



SARS-CoV-2/SARS-CoV



**Ответы на вопросы
из практики лабораторной
диагностики COVID-19**



Оглавление

1.	Как правильно брать мазки? Смешивать мазки из носа и ротоглотки?	2
2.	Сколько и как можно хранить мазки, взятые в физраствор и специальную транспортную среду?	3
3.	Можно ли исследовать мочу, кал? Как работать с этими образцами?	4
4.	Какая пробоподготовка совместима с наборами реагентов компании «ДНК-Технология» для амплификации?	5
5.	Как заподозрить контаминацию и предупредить возможность ее появления?	6
6.	Ложноотрицательные и ложноположительные результаты: как отвечать на вопросы врачей?	9
7.	Что делать при неподтверждении положительных результатов, полученных на наборах компании «ДНК-Технология», в референс-лабораториях?	10
8.	Нужно ли, кроме SARS-CoV-2, проводить диагностику других респираторных вирусов? Кому? Когда?	16
9.	Возможно ли хранение выделенной РНК?	17
10.	Какое количество образцов может быть в одной постановке?	17
11.	Необходимо ли всегда выполнять постановки отрицательных контролей на каждый 10-й образец?	18
12.	Нужно ли использовать специальные ключики для открывания пробирок типа эппендорф?	18
13.	Когда и зачем необходимо разделять потоки образцов от разных групп пациентов?	19
14.	Можно ли при постановке исследования на SARS-CoV-2 использовать ферменты из других наборов, например «ОПЗ ВирусКомплекс»?	19
Приложение 1.	Расчет количества реагентов для приготовления смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT при работе с набором реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV	20
Приложение 2.	Основные правила проведения работ по деконтаминации ПЦР-лаборатории	23



1 Как правильно брать мазки? Смешивать мазки из носа и ротоглотки?

Во временных методических рекомендациях МЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» указано, что «основным видом биоматериала для лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2 является материал, полученный при заборе мазка из носоглотки (из двух носовых ходов) и ротоглотки. Мазки со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки собираются в одну пробирку для большей концентрации вируса».

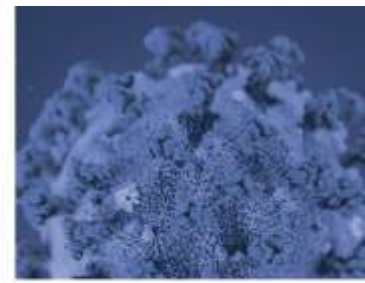
Мазок из носоглотки или ротоглотки (зева) берется стерильным тампоном (зондом), который после взятия материала помещается в стерильную пластиковую пробирку с транспортной средой (с учетом рекомендаций производителя применяемых тест-систем / наборов реагентов). Мазки из носоглотки и ротоглотки берутся отдельными зондами.



МАЗКИ ИЗ ПОЛОСТИ НОСА

Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

На практике чаще производят взятие биоматериала только из ротоглотки, главные условия адекватности образцов — соблюдение пациентом правил подготовки к исследованию и взятие достаточного количества клеток с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

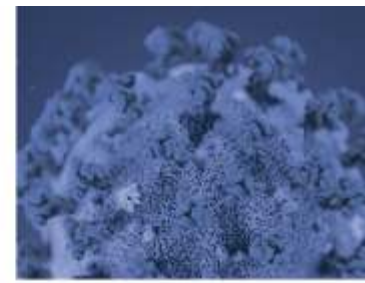


2 Сколько и как можно хранить мазки, взятые в физраствор и специальную транспортную среду?

Для доставки образцов в лабораторию используют транспортную среду для хранения и транспортировки респираторных мазков (производитель транспортной среды указывает в инструкции по применению возможный срок и режим хранения) или физиологический раствор (при условии транспортировки до лаборатории не более 24 часов после взятия образца).

В документах по применению транспортной среды для биопроб «СТОП-Ф» (ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2020/9640 от 14 февраля 2020 года) изложены следующие рекомендации:

- транспортировать и хранить пробирки с образцами биологического материала, помещенными в транспортную среду «СТОП-Ф», до начала исследования следует не более 7 дней при температуре около 4 °С;
- допускается транспортирование и хранение пробирок с образцами биологического материала, помещенного в транспортную среду «СТОП-Ф», при температуре от 18 до 25 °С не более 48 часов.



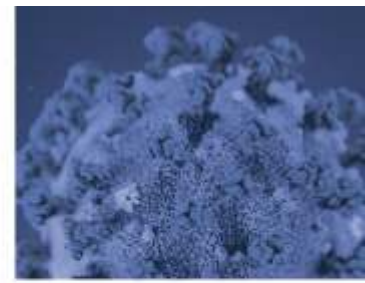
3 Можно ли исследовать мочу, кал? Как работать с этими образцами?

Исследование мочи на наличие SARS-CoV-2 нецелесообразно ввиду низкой концентрации вируса в этом виде биоматериала (*Chan VW et al. A systematic review on COVID-19: urological manifestations, viral RNA detection and special considerations in urological conditions. World J Urol. 2020; 10.1007/s00345-020-03246-4*).

