

ВРЕМЕННОЕ РУКОВОДСТВО ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ COVID-19 В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ

Методические рекомендации № 89

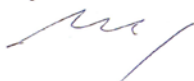


МОСКВА
2020

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Г лавный внештатный
Специалист (указать специальность)
Департамента здравоохранения
города Москвы



А.Н. Цибин

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы



2020г.

ВРЕМЕННОЕ РУКОВОДСТВО ПО ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКЕ COVID-19 В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ

Методические рекомендации № 89

Москва 2020

УДК 57.089:331.45:630*444

ББК 53.4

Организация-разработчик:

Государственное бюджетное учреждение города Москвы «Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы»

Составители:

А. Н. Цибин, кандидат биологических наук М. Ф. Латыпова, О. И. Иванушкина, С. М. Цибина.

Рецензенты:

А. И. Мазус, доктор медицинских наук; М. А. Годков, руководитель отдела лабораторной диагностики НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, доктор медицинских наук; С. Н. Щербо, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, профессор, доктор биологических наук; Т. А. Старовойтова, заведующая КДЛ ГБУЗ «ГКБ № 1 им. Н. И. Пирогова ДЗМ», д. м. н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования МЗ России, член аккредитационной комиссии МЗ России.

Временное руководство по лабораторной диагностике COVID-19 в условиях пандемии: Методические рекомендации № 89. – М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2020. – 64 с.

Предназначение:

Данные методические рекомендации предназначены для медицинских специалистов медицинских организаций, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы, выполняющих забор биологического материала и лабораторные исследования при обследовании на новое коронавирусное заболевание COVID-19. В них отражены правила соблюдения требований: биологической безопасности пациента и медицинского лабораторного персонала при выполнении клинико-лабораторного обследования, к выбору и забору биологического материала для исследования, к маркировке проб и оформлению сопроводительных направлений на анализы, к упаковке биоматериала и режиму хранения, срокам и условиям транспортировки образцов к месту проведения исследований, к приему проб при доставке в лабораторию и бракеражу, к лабораторной диагностике и порядку выполнения этиологического лабораторного обследования, дифференциальной диагностике и к диагностике прогностических маркеров воспалительной реакции COVID-19, требующих мониторинга. В отношении COVID-19 рассмотрены методы специфической лабораторной диагностики, их информативность, целесообразность, подход к созданию стратегии тестирования. Предложен алгоритм лабораторного обследования пациентов с различными по степени тяжести состояниями, обусловленными новой коронавирусной инфекцией.

Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения.

За представленные данные в методических рекомендациях авторы несут персональную ответственность

ISBN 978-5-907251-80-9

© Департамент здравоохранения города Москвы, 2020

© ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2020

© Коллектив авторов, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Нормативные ссылки.....	5
Определения, список сокращений.....	6
Введение.....	9
1. Общие положения.....	11
2. Общие требования к организации преаналитического этапа.....	13
2.1. Требования к специалистам.....	13
2.2. Общие санитарные требования к помещениям лабораторий.....	15
2.3. Требования к организации и проведению работ с ПБА I–IV групп патогенности с использованием методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), помещениям, оборудованию лабораторий, к обработке помещений и обеззараживанию материала.....	16
2.4. Общие требования к порядку использования средств индивидуальной защиты.....	16
2.5. Общие требования к биологическому материалу для исследования.....	19
2.6. Рекомендации по использованию транспортной среды для биоматериала на исследование методами амплификации нуклеиновых кислот.....	23
2.7. Правила оформления проб с биоматериалом.....	23
2.7.1. Маркировка проб.....	23
2.7.2. Оформление направлений на исследования.....	23
2.7.3. Правила подготовки проб для транспортировки на исследования в сторонние медицинские организации.....	25
2.7.4. Правила подготовки проб для транспортировки на исследования внутри одного здания.....	26
2.7.5. Режим хранения и транспортировки проб с биологическим материалом.....	26
2.7.6. Транспортировка проб с биологическим материалом.....	27
2.7.7. Прием проб с биологическим материалом при доставке в лабораторию.....	27
2.7.8. Бракераж образцов с биоматериалом.....	28
3. Общие требования к диагностике COVID-19.....	29
3.1. Категории пациентов, подлежащих обследованию на SARS-CoV-2.....	30
3.2. Лабораторная диагностика прогностических маркеров воспалительной реакции COVID-19, требующих мониторинга.....	31
3.3. Дифференциальная диагностика COVID-19.....	33
3.4. Обнаружение вторичных бактериальных или грибковых инфекций при COVID-19.....	33
3.5. Порядок выполнения этиологической лабораторной диагностики COVID-19.....	33
3.6. Специфическая диагностика SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот.....	34

