARS-CoV-2, основных элементов менеджмента лабораторий, основных методов исследований в соответствии с последними рекомендациями ВОЗ и CDC.

В создании МР принимали участие эксперты лабораторной службы из различных ведомств и регионов.

Филиал «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «НЦОЗ» МЗ РК выражает признательность лабораторным специалистам CDC/CAR, Наталье Ким и Дмитрию Березовскому, а также лабораторному специалисту ВОЗ Александру Джагупарову за оказание консультативной помощи в ходе разработки данных МР.

В дальнейшем Филиал «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «НЦОЗ» МЗ РК будет регулярно обновлять, и распространять рекомендации по существующим подходам к проведению тестирования на вирус SARS-CoV-2.

Список использованных источников

1. Gorbalenya A, B.S., et al., The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*, 2020. 5(4): p. 536-544;
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 27 July 2020; Available from: <https://talk.ictvonline.org/>;
3. Naqvi, A.A.T., et al., Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020. 1866(10): p. 165878;
4. Yoshimoto, F.K., The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n- COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J*, 2020. 39(3): p. 198-216;
5. Kim, D., et al., The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 2020. 181(4): p. 914-91 e10;
6. Lu, R., et al., Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020. 395(10224): p. 565-574;
7. Yan, R., et al., Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020. 367(6485): p. 1444-1448;
8. Ni, W., et al., Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care*, 2020. 24(1): p. 422;
9. Wu, Z. and J.M. McGoogan, Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 2020;
10. Mizumoto, K., et al., Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess Cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill*, 2020. 25(10);
11. He, J., et al., Proportion of asymptomatic coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*, 2020;
12. Kronbichler, A., et al., Asymptomatic patients as a source of COVID-19 infections: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*, 2020;
13. Al-Sadeq, D.W. and G.K. Nasrallah, The incidence of the novel coronavirus SARS-CoV-2 among asymptomatic patients: a systematic review. *Int J Infect Dis*, 2020;
14. Kluytmans-van den Bergh, M.F.Q., et al., Prevalence and Clinical Presentation of Health Care Workers With Symptoms of Coronavirus Disease 2019 in 2 Dutch Hospitals During an Early Phase of the Pandemic. *JAMA Netw Open*, 2020. 3(5): p. e209673;
15. Gudbjartsson, D.F., et al., Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic Population. *N Engl J Med*, 2020. 382(24): p. 2302-2315;
16. Arons, M.M., et al., Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and

Transmission in a Skilled Nursing Facility. N Engl J Med, 2020;

17. Bitnun, A., et al., Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection in Toronto children: a second look. Pediatrics, 2009. 123(1): p. 97-101;

18. Richardson, S., et al., Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. JAMA, 2020;

19. Establishment of PCR laboratory in developing countries, 2nd edition <https://apps.who.int/iris/handle/10665/249549>;

20. Приказ МЗ РК от 8 сентября 2017 года № 684 «Об утверждении Санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества";

21. Приказ Министра здравоохранения и социального развития Республики Казахстан от 25 декабря 2015 года № 1019 Об утверждении Правил и сроков проведения обучения, инструктирования и проверок знаний по вопросам безопасности и охраны труда работников, руководителей и лиц, ответственных за обеспечение безопасности и охраны труда (с изменениями от 28.08.2020 г.);

22. Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Казахстан «О дальнейшем усилении мер по предупреждению заболеваний коронавирусной инфекцией среди населения Республики Казахстан»;

23. 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» РФ Г.Г. Онищенко 22.12.2009 г.;

24. Основные стандарты гигиены окружающей среды в медицинских учреждениях. Женева: Всемирная организация здравоохранения; https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/ehs_hc/ru/ по состоянию на 6 мая 2020 г.);

25. Временные рекомендации ВОЗ «Уборка и дезинфекция помещений и поверхностей в контексте COVID-19» 15 мая 2020 г.;

26. Водоснабжение, санитария, гигиена и обращение с отходами в контексте вирусной инфекции COVID-19. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2020 г. (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/> по состоянию на 6 мая 2020 г.);

27. Köhler, A.T., et al., 2018. Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. J Hosp Infect 100, e40–e46. (<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.07.017>, по состоянию на 6 мая 2020 г.);

28. Oliver S, et al, Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. Nat Med, 2020;

29. Lai, C.K.C., et al., Prospective study comparing deep-throat saliva with other respiratory tract specimens in the diagnosis of novel coronavirus disease