Кал может быть использован в качестве дополнительного вида биоматериала у взрослых. Биологические образцы заболевших детей (назофарингеальные смывы, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, образцы крови и кала) содержат РНК вируса (*Методические рекомендации МЗ РФ «Особенности клинических проявлений и лечения заболевания, вызванного новой коронавирусной инфекцией [COVID-19] у детей»*).

У новорожденных при ПЦР-диагностике генетический материал нового коронавируса выявляется в следующих биологических средах: в материале из верхних, нижних дыхательных путей, в крови и в стуле (*Методические рекомендации МЗ РФ «Организация оказания медицинской помощи беременным, роженицам, родильницам и новорожденным при новой коронавирусной инфекции COVID-19»*). Исследование фекалий может проводиться при наличии симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта, а также при наличии клинических симптомов COVID-19 и отсутствии положительной реакции ПЦР в образцах биоматериала из носо- и ротоглотки.

Для выделения РНК вируса из фекалий можно использовать комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот («ПРОБА-НК»/«ПРОБА-НК-ПЛЮС»), комплектация «ПРОБА-НК» (производитель — ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).



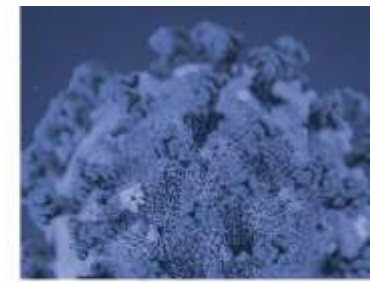
4

Какая пробоподготовка совместима с наборами реагентов компании «ДНК-Технология» для амплификации?

Мы рекомендуем использовать наборы реагентов, валидированные для выделения РНК с целью дальнейшего исследования набором реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV»:

- комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот («ПРОБА-НК»/«ПРОБА-НК-ПЛЮС»), комплектация «ПРОБА-НК» (производитель — ООО «НПО ДНК-Технология», Россия),
- набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот («ПРОБА-МЧ»), комплектация «ПРОБА-МЧ-НК» (фасовка А) (производитель — ООО «ДНК-Технология ТС», Россия),
- комплект реагентов для выделения РНК / ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (производитель — ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

В настоящее время зарегистрирован новый, существенно укороченный вариант пробоподготовки (ПРОБА-НК-S), предназначенный специально для последующей работы с набором реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV».



5 Как заподозрить контаминацию и предупредить возможность ее появления?

На практике возможны несколько вариантов контаминации, разберем каждый из них.

Контаминация между образцами на преаналитическом этапе (1) и на стадии аликвотирования первичного биоматериала (2) являются критичными для лаборатории, выполняющей исследование, поскольку не устраняются повторным выполнением анализа первичного материала.

Контаминация на стадии пробоподготовки (3) вероятна даже при работе опытных врачей-лаборантов — многоступенчатость методики, наличие в одной постановке низко- и высококопийных образцов могут привести к переносу части материала в соседние пробирки. Поэтому необходимо разделять потоки и четко соблюдать методические рекомендации по снижению риска кросс-контаминации — использовать накопники с фильтрами, защелкивающиеся пробирки, часто менять перчатки.

Контаминация на стадии внесения в реакционную смесь выделенных из образцов нуклеиновых кислот (4) и контаминация ампиконами (5) происходят редко и связаны в основном с неаккуратной работой лаборанта. Если это произошло, то в первую очередь рекомендуется установить и устранить источник контаминации, провести обработку лаборатории в соответствии с МУ 1.3.2569-09 (Приложение 2). Проведение работ, связанных с амплификацией нуклеиновых кислот, до завершения деконтаминационных мероприятий в лаборатории не допускается.

Практические аспекты лабораторной диагностики коронавируса SARS-CoV-2



- **ВНИМАНИЕ!** Диапазон вирусной нагрузки SARS-CoV-2 может варьировать в широких пределах — от очень низких значений (10^4 и менее копий/мл) в биоматериале от лиц с бессимптомным носительством и лиц на стадии выздоровления до крайне высоких значений (более 10^9 копий/мл) в биоматериале от пациентов с клинической картиной острой вирусной пневмонии.

При выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для предупреждения кросс-контаминации рекомендуется выполнение следующих правил:



- 1.** Проводите **визуальную оценку** биоматериала и **выбраковку** всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.

- 2.** Выделяйте в **отдельный поток образцы от пациентов с симптомами острой инфекции** и анализируйте их отдельно от остальных образцов. Работу с предполагаемыми высококопийными образцами желательнее выполнять в отдельном боксе или после работы с предполагаемыми низкокопийными образцами.



- 3.** Обязательно выполняйте постановку **отрицательных контрольных образцов**, начиная с этапа выделения РНК, в каждом протоколе.

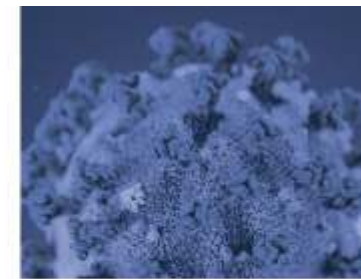


- 4.** Используйте **наконечники с аэрозольными фильтрами** на всех этапах исследования.