3.6.1. Целевые мишени SARS-CoV-2 для специфической диагностики COVID-19 методом ОТ-ПЦР в реальном времени	34
3.6.2. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени	34
3.6.3. Геномное секвенирование (NGS) SARS-CoV-2	37
3.6.4. Петлевая изотермальная амплификация	37
3.7. Специфическая диагностика вируса SARS-CoV-2 культуральным методом	38
3.8. Специфическая диагностика антигена SARS-CoV-2	39
3.9. Специфическая диагностика сывороточных антител IgM, IgA и IgG к SARS-CoV-2	40
3.9.1. Целевые мишени SARS-CoV-2 для специфической диагностики COVID-19 серологическими методами	40
3.9.2. Методы определения сывороточных антител для выявления вирусных белков	40
3.9.2.1. «Экспресс-тесты»	41
3.9.2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA)	43
3.9.2.3. Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА)	44
3.9.3. Анализ «нейтрализации антител»	46
4. Подход к созданию алгоритма лабораторного обследования на COVID-19	48
4.1. Характеристики теста для принятия решения о его использовании	48
4.2. Стратегии тестирования на COVID-19	52
5. Алгоритм лабораторного обследования на COVID-19	52
5.1. Алгоритм лабораторного обследования для легких случаев COVID-19 (амбулаторное лечение)	52
5.2. Алгоритм лабораторного обследования для случаев средней тяжести COVID-19 (госпитализация)	53
5.3. Алгоритм лабораторного обследования для тяжелых случаев COVID-19 (госпитализация в ОПИТ)	54
5.4. Алгоритм лабораторного обследования для крайне тяжелых случаев COVID-19	55
6. Требования к выполнению этиологического лабораторного обследования на COVID-19	56
7. Контроль качества лабораторных исследований на COVID-19	58
Заключение	60
Литература	61

При разработке использованы действующие нормативные документы и акты Российской Федерации, Правительства города Москвы:

1. ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».
2. ГОСТ Р 53079.4-2008. «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».
3. ГОСТ ISO 6710-2011 «Межгосударственный стандарт. Контейнеры для сбора образцов венозной крови одноразовые. Технические требования и методы испытаний».
4. ГОСТ ISO 15189:2012 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности».
5. Федеральный закон от 04.05.2011 №99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности».
6. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
7. Приказ МЗ РФ от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
8. Временные методические рекомендации МЗ РФ Версия 7 от 03.06.2020. «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».
9. Письмо Минздрава России от 10.04.2020 № 17-1/И/1-2004 «О направлении Временной инструкции по вопросам забора биологического материала у всех пациентов с подозрением на пневмонию или с подтвержденной пневмонией, поступающих на госпитализацию в стационары».
10. Письмо Роспотребнадзора от 07.04.2020 № 02/6339-2020-32 «О направлении памятки по применению многоразовой защитной одежды при COVID-19».
11. Методические рекомендации МР 3.1.0169-20 (в редакции МР 3.1.0174-20 «Изменения № 1 в МР 3.1.0170-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», утверждены Роспотребнадзором 30.04.2020).
12. СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» (утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 09.12.2010. №163).
13. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудите-

лями паразитарных болезней» (утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 28 января 2008 г. № 4).

14. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I- II групп патогенности (опасности)» (утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 28 ноября 2013 г. № 64).
15. СП 1.2.1318-03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний I- IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами» (утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.04.2003. № 85).
16. СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности» (утверждены и введены в действие Постановлением Госкомсанэпиднадзора России от 28 августа 1995 г. № 14).
17. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 22.05.2020. № 15).
18. Методические рекомендации МР ДЗМ №28 от 04.07.2017 г. «Организация работы пунктов приема биологического материала».