(COVID-19). *J Infect Dis*, 2020;

30. Hammitt, L.L., et al., Added value of an oropharyngeal swab in detection of viruses in children hospitalized with lower respiratory tract infection. *J Clin Microbiol*, 2011. 49(6): p. 2318-20;

31. Ek, P., et al., A combination of naso- and oropharyngeal swabs improves the diagnostic yield of respiratory viruses in adult emergency department patients. *Infect Dis (Lond)*, 2019. 51(4): p. 241-248;

32. Sutjipto S, et al., The effect of sample site, illness duration and the presence of pneumonia on the detection of SARS-CoV-2 by real-time reverse-transcription PCR. *Open Forum Infectious Diseases*, 2020;

33. Lieberman, D., et al., Pooled nasopharyngeal and oropharyngeal samples for the identification of respiratory viruses in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010. 29(6): p. 733-5;

34. Liu, R., et al., Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta*, 2020. 505: p. 172-175;

35. Winichakoon, P., et al., Negative Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs Do Not Rule Out COVID-19. *J Clin Microbiol*, 2020. 58(5).

36. Wang, W., et al., Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*, 2020;

37. Huang, Y., et al., SARS-CoV-2 Viral Load in Clinical Samples from Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020. 201(11): p. 1435-1438;

38. Клиническое ведение случаев COVID-19 (временное руководство). Всемирная организация здравоохранения 2020 г., 27 мая 2020 г.; Имеется по адресу: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332196/WHO-2019-nCoV-clinical-2020.5-rus.pdf>;

39. Ng, S.C., et al., Screening FMT donors during the COVID-19 pandemic: a protocol for stool SARS-CoV-2 viral quantification. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020. 5(7): p. 642-643;

40. Tang, J.W., et al., Quantitative temporal-spatial distribution of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) in post-mortem tissues. *J Med Virol*, 2007. 79(9): p. 1245-53;

41. Nicholls, J.M., et al., Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003. 361(9371): p. 1773-8;

42. Pomara, C., et al., COVID-19 Deaths: Are We Sure It Is Pneumonia? Please, Autopsy, Autopsy, Autopsy! *J Clin Med*, 2020. 9(5);

43. Salerno, M., et al., No Autopsies on COVID-19 Deaths: A Missed Opportunity and the Lockdown of Science. *J Clin Med*, 2020. 9(5);

44. Hanley, B., et al., Autopsy in suspected COVID-19 cases. *J Clin Pathol*, 2020. 73(5): p. 239-242;

45. Basso, C., et al., Feasibility of postmortem examination in the era of COVID-19 pandemic: the experience of a Northeast Italy University Hospital. *Virchows Arch*, 2020;

46. Tian, S., et al., Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease

(COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol*, 2020. 33(6): p. 1007-1014;

47. Диагностическое тестирование для определения вируса SARS-CoV-2. Временные рекомендации 11 сентября 2020 г. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334254/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-rus.pdf>;

48. Rogers AA, et al., Evaluation of Transport Media and Specimen Transport Conditions for the Detection of SARS-CoV-2 Using Real Time Reverse Transcription PCR. *J Clin Microbiol*. 2020 Apr 27;

49. Rodino, K.G., et al., Evaluation of Saline, Phosphate-Buffered Saline, and Minimum Essential Medium as Potential Alternatives to Viral Transport Media for SARS-CoV-2 Testing. *J Clin Microbiol*, 2020. 58(6);

50. Poon, P.c.L., Evaluation of swabs, transport media and specimen transport conditions for the detectoin of COVID-19 virus by RT-PCR. University of Hong Kong, 2020;

51. Rogers, A.A., et al., Evaluation of Transport Media and Specimen Transport Conditions for the Detection of SARS-CoV-2 Using Real Time Reverse Transcription PCR. *J Clin Microbiol*, 2020;

52. Руководство по биобезопасности ВОЗ, 4-ое издание, 21 декабря, 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/978900113111> ;

53. Методические рекомендации МР ДЗМ №28 от 04.07.2017 г. «Организация работы пунктов приема биологического материала»;

54. Приказ Министра национальной экономики Республики Казахстан от 4 февраля 2015 года № 76 «Об утверждении Правил хранения, транспортировки и использования профилактических (иммунобиологических, диагностических, дезинфицирующих) препаратов»;