- 5.** Четко соблюдайте методику выполнения исследования, открывайте пробирки типа *Eppendorf* при помощи пинцета (не допускать касаний руки в перчатке внутренней части крышки пробирки); при внесении реагентов не касаться наконечником пробирки (если это произошло, сразу заменить наконечник).

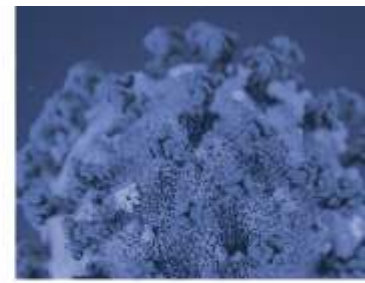
Соблюдение вышеописанных рекомендаций позволит получать корректные результаты при использовании высокочувствительного метода ОТ-ПЦР как при работе с высококопийными образцами при проведении дифференциальной диагностики, так и при обследовании контактировавших лиц, а также при проведении скрининга с целью предотвращения дальнейшего распространения инфекции.



Контаминация продуктами амплификации (ампликонами) при использовании наборов реагентов компании «ДНК-Технология» сведена к минимуму — наборы раскапаны под парафин, что является дополнительным фактором защиты. По завершении программы амплификации ампликоны находятся под парафиновой прослойкой, что предотвращает их попадание в окружающую среду даже при случайном открытии пробирки.

Однако при ошибках в работе (например, уронили пробирку после ПЦР, наступили на нее, подняли руками раздавленную пробирку, открыли пробирки для обеззараживания дезсредствами и т. п.) риск контаминации ПЦР-лаборатории ампликонами остается.

С учетом важности получения корректного результата тестирования на SARS-CoV-2 рекомендуем дополнительно к автоматическому учету осуществлять просмотр и анализ протоколов вручную. При анализе завершенного протокола ПЦР особое внимание следует обращать на низкокопийные образцы. По нашему опыту количество проб с истинно низкой вирусной нагрузкой колеблется от 5% до 20% в зависимости от обследуемого контингента. Истинно низкая вирусная нагрузка в образце может наблюдаться у людей, контактировавших с заболевшими, у пациентов в первые дни после инфицирования и в период реконвалесценции. Особое внимание наличию признаков контаминации нужно уделять при одновременном присутствии в протоколе постановки большого количества низко- (Ср 37–40) и высококопийных образцов.

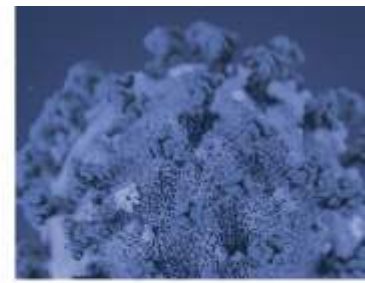


6 Ложноотрицательные и ложноположительные результаты: как отвечать на вопросы врачей?

В понятие «ложноотрицательный результат» разные специалисты вкладывают разное значение. «Ложноотрицательный результат» с точки зрения лаборатории — отрицательный результат исследования образца биоматериала, в котором есть генетический материал вируса. В этом случае некорректный результат ПЦР-исследования может быть следствием несоблюдения методики выполнения анализа, нарушений правил подготовки пациента к исследованию, требований к взятию, хранению и транспортировке биоматериала. Эта проблема крайне актуальна, поскольку объем исследований и нагрузка на персонал лаборатории в условиях пандемии многократно возросли.

Также о «ложноотрицательных результатах» говорят при несовпадении результатов, полученных в разных лабораториях. В этих случаях необходимо обращать внимание на аналитическую чувствительность (предел обнаружения) тест-систем, на которых были выполнены исследования. Данная характеристика существенно влияет на результат тестирования, особенно низкокопийных образцов (менее 10^3 копий/мл). Чувствительность набора реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV» производства компании «ДНК-Технология» составляет 500 копий/мл образца, в то время как значительная часть разрешенных для лабораторной диагностики COVID-19 наборов реагентов имеют аналитическую чувствительность 10^3 копий/мл (более подробно — ответ на вопрос 8).

С точки зрения клинициста, наличие очевидных симптомов острого респираторного заболевания или пневмонии в период эпидемии COVID-19 при отсутствии положительной реакции на SARS-CoV-2 также может быть расценено как ложноотрицательный результат. Однако не стоит забывать, что симптомы респираторной инфекции неспецифичны и могут быть вызваны не SARS-CoV-2, а другими микроорганизмами — вирусами или бактериями (более подробно — ответ на вопрос 9).



7 Что делать при неподтверждении положительных результатов, полученных на наборах компании «ДНК-Технология» в референс-лабораториях?

В настоящее время данная проблема наблюдается в некоторых регионах России и, единого решения пока не существует. Для оперативного реагирования и сбора аналитики просим сообщать о частых случаях несовпадения результатов сотрудникам компании «ДНК-Технология».