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем документе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

- ДВС-синдром – это патологический неспецифический процесс, характеризующийся образованием диссеминированных тромбов (фибриновых, эритроцитарных и гиалиновых) в сосудах микроциркуляторного русла в сочетании с несвертываемостью крови, приводящей к множественным массивным кровоизлияниям.
- ОРДС – это жизнеугрожающее воспалительное поражение легких, характеризующееся диффузной инфильтрацией и тяжелой гипоксемией.
- Геномное секвенирование – это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК.
- Петлевая изотермальная амплификация – это техника амплификации ДНК в одной пробирке.

- Клетки Vero-E6 – это линия клеток (клон от Vero 76), применяющаяся в качестве клеток-хозяев для выращивания вируса; например, для определения наличия или отсутствия репликации вируса или для выращивания вирусных культур в научно-исследовательских целях.
- Цитопатический эффект (ЦЭ) – это цитопатогенное действие вируса, специфическая морфологическая деструкция (разрушение) и функциональная патология зараженных вирусами клеток, культивируемых вне организма.
- Бляшкообразующая единица (БОЕ) – это наименьшее количество вируса или бактериофага, способное вызвать образование одной негативной колонии (бляшки) соответственно на однослойной культуре клеток позвоночных или на агаровой культуре бактерий.
- Интерквартильный интервал – это интервал значений признака, содержащий центральные 50 % наблюдений выборки, т. е. интервал между 25-м и 75-м процентилями.
- Рекомбинантный вирус – это вирус, в состав генома которого входят нуклеотидные последовательности геномов других вирусов или клеток.
- 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.
- Монослойные клетки хозяина – это монослойный способ культивирования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДЗМ** – Департамент здравоохранения города Москвы
- МО** – медицинская организация
- СИЗ** – средства индивидуальной защиты
- ОРДС** – острый респираторный дистресс-синдром
- ДВС** – синдром – диссеминированное внутрисосудистое свертывание, коагулопатия потребления, тромбогеморрагический синдром
- ЦНС** – центральная нервная система
- ПБА** – патогенные биологические агенты
- БМБ** – бокс микробиологической безопасности
- ВДП** – верхние дыхательные пути
- НДП** – нижние дыхательные пути
- ИВЛ** – искусственная вентиляция легких
- ОДН** – острая дыхательная недостаточность
- ОРВИ** – острая респираторная вирусная инфекция
- к-ДНК** – комплементарная ДНК
- РУ** – регистрационное удостоверение
- ВДП** – верхние дыхательные пути
- НДП** – нижние дыхательные пути

ВВЕДЕНИЕ

Новый трансмиссивный коронавирус SARS-CoV-2 вызывает острое инфекционное заболевание, преимущественно поражающее легкие (Corona Virus Disease 2019, COVID-19). COVID-19 включено в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих (Постановление Правительства РФ от 31 января 2020 г. № 66). Впервые этот вирус обнаружен в городе Ухань провинции Хубэй в Китае в декабре 2019 года. SARS-CoV-2 – одноцепочечный РНК-содержащий вирус, семейство Coronaviridae, род Betacoronavirus (Beta-CoV), отнесен ко II группе патогенности, как и другие представители этого семейства (вирус SARS-CoV, MERS-CoV). [1]

Основным источником инфекции является больной человек, в том числе находящийся в инкубационном периоде заболевания [2].

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. Известно, что при комнатной температуре SARS-CoV-2 сохраняет жизнеспособность на различных объектах окружающей среды в течение 3 суток.