55. Mallapaty, S., The mathematical strategy that could transform coronavirus testing. *Nature*, 2020;

56. Aragon-Caqueo, D., J. Fernandez-Salinas, and D. Laroze, Optimization of group size in pool testing strategy for SARS-CoV-2: A simple mathematical model. *J Med Virol*, 2020;

57. Pilcher, C.D., et al., Group Testing for Sars-Cov-2 to Enable Rapid Scale-Up of Testing and Real-Time Surveillance of Incidence. *J Infect Dis*, 2020;

58. Ben-Ami, R., et al., Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection. *Clin Microbiol Infect*, 2020;

59. Weiss A, et al., Spatial and temporal dynamics of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine*. 2020;58.;

60. Arons MM, et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(22):2081-90;

61. Bullard J, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020;

62. Роль иммунохимических экспресс-тестов для определения антигенов в диагностике инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 Временные рекомендации 11 сентября 2020 г.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334253/WHO-2019-nCoV-Antigen_Detection-2020.1-rus.pdf;
63. Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *Lancet*. 2020 Nov 14;396(10262):1595-606;
64. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings, CDC, www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html;
65. Hin Chu, J.F.-W.C., et al, Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *The Lancet Microbe*, 2020. Volume 1(ISSUE 1): p. e14-e23;
66. Временные рекомендации ВОЗ «Геномное секвенирование SARS-CoV-2 для целей общественного здравоохранения» 08 января 2021 г.;
67. Mogling, R., et al., Delayed Laboratory Response to COVID-19 Caused by Molecular Diagnostic Contamination. *Emerg Infect Dis*, 2020. 26(8);
68. Protocol to investigate non-seasonal influenza and other emerging acute respiratory diseases. Всемирная организация здравоохранения, 2018 г.;
69. Grubaugh ND, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol*. 2019;20:8. doi: 10.1186/s13059-018-1618-7.
70. GLASS whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/334354>, по состоянию на 20 ноября 2020 г.).
71. CDC. Interim Guidance for Use of Pooling Procedures in SARS-CoV-2 Diagnostic, Screening, and Surveillance Testing <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/pooling-procedures.html>
72. Система управления качеством в лабораториях. Учебное пособие. WHO, CDC, CLSI, 2013 г.
73. Interpretation of laboratory results for COVID-19 diagnosis, 6 May 2020, IRIS PAHO <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52138>

Направление на лабораторное исследование на COVID-19 методом ПРЦ реал-тайм	
Ф.И.О	Полностью
ИИН	Обязательно
Дата рождения	Полностью дд/мм/гг
Пол	<input type="checkbox"/> Мужской <input type="checkbox"/> Женский
Возраст	
Адрес проживания фактического	полностью
Контактный телефон	
Место учебы/работы	обязательно
Тип биологического материала	<input type="checkbox"/> мазок <input type="checkbox"/> мокрота <input type="checkbox"/> эндотрахеальный аспират <input type="checkbox"/> Группный материал
Кем отобран материал	_____ Наименование организации направившей пробу на исследование
Статус отбора пробы	<input type="checkbox"/> первичный <input type="checkbox"/> повторно
Дата и время забора биологического материала	
Статус исследуемого (отметить в соответствующем разделе)	
<input type="checkbox"/> 1) По эпидемиологическим показаниям	
<input type="checkbox"/> Больной COVID - 19 <input type="checkbox"/> Самообращение с признаками COVID-19 <input type="checkbox"/> Пневмония <input type="checkbox"/> ТОРИ <input type="checkbox"/> ОРВИ <input type="checkbox"/> По эпидемиологическим показаниям	<input type="checkbox"/> Близкий контакт, выявленный в рамках: <input type="checkbox"/> Самообращения (эпид показания) <input type="checkbox"/> Профилактических скринингов <input type="checkbox"/> Проф.скрининг вновь прибывших из-за рубежа <input type="checkbox"/> Эпидемиологического надзора
<input type="checkbox"/> 2) С профилактической целью:	
<input type="checkbox"/> Вновь прибывший (из зарубежа) <input type="checkbox"/> Медицинские работники (плановое исследование)	<input type="checkbox"/> Социальные работники <input type="checkbox"/> Призывники <input type="checkbox"/> МО <input type="checkbox"/> МВД <input type="checkbox"/> Нац Гвардия <input type="checkbox"/> Другие _____
<input type="checkbox"/> 3) С целью эпидемиологического надзора	
<input type="checkbox"/> пациенты при экстренной госпитализации в стационар <input type="checkbox"/> пациенты при плановой госпитализации в стационар <input type="checkbox"/> беременные <input type="checkbox"/> другие _____	<input type="checkbox"/> пациенты, находящиеся на гемодиализе <input type="checkbox"/> лица, вновь поступающие МСУ и др. закрытые учреждения <input type="checkbox"/> в рамках ДЭН, состоит на Д-учете (да/нет, если да, то по какому заболеванию) _____
Наличие клинических симптомов COVID - 19	<input type="checkbox"/> есть <input type="checkbox"/> нет
Материал направлен	_____ Наименование лаборатории куда направляется проба
Ф.И.О проводившего забор Контакты	