Теперь коротко остановимся на главных причинах. Предел обнаружения набора реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV» производства компании «ДНК-Технология» составляет 500 копий/мл образца при совместном применении с комплектом для выделения нуклеиновых кислот «ПРОБА-НК» (таблица 1). Другими словами, образцы, содержащие 500 и более вирусных частиц в 1,0 мл, будут определены как «ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ» с вероятностью не менее 95%. За счет высокой чувствительности набора вероятно выявление РНК SARS-CoV-2 и в образцах, содержащих менее чем 500 вирусных частиц в 1,0 мл (для таких образцов значения C_p по каналам Fam, Rox, Cy5 обычно составляют более 36), полученный положительный результат исследования достоверен. Следует учитывать, что для низкокопийных образцов возможна ситуация, когда при проведении повторных или параллельных исследований одного и того же образца не во всех повторах регистрируется положительный результат, что обусловлено объективными причинами — вероятностным распределением единичных копий РНК/ДНК по реакционным пробиркам.

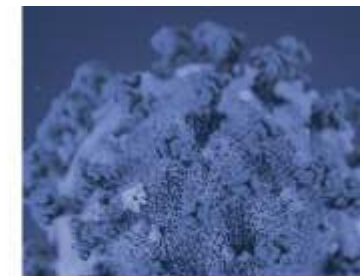


Таблица 1. Сравнение базовых характеристик наборов реагентов для диагностики COVID-19*.

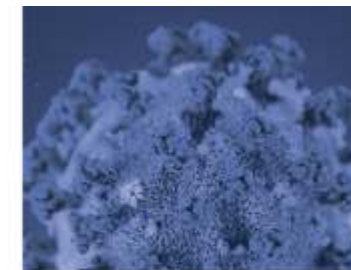
Производитель	Владелец РУ	РУ	Название	Метод	Количество выявляемых мишеней	Характеристика мишеней	Аналитическая чувствительность
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	2020/9677	«Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG»	ОТ и ПЦР-РВ	1	Специфический участок РНК SARS-CoV-2	1x10 ⁵ копий/мл
		2020/9700	«Вектор-OneStep ПЦР-CoV-RG»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок РНК SARS-CoV-2	1x10 ⁵ копий/мл
ФГБУ «ЦСП», Россия	ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	2020/9765	«Ампли Тест SARS-CoV-2»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок гена RdRp	1x10 ³ -1x10 ⁴ ГЭ/мл (в зависимости от биоматериала)
		2020/10118	«АмплиТест SARS-CoV-2 авто»		1	Специфический участок гена RdRp	
ООО «СМАРТ-ЛАЙФКЕА», Россия	ООО «СМАРТ-ЛАЙФКЕА»	2020/9845	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени в вариантах исполнения по ТУ 21.20.23-001-39070608-2020	Изотермическая амплификация	1	Специфический участок РНК SARS-CoV-2	1x10 ² копий на образец
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия	ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора	2014/1987	«АмплиСенс Cov-Bat-FL»	ОТ-ПЦР-РВ	2	Специфический участок гена rpE коронавируса MERS-Cov Консервативный участок гена Pol SARS-Cov-like	1x10 ³ -1x10 ⁴ ГЭ/мл (в зависимости от биоматериала)
АО «Вектор-Бест», Россия	АО «Вектор-Бест»	2020/9896	«РеалБест РНК SARS-CoV-2»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок РНК SARS-CoV-2	1x10 ³ копий/мл



Производитель	Владелец РУ	РУ	Название	Метод	Количество выявляемых мишеней	Характеристика мишеней	Аналитическая чувствительность
ООО НПФ «Литех», Россия	ООО НПФ «Литех»	2020/9904	«ПОЛИВИР SARS-CoV-2» Base «ПОЛИВИР SARS-CoV-2» Express	ОТ-ПЦР-РВ	2	Специфический участок РНК SARS-CoV и SARS-like Специфический участок РНК SARS-CoV-2	1x10 ³ -1x10 ⁴ ГЭ/мл (в зависимости от пробоподготовки)
		2020/10720	«IsoAmp SARS-CoV-2»	Изотермическая амплификация	?	?	?
ООО «ДНК-Технология ТС», Россия	ООО «ДНК-Технология ТС»	2020/9948	«SARS-CoV-2/ SARS-CoV»	ОТ-ПЦР-РВ	3	Консервативный участок гена E SARS-CoV и подобных SARS-CoV Специфический участок гена E SARS-CoV-2 Специфический участок гена N SARS-CoV-2	5x10 ² копий/мл
АО «Генериум», Россия	АО «Генериум»	2020/9957	«Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин»	Изотермическая амплификация	1	Специфический участок РНК SARS-CoV-2	1x10 ³ копий/мл
ФГБУ «48 ЦНИИ», Россия	ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России	2020/9969	«ПЦР-РВ-2019-nCov»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок генаorf1ab SARS-CoV-2	10 ³ ГЭ/мл
ООО «Медипал Тех», Россия	ООО «МедипалТех»	2020/10032	«SARS-CoV-2-ПЦР»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок РНК SARS-CoV-2	10 ² копий РНК/мазок
ООО «Система-БиоТех», Россия	ООО «Система-БиоТех»	2020/10064	«SBT-DX-SARS-CoV-2»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок гена 3CL SARS-CoV-2	1x10 ³ копий/мл
		2020/11532	«SBT-DX-SARS-CoV-2 FAST COLOR»	Изотермическая амплификация	1	Детекция наличия вируса по изменению цвета реакционной смеси в пробирке	?