Новый коронавирус попадает в организм человека через клетки-мишени, имеющие на своей поверхности рецепторы ангиотензинпревращающего 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. [2]

Большинство людей с COVID-19 переносят заболевание в легкой и неосложненной форме. Однако примерно у 14 % зараженных развивается тяжелая форма болезни, требующая госпитализации и кислородной поддержки. Около 5 % пациентов требуют лечения в условиях палаты интенсивной терапии [1]. При тяжелом течении заболевание может быть осложнено ОРДС, сепсисом, септическим

шоком, полиорганной недостаточностью, которая включает в себя острое поражение почек и поражение сердца [3]. Диссеминация SARS-CoV-2 из системного кровотока или через пластинку решетчатой кости (Lamina cribrosa) может привести к поражению головного мозга. Изменение обоняния (гипосмия) у больного на ранней стадии заболевания может свидетельствовать о поражении ЦНС [2].

Установлено, что пожилые пациенты и пациенты с сопутствующими состояниями, такими как сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет, имеют повышенный риск развития тяжелой формы COVID-19 и смерти [2].

Появление COVID-19 поставило перед специалистами здравоохранения задачи, связанные с быстрой диагностикой и оказанием своевременной медицинской помощи больным.

Раннее выявление пациентов с подозрением на COVID-19 позволяет своевременно начать соответствующие меры профилактики и контролировать течение инфекции.

В настоящих методических рекомендациях изложен порядок организации и алгоритм лабораторного обследования населения на SARS-CoV-2 в условиях пандемии.

Данные методические рекомендации предназначены в помощь организаторам здравоохранения, главным медицинским сестрам, процедурным медицинским сестрам, заведующим лабораторий и врачам клинической лабораторной диагностики МО, осуществляющим выполнение лабораторного обследования на COVID-19, в целях обеспечения эффективной и безопасной организации преаналитического, аналитического и постаналитического этапов лабораторных процессов. Предложен алгоритм последовательного лабораторного обследования пациентов для различных случаев течения COVID-19, с указанием лабораторных показателей, уровень которых подлежит мониторингу при различной степени тяжести заболевания. Представленные методические рекомендации распространяются в качестве временного руководства для МО, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы.

1

Общие положения

Целью применения настоящих рекомендаций является обеспечение безопасности пациента и медицинского персонала при проведении обследования на SARS-CoV-2 с выполнением лабораторных методов, получения достоверных результатов исследований, использования их для верификации диагноза, осуществления лечебных мер, мониторинга и прогнозирования состояния пациента, контроля за эффективностью проводимой терапии, контроля излеченности, а также для осуществления эпидемиологического мониторинга за COVID-19.

Деятельность лабораторий осуществляется на основании лицензии, предоставляемой в порядке, установленном законодательством Российской Федерации, в соответствии с Положением о лицензировании медицинской деятельности Федерального закона от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности» и санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями I – IV группы патогенности.

Лаборатории на территории РФ, выполняющие работы с биологическим материалом от больных и/или с подозрением на COVID-19, должны обязательно соблюдать требования нормативных правовых актов:

- СП 1.2.1318-03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами
- СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».
- СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III- IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2518-09. Дополнения и изменения №1 к СП 1.3.2322-08.
- СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I- IV групп патогенности».

Несоблюдение требований вышеперечисленных нормативных документов приводит к возникновению угрозы жизни и здоровью человека, способствует распространению новых случаев COVID-19. За нарушение санитарного законодательства предусмотрена дисциплинарная, административная и уголовная ответственность (ст. № 1, № 39, № 55 ФЗ России № 52 от 30.03.1999 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»; ст. 248 УК РФ).

В лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III–IV группы патогенности, допускается:

- проведение молекулярно-биологических методов исследований биологического материала (без предварительного накопления возбудителя) на наличие ДНК (РНК) возбудителей инфекционных болезней, которых относят к II группе патогенности;
- проведение исследований биологического материала, подозрительного на инфицирование микроорганизмами II группы патогенности, только в тех случаях, для которых разработаны и утверждены нормативные документы, регламентирующие порядок проведения таких исследований в условиях конкретной лаборатории;
- проведение иммунологических (серологических) исследований по обнаружению в крови людей антигенов микроорганизмов II группы патогенности (без накопления возбудителя) и/или антител к ним [5].

В лабораториях, выполняющих методы амплификации нуклеиновых кислот вируса SARS-CoV-2, проведение работ организовать в соответствии с общими правилами, установленными в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», с четким соблюдением требований санитарно-эпидемиологического режима, регламентированного СП 1.3.3118-13.