Отбор и хранение образцов

Тип образца	Емкости для взятия образцов	Рекомендуемая температура для хранения и/или транспортировки в лабораторию до момента тестирования (с даты отбора проб) ^а
Мазки из носоглотки и ротоглотки ^б	Тупфер с флок-тампоном из дакрона или полиэстера и вирусологической транспортной средой ^в	2-8 °С, если ≤12 дней* -70 °С (сухой лед), если > 12 дней
Бронхоальвеолярный смыв (полученный путем бронхоальвеолярного лаважа)	Стерильный контейнер с вирусологической транспортной средой	2-8 °С, если ≤2 дней -70 °С (сухой лед), если > 2 дней
(Эндо)трахеальный аспират, аспират/смыв из носоглотки или полости носа	Стерильный контейнер с вирусологической транспортной средой	2-8 °С, если ≤2 дней -70 °С (сухой лед), если > 2 дней
Мокрота	Стерильный контейнер	2-8 °С, если ≤2 дней -70 °С (сухой лед), если > 2 дней
Биопсийный или аутопсийный материал, включая ткань легких	Стерильный контейнер с физиологическим раствором или вирусологической транспортной средой	2-8 °С, если ≤ 24 часов -70 °С (сухой лед), если > 24 часов
Сыворотка	Пробирки с сепаратором для исследования сыворотки (взрослые: взять 3-5 мл цельной крови)	2-8 °С, если ≤5 дней -70 °С (сухой лед), если > 5 дней
Цельная кровь	Пробирка	2-8 °С, если ≤5 дней -70 °С (сухой лед), если > 5 дней
Фекалии	Контейнер для фекалий	2-8 °С, если ≤5 дней -70 °С (сухой лед), если > 5 дней

а Не допускать размораживания и повторного замораживания образцов. В случае невозможности обеспечить хранение при температуре -70 °С, рассмотреть вопрос о хранении при температуре -20 °С.

б При использовании стерильного физиологического раствора в качестве вирусной транспортной среды, биологический материал транспортируется в лабораторию в самые кратчайшие сроки.

в При необходимости исследования на другие вирусы, такие как вирус гриппа, необходимо отказаться от хранения образцов при 4-8 градусах дольше 5 дней и производить его при температуре -70 °С либо с применением сухого льда [68].

Путешествовал ли пациент в течение 14 дней до появления симптомов?

Не Да Неизвестно

Если да, укажите места путешествий:

Страна _____ Город/Область _____

1.

2.

Бывал ли пациент в медицинской организации в течение 14 дней до начала симптомов? Нет Да Неизвестно

Был ли пациент в тесном контакте¹ с лицом с острой респираторной инфекцией в течение 14 дней до начала симптомов? Нет Да Неизвестно

Если да, обстоятельства контакта (отметьте все применимое):

в медицинской организации в семье на рабочем месте неизвестно

иное, укажите: _____

Был ли у пациента **контакт с вероятным или подтвержденным случаем** в течение 14 дней до начала симптомов?: Нет Да Неизвестно

Если да, обстоятельства контакта (отметьте все применимое):

в мед. Организации в семье на рабочем месте неизвестно

иное, укажите: _____

Если да, место/город/область контакта: _____

Раздел 4: лабораторная информация

Наименование подтверждающей лаборатории, проводящее секвенирование:
_____ отбор анализов

Дата отбора образцов: [_Д_][_Д_]/[_М_][_М_]/[_Г_][_Г_][_Г_][_Г_]

Результат секвенирования _____