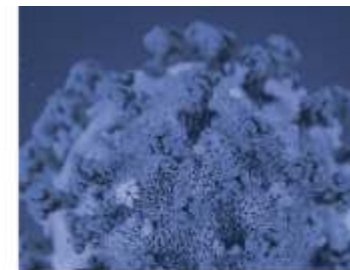


Производитель	Владелец РУ	РУ	Название	Метод	Количество выявляемых мишеней	Характеристика мишеней	Аналитическая чувствительность
ООО «Эвотэк-Мирай геномикс», Россия	ООО «Эвотэк-Мирай геномикс»	2020/10088	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени в вариантах исполнения по ТУ 21.10.60-004-06931260-2020	Изотермическая амплификация	1	Специфический участок РНК SARS-CoV-2	1x10 ² копий на образец
OSANG Healthcare Co., Корея	ООО «АВИ-ВИР»	2020/10152	GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp Kit (IFMR-45)	ОТ-ПЦР-РВ	3	Специфический участок гена RdRp SARS-CoV-2 Специфический участок гена E SARS-CoV-2 Специфический участок гена N SARS-CoV-2	10 копий/тест
ООО «Генотек», Россия	ООО «Генотек»	2020/10216	«COVID-19 OneStep»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок РНК SARS-CoV-2	1x10 ² ГЭ/мл
ООО «ТестГен», Россия	ООО «ТестГен»	2020/10364	«CoV-2-Тест»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок гена N SARS-CoV-2	5x10 ² копий/мл
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия	ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера	2020/10498	«COVID-2019 Amp»	ОТ-ПЦР-РВ	?	?	1x10 ³ ГЭ/мл
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи», Россия	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России	2020/10550	«SARS-CoV-2 FRT»	ОТ-ПЦР-РВ	?	?	1x10 ² копий/мл
ФГБУ «ГНИИИ ВМ», Россия	ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ	2020/10632	«SARS-CoV-2-тест»	ОТ-ПЦР-РВ	?	?	?



Производитель	Владелец РУ	РУ	Название	Метод	Количество выявляемых мишеней	Характеристика мишеней	Аналитическая чувствительность
ООО «НекстБио», Россия	ООО «Некст-Био»	2020/10837	«АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок гена ORF1a + специфический участок гена S SARS-CoV-2	1x10 ³ копий/мл
Roche Molecular Systems, США	ООО «Рош Диагностика Рус»	2020/11015	«cobas® SARS-CoV-2»	ОТ-ПЦР-РВ	2	Консервативный участок гена E SARS-CoV и подобных SARS-CoV Специфический участок гена ORF1a SARS-CoV-2	ген E SARS-CoV – 21-73 копий/мл ген ORF1a SARS-CoV-2 – 17-58 копий/мл
ООО «НПФ Синтол», Россия	ООО «НПФ Синтол»	2020/11100	«ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2»	ОТ-ПЦР-РВ	1	Специфический участок гена ORF1ab SARS-CoV-2	1x10 ³ копий/мл
ООО «Компания Алкор Био», Россия	ООО «Компания Алкор Био»	2020/11290	«Интифика SARS-CoV-2»	ОТ-ПЦР-РВ	3	Специфический участок гена ORF1ab SARS-CoV-2 Специфический участок гена ORF8 SARS-CoV-2 Специфический участок гена N SARS-CoV-2	1x10 ³ копий/мл

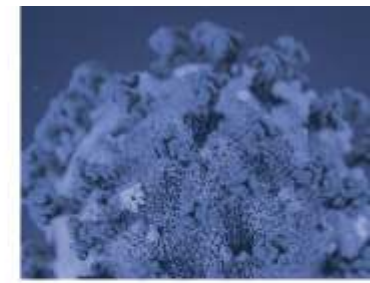
* — по данным на 04.08.2020, в РФ зарегистрированы 26 наименований наборов реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР.



Значительная часть наборов реагентов для ПЦР-диагностики COVID-19, разрешенных для *in vitro* диагностики, имеет аналитическую чувствительность 1000 копий/мл, что может быть одной из причин, по которой положительные результаты, полученные с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV» в случаях низкокопийных образцов, не подтверждаются референсными лабораториями в ходе верификационного анализа.

Другой причиной, которая может привести к расхождению результатов, является возможное снижение концентрации вируса до значений ниже надежно определяемых, что может быть критичным для низкокопийных образцов при транспортировании биоматериала в референсный центр и хранении до проведения исследования.

Для того чтобы избежать случаев расхождений с референсным центром, необходимо подтвердить первичный положительный результат путем повторения анализа и убедиться в отсутствии контаминации. Повторение исследования рекомендуем начинать с этапа выделения РНК, для чего обязательно аликвотировать образцы при получении биоматериала и сохранять аликвоты положительных образцов биоматериала, отправляемых в референсные центры.