Организацию комплекса мероприятий по биологической безопасности в медицинской организации в целом обеспечивает ее руководитель, а по подразделениям – их заведующие.

Территория должна иметь ограждение, препятствующее бесконтрольному проникновению посторонних лиц.

2

Общие требования к организации преаналитического этапа

2.1. Требования к специалистам

Исследование материала, подозрительного и/или содержащего микроорганизмы I–IV групп патогенности, имеют право проводить специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим, ветеринарным и иным образованием, окончившие соответствующие курсы специализации с освоением методов безопасной работы с ПБА I–II групп и с микроорганизмами III–IV групп патогенности, получившие дополнительное специальное образование на лицензированных курсах повышения квалификации по ПЦР-диагностике. Требования к знаниям и умениям специалистов должны соответствовать образовательным стандартам и другим нормативным документам, действующим на территории РФ.

К работе с тест-системами для диагностики COVID-19 в лаборатории организаций допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками лабораторий Роспотребнадзора, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности [5].

Специалисты с высшим профильным образованием осуществляют контроль всего технологического процесса и непосредственно выполняют этапы молекулярно-биологического исследования по выявлению нуклеиновой кислоты вируса SARS-CoV-2 – возбудителя инфекционного заболевания COVID-19, требующие высокой квалификации и специальной подготовки, принимают решение о необходимости дополнительных исследований (повторное проведение исследования и т. п.). Врачи клинической лабораторной диагностики оказывают консультативную помощь врачам-инфекционистам в интерпретации результатов анализов, целесообразности проведения дополнительных исследований для верификации диагноза, в осуществлении лабораторного мониторинга в процессе лечения пациента.

Специалист со средним медицинским образованием и соответствующей квалификацией (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант, лаборант), имеющий сертификат специалиста и прошедший периодическое повышение квалификации в установленном порядке, выполняет: прием поступающих в лабораторию образцов и сопроводительных документов, регистрацию полученного биологического материала, проведение технических манипуляций, не требующих высокой квалификации (подготовка помещений, ла-

минарных боксов, расходных материалов, утилизация использованных расходных материалов и остатков использованных биологических образцов).

Допуск специалистов к работе с ПБА оформляют приказом руководителя медицинской организации по результатам проверки знаний по биологической безопасности и профилактического медицинского осмотра с периодичностью 1 раз в 2 года.

Инструктаж по соблюдению требований биологической безопасности должен проводиться не менее 1 раза в год [6].

Инструктаж по биологической безопасности специалистов, выполняющих работы с микроорганизмами II группы патогенности, проводит заведующий, с отметкой в специальном журнале 1 раз в квартал.

Основные требования к медицинскому наблюдению за персоналом.

При приеме на работу, связанную с ПБА II группы патогенности, персонал проходит предварительный медицинский осмотр с целью выявления противопоказаний с учетом вакцинопрофилактики, лечения специфическими препаратами и применения средств индивидуальной защиты. Объем и порядок проведения медосмотра определяются нормативными документами.

Все сотрудники, выполняющие работы с ПБА II группы патогенности, подлежат диспансерному наблюдению. Периодические медицинские осмотры проводят в соответствии с нормативными документами.

Лиц, имеющих противопоказания к вакцинопрофилактике, при наличии средств эффективного специфического лечения допускают к работе отдельным приказом по организации в соответствии с их письменным заявлением.

Лиц с нарушениями иммунной системы к работе в максимально изолированных лабораториях не допускают.

Всем сотрудникам, работающим с ПБА I–II групп патогенности или по роду деятельности посещающим помещения «заразной зоны», проводятся ежедневная термометрия (в начале и в конце рабочего дня, с фиксацией результатов в журнале и заверением подписью ответственного за термометрию) и обсервация [7].

При появлении у сотрудника симптомов, характерных для инфекционного заболевания, вызываемого возбудителем, с которым он выполнял работу, сотрудник ставит в известность руководителя подразделения или дежурного по организации. Персонал лабораторий информирует своего заведующего во всех случаях возникновения недомогания. Дальнейшее решение принимает руководитель организации.