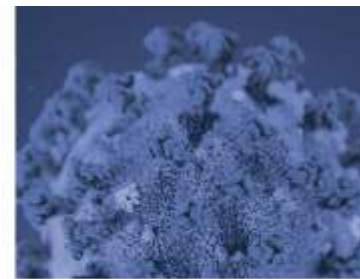


8 Нужно ли, кроме SARS-CoV-2, проводить диагностику других респираторных вирусов? Кому? Когда?

Согласно временным методическим рекомендациям МЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» для проведения дифференциальной диагностики у пациентов с симптомами респираторных заболеваний проводят исследования с применением методов амплификации нуклеиновых кислот на возбудители респираторных инфекций: вирусы гриппа типа А и В, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, человеческие метапневмовирусы, MERS-CoV. Обязательно проведение микробиологической диагностики (культуральное исследование) и/или ПЦР-диагностики на *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae type B*, *Legionella pneumophila*, а также иные возбудители бактериальных инфекций нижних дыхательных путей. Для экспресс-диагностики могут использоваться экспресс-тесты по выявлению пневмококковой и легионеллезной антигенурии.

Для выполнения исследований на вирусы могут быть использованы зарегистрированные наборы реагентов компании «ДНК-Технология» — «Influenza A&B virus», № ФСР 2011/12014; «Influenza A virus», № ФСР 2011/12014; «Influenza B virus», № ФСР 2011/12014, «ОРЗ ВирусКомплекс», № ФСР 2011/12016.

На практике из-за загруженности лабораторий тестирование проводят только на SARS-CoV-2 без учета возможного инфицирования пациентов другими возбудителями респираторных инфекций. Иногда это приводит к ошибочным выводам о низкой чувствительности и специфичности ПЦР-диагностики.



9 Возможно ли хранение выделенной РНК?

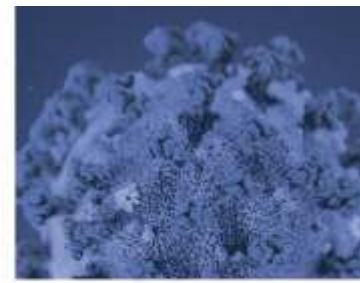
Условия хранения препарата РНК после его получения диктуются условиями ее получения и подробно изложены в инструкциях наборов на пробоподготовку. В большинстве случаев до постановки ОТ-ПЦР для препарата РНК возможно кратковременное (30 мин. — 2 ч.) хранение при температуре +2°C — +8°C. Для более длительного хранения РНК рекомендовано замораживать.

10 Какое количество образцов может быть в одной постановке?



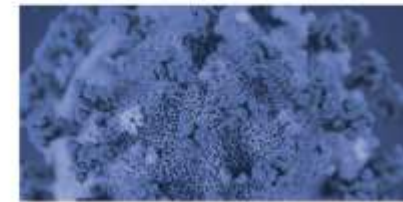
Минимальное количество образцов в одной пробоподготовке — 2 (исследуемый образец и отрицательный контрольный образец). При этом в постановке амплификации будет 3 образца — исследуемый, отрицательный контрольный образец, прошедший этап пробоподготовки, и положительный контрольный образец (вносится только в ОТ-ПЦР).

Если количество проб в лаборатории большое, то удобно проводить пробоподготовку партиями по количеству лунок в высокоскоростной центрифуге, например 24. При этом максимум будет 23 исследуемых образца и 1 образец отрицательного контрольного образца. При подозрении на кросс-контаминацию в лаборатории рекомендуется увеличивать количество отрицательных контрольных образцов, начиная с этапа аликвотирования первичного биоматериала.



11 Необходимо ли всегда выполнять постановки отрицательных контролей на каждый 10-й образец?

Необходимость и цель постановки «отрицательных контролей на каждый 10-й образец» — контроль кросс-контаминации на этапах аликвотирования, пробоподготовки и постановки ОТ-ПЦР. С отрицательными контрольными образцами необходимо совершать те же манипуляции, что и с настоящими биологическими образцами, проводить их обработку вместе с биопробами. Например, 9 образцов биоматериала, 10-й образец — К-, 9 образцов биоматериала, 10-й образец — К-. Данный подход поможет лаборатории вовремя обнаружить контаминацию образцов и не выдать ложноположительный результат.



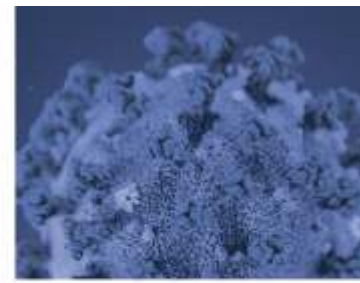
12 Нужно ли использовать специальные ключики для открывания пробирок типа эппендорф?



Для открывания крышек пробирок вместо пинцетов можно использовать специальные устройства, например ключ для открывания микроцентрифужных пробирок (SSI, США, стоимость — 0,6 \$), которые представлены в ассортименте компаний, занимающихся оснащением лабораторий.

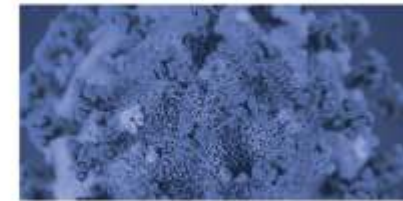
Хотя есть альтернативное мнение, что пользоваться такими ключами неудобно.

13 Когда и зачем необходимо разделять потоки образцов от разных групп пациентов?



Разделять потоки необходимо в случаях, если лаборатория одновременно работает, предположительно, с высококопийными и отрицательными образцами. Подобная организация работы лаборатории позволяет снизить риск перекрестной контаминации образцами и увеличить корректность результата тестирования.

14 Можно ли при постановке исследования на SARS-CoV-2 использовать ферменты из других наборов, например «ОРЗ ВирусКомплекс»?



Нет. В наборе реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV» реализована одностадийная технология — обратная транскрипция РНК и последующая ПЦР протекают в одной пробирке с использованием фермента Taq/RT и других реагентов.

В выпускаемой сейчас версии набора реагентов «ОРЗ ВирусКомплекс» стадии обратной транскрипции и ПЦР происходят в отдельных пробирках, для каждого этапа используется свой фермент — обратная транскриптаза и Taq-полимераза соответственно.



Приложение 1

Расчет количества реагентов для приготовления смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT при работе с набором реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV

Расчет количества буфера и фермента для приготовления смеси производится по суммарному количеству:

- исследуемых образцов (РНК из биоматериала) в постановке ОТ-ПЦР;
- отрицательных контрольных образцов (их может быть более одного в протоколе ОТ-ПЦР);
- и одной пробирки для положительного контрольного образца.

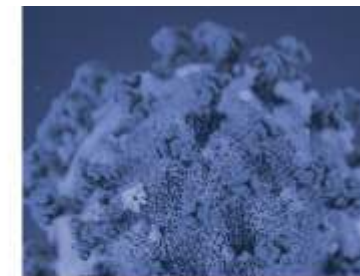
Во избежание нехватки объема смеси буфера и фермента при внесении ее в амплификационные пробирки смесь готовится с запасом на одну пробирку по формуле:

15 x (N + 1) мкл ОТ-ПЦР-буфера;

0,5 x (N + 1) мкл фермента Taq/RT,

где N — количество амплификационных пробирок для ОТ-ПЦР, включая исследуемые образцы, отрицательный и положительный контрольный образец.

Количество амплификационных пробирок в шт. (N)	ОТ-ПЦР-буфер (мкл) (N + 1) × 15
	Фермент Taq/RT (мкл) (N + 1) × 0,5



Внимание!

- Каждая постановка клинических образцов должна сопровождаться положительным «К+» и отрицательным «К-» контрольными образцами.
- С учетом фасовки реагентов рекомендуем при составлении смеси ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT брать в постановку не менее 8 образцов: 6 — неизвестных, 1 — положительный контрольный образец, 1 — отрицательный контрольный образец.

Количество клинических образцов на одну постановку, шт.	Количество амплификационных пробирок на одну постановку (с учетом «К+» и «К-»), шт.	Объем ОТ-ПЦР-буфера на одну постановку (с учетом запаса «+1»), мкл	Объем фермента Taq/RT на одну постановку (с учетом запаса «+1»), мкл	Максимальное количество постановок набора реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV» (96 исследований)
6 (min)	8	135	4,5	12
10	12	195	6,5	8
22	24	375	12,5	4
44	48	735	24,5	2
94	96	1455	48,5	1

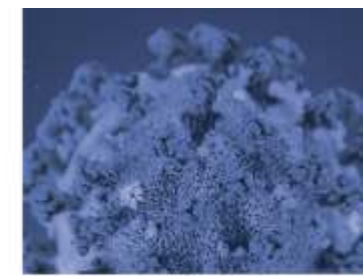


Таблица расхода реактивов для приготовления смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT на суммарное количество образцов

Образец, шт.	ОТ-ПЦР-буфер, мкл	Фермент Taq/RT, мкл
1	15	0,5
2	30	1
3	45	1,5
4	60	2
5	75	2,5
6	90	3
7	105	3,5
8	120	4
9	135	4,5
10	150	5
11	165	5,5
12	180	6
13	195	6,5
14	210	7
15	225	7,5
16	240	8
17	255	8,5
18	270	9
19	285	9,5
20	300	10
21	315	11
22	330	11
23	345	12
24	360	12
25	375	13

Образец, шт.	ОТ-ПЦР-буфер, мкл	Фермент Taq/RT, мкл
26	390	13
27	405	14
28	420	14
29	435	15
30	450	15
31	465	16
32	480	16
33	495	17
34	510	17
35	525	18
36	540	18
37	555	19
38	570	19
39	585	20
40	600	20
41	615	21
42	630	21
43	645	22
44	660	22
45	675	23
46	690	23
47	705	24
48	720	24
49	735	25
50	750	25

Образец, шт.	ОТ-ПЦР-буфер, мкл	Фермент Taq/RT, мкл
51	765	26
52	780	26
53	795	27
54	810	27
55	825	28
56	840	28
57	855	29
58	870	29
59	885	30
60	900	30
61	915	31
62	930	31
63	945	32
64	960	32
65	975	33
66	990	33
67	1005	34
68	1020	34
69	1035	35
70	1050	35
71	1065	36
72	1080	36
73	1095	37
74	1110	37
75	1125	38