При авариях во время работы с ПБА пострадавшему своевременно должна быть оказана помощь в рамках специфических мероприятий, с применением средств «аварийной аптечки» и изоляции.

Обо всех случаях заболевания сотрудников в результате аварии или лабораторного заражения во время работы с ПБА руководитель организации обязан немедленно информировать территориальные органы Роспотребнадзора и здравоохранения. Обо всех случаях аварий во время работы с ПБА, требующих профилактического лечения пострадавшего, необходимо передавать информацию в ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора [5].

2.2. Общие санитарные требования к помещениям лабораторий

Лаборатории, где проводят работу с ПБА, размещают в отдельно стоящем здании или в изолированной части здания, имеющей независимый вход. На входной двери лаборатории должны быть обозначены название (номер) лаборатории и знак «Биологическая опасность» (красного или красно-оранжевого цвета на желтом фоне). Входная дверь должна иметь запирающее устройство.

Лаборатории, проводящие диагностические исследования, оборудуют двумя входами – для сотрудников и для получения материала. Допускается также получение материала через передаточное окно или передаточный шлюз.

Лаборатории должны быть обеспечены системами водоснабжения, специальной канализации, электроснабжения, отопления, приточно-вытяжной вентиляции, телефонной связью, а также оснащены охранной и пожарной сигнализацией.

Все помещения лаборатории должны быть обеспечены естественным и (или) искусственным освещением, создающим уровень освещенности в зависимости от вида работ.

Помещения лаборатории подразделяются на «заразную» зону, где осуществляются манипуляции с ПБА и их хранение, и «чистую» зону, где не проводятся работы с ПБА.

Планировочные решения и размещение оборудования должны обеспечивать точность продвижения как ПБА, так и персонала.

На границе «чистой» и «заразной» зон необходимо располагать санитарный пропускник, состоящий из помещения для личной одежды, душевой и помещения для рабочей одежды. На границе зон на входе в помещение душевой необходимо устанавливать герметичную дверь, на которую должен быть нанесен знак «Биологическая опасность».

В помещениях «заразной» зоны, где не проводится непосредственная работа с ПБА, персонал работает в рабочей одежде. В помещениях, где проводится работа с ПБА, дополнительно надевается защитная одежда. Тип защитной одежды зависит от характера выполняемой работы.

Лаборатория обеспечивается средствами тушения пожара и оборудуется пожарной сигнализацией.

Помещения, где проводится работа с ПБА, оборудуются бактерицидными облучателями для обеззараживания воздуха и поверхностей в соответствии с руководством по использованию ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях.

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.

Помещения «заразной» зоны лабораторий должны быть оборудованы системами приточно-вытяжной механической вентиляции.

Для работы с ПБА могут применяться боксы МБ II и III классов. Допускается использование БМБ I класса для проведения подготовительных работ и работ с инактивированными возбудителями [7].

Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с требованиями СП 2.1.7.2790-10 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений». 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».

Использованные материалы утилизировать в установленном порядке, дезинфекцию рабочих поверхностей и биологических жидкостей больного проводить с использованием дезинфицирующих средств, содержащих хлор.

2.3. Требования к организации и проведению работ с ПБА I–IV групп патогенности с использованием методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), помещениям, оборудованию лабораторий, к обработке помещений и обеззараживанию материала, выполнять в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569 – 09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности.

2.4. Общие требования к порядку использования средств индивидуальной защиты

Для работы с ПБА каждого сотрудника обеспечивают рабочей и защитной одеждой и обувью, а также средствами индивидуальной защиты органов дыхания и зрения в соответствии с утвержденными нормами.

Одежда и обувь должны быть индивидуальными, соответствовать размерам работников и храниться: рабочая одежда – в санитарном пропускнике отдельно

от личной одежды в индивидуальных шкафчиках сотрудников, защитная – в местах ее надевания.

Состав комплекта СИЗ для работы с ПБА II группы патогенности (вирусы): СИЗ IV типа (аналог противочумного костюма) + перчатки + респиратор типа FFP3 или эквивалент, или более высокий уровень защиты (пневмошлем) + очки для защиты глаз или защитный экран [5].

Серологические исследования на обнаружение антигена или определение антител к вирусам II группы патогенности в связи с отсутствием регламентированных методов инаktivации вирусов проводятся в боксированном помещении, оборудованном системами приточной и вытяжной вентиляции в СИЗ IV типа + перчатки + респиратор + очки или в боксе МБ II или III классов.

Надевание и снятие защитной одежды производят в предбоксе (шлюзе).

В предбоксах (шлюзах), а также в комнатах для снятия защитной одежды устанавливаются водопроводные краны (рукомойники) и емкости с дезинфицирующими растворами для текущей дезинфекции, связанной со снятием защитной одежды, на случай аварии и хранится резерв запасной защитной одежды. На полу размещается коврик, смоченный дезинфицирующим раствором.

Пневмокостюмы и изолирующие костюмы обеззараживаются после каждого использования.

При работе в лабораториях защитная одежда меняется по мере загрязнения, но не реже одного раза в неделю (СП 1.3.3118-13).

СИЗ IV типа (аналог противочумного костюма) надевают до входа в помещение, где ведется работа с ПБА, в строго определенной последовательности [8].

Порядок надевания СИЗ IV типа (аналог противочумного костюма):

1. Надеть рабочую одежду и обувь;
2. Вымыть руки;
3. Надеть одноразовую медицинскую шапку так, чтобы закрыть лоб до бровей;
4. Надеть одноразовую медицинскую маску (респиратор для твердых частиц № 5 или с аналогичным, или более высоким уровнем защиты) на лицо так, чтобы верхний край ее доходил до нижней части орбит, а нижний – должен находиться под подбородком;
5. Надеть нижние одноразовые латексные перчатки;
6. Надеть СИЗ глаз (защитные очки должны быть пригнаны);

7. Надеть халат с длинными рукавами;
8. Надеть одноразовую защитную накидку (если это требуется в специальных рабочих зонах);
9. Надеть защитный щиток для лица/автономный респиратор для подачи очищенного воздуха (если это требуется в специальных рабочих зонах);
10. Надеть верхние одноразовые латексные перчатки, предварительно проверив их на целостность;
11. Перед входом в «заразную» зону обувают водонепроницаемые бахилы в случае, если выдана защитная одежда без бахил;
12. Одевание завершено.

Снятие защитного костюма выполняют вне помещения, где работают с ПБА (комната для снятия защитной одежды, предбокс), медленно, в строго определенном порядке.

Порядок снятия СИЗ IV типа (аналог противочумного костюма):

1. Вымыть руки и удалить видимые телесные жидкости/пятна крови на наружных поверхностях обеих рук;
2. Вымыть руки, заменить верхние перчатки новыми или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
3. Снять автономный респиратор для подачи очищенного воздуха или самовсасывающую полнолицевую маску фильтрующего типа/маску (если используется);
4. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
5. Снять одноразовую накидку и верхние перчатки (если используются);
6. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
7. Надеть верхние перчатки;
8. Зайти в помещение для снятия СИЗ № 1;
9. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
10. Снять защитную одежду, а также верхние перчатки (перчатки и защитную одежду следует вывернуть наизнанку и свернуть) (примечание: вместе с защитной одеждой следует снять также бахилы);
11. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;

12. Зайти в помещение для снятия СИЗ № 2;
13. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
14. Снять защитные очки;
15. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
16. Снять защитную маску;
17. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
18. Снять защитную шапку;
19. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
20. Снять нижние одноразовые латексные перчатки;
21. Вымыть руки или руки в перчатках погрузить в дезинфицирующий раствор;
22. Зайти в помещение для снятия СИЗ № 3 (душевая);
23. Вымыть руки, принять душ, надеть чистую одежду и выйти в незараженное, чистое помещение.

2.5. Общие требования к биологическому материалу для исследования

Важным требованием выполнения преаналитического этапа лабораторного исследования является правильный выбор, отбор, хранение и использование биологического материала у категории пациентов, подлежащих обследованию на SARS-