Образец, шт.	ОТ-ПЦР-буфер, мкл	Фермент Taq/RT, мкл
76	1140	38
77	1155	39
78	1170	39
79	1185	40
80	1200	40
81	1215	41
82	1230	41
83	1245	42
84	1260	42
85	1275	43
86	1290	43
87	1305	44
88	1320	44
89	1335	45
90	1350	45
91	1365	46
92	1380	46
93	1395	47
94	1410	47
95	1425	48
96	1440	48
97	1455	49
98	1470	49
99	1485	50
100	1500	50

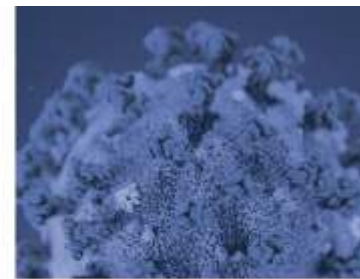


Приложение 2

Основные правила проведения работ по деkontаминации ПЦР-лаборатории

Составлено на основе МУ 1.3.2569-09. «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Москва, Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.

1. Сотрудники, проводящих мероприятия по деkontаминации, обеспечивают отдельными халатами (желательно одноразовыми), шапочками, одноразовыми бахилами и перчатками, одноразовой ветошью, емкостями для приготовления необходимого количества моющих и дезинфицирующих растворов.
2. Каждую зону лаборатории обрабатывают сотрудники, работающие в ней.
3. Для обработки каждой зоны используют отдельный набор уборочного инвентаря, подвергаемый после уборки обработке регламентируемыми дезинфицирующими средствами.
4. Каждую зону лаборатории разбивают на участки уборки, например:
 - ☼ участок 1 — бокс биологической безопасности и оборудование внутри него;
 - ☼ участок 2 — внешние поверхности бокса биологической безопасности;
 - ☼ участок 3 — шкафы для расходного материала;
 - ☼ участок 4 — холодильники для хранения реактивов, образцов проб;
 - ☼ участок 5 — оборудование, которое используют в работе, но стоит оно вне бокса биологической безопасности;
 - ☼ участок 6 — поверхности помещения (стены, окна, батареи, потолок, двери и т. д.);
 - ☼ участок 7 — пол.
5. Обработку проводят от участка к участку последовательно. Каждый участок обрабатывают отдельной ветошью. Перед обработкой готовят моющие и дезинфицирующие растворы.
6. Поверхности каждого участка вначале обрабатывают моющим раствором для удаления жировых загрязнений, после чего остатки моющего средства удаляются ветошью, смоченной водой.



7. Затем на поверхность наносят на 30 мин. 0,2%-ный раствор ДП-2Т или аналогичные ему растворы, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке. Остатки дезинфицирующего средства тщательно удаляют ветошью, смоченной водой.
8. После завершения указанной обработки проводят обеззараживание влажных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 45 мин.
9. Мероприятия, описанные в пп. 7 и 8, повторяют еще раз.
10. По завершении деконтаминации берут повторные смывы, которые исследуют на наличие нуклеиновых кислот и (или) ампликонов возбудителей инфекционных заболеваний, диагностика которых наиболее часто осуществляется в данной лаборатории, с учетом длины специфических фрагментов амплификации нуклеиновых кислот возбудителей, указанных в инструкциях по применению к набору реагентов.
11. Для проведения смывов используют отдельные стерильные зонды с ватным тампоном, которые смачивают в 0,9%-ном растворе натрия хлорида или ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) и вращательными движениями протирают рабочие поверхности оборудования, мебели, дверных ручек, косяков, телефонов и т. п. в течение 10–15 с, особое внимание уделяя помещениям совместного посещения работников зоны детекции продуктов амплификации и других сотрудников лаборатории (столовая, санузел и т. п.). После взятия смыва зонд помещают в микропробирки объемом 1,5 мл с 300–400 мкл ТЕ-буфера или 0,9%-ным раствором натрия хлорида, вращают в течение 10–15 с, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенку пробирки, удаляют. Полученные суспензии перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Для постановки реакции амплификации используют необходимый объем жидкости в соответствии с инструкцией по применению к набору реагентов. После получения результатов смывов оформляется протокол.
12. В случае получения в образцах смывов положительных результатов амплификации обработку повторяют.
13. Загрязненный расходный материал (пробирки, наконечники, реактивы и т. п.) и контаминированный рабочий исследуемый материал (кроме исходного материала) обеззараживают через автоклавирование.
14. Случаи контаминации регистрируют в специальном журнале с указанием мероприятий по ее устранению и результатов внутрилабораторного контроля.
15. Проведение работ, связанных с амплификацией нуклеиновых кислот, до завершения деконтаминационных мероприятий в лаборатории не допускается.



031-1 2020.08.27



Контакты офиса:

ООО «ДНК-Технология».

Адрес: г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125ж, корп. 6, эт. 5, комн. 14.
Тел./факс: +7 495 640-17-71; www.dna-technology.ru; mail@dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный); hotline@dna-technology.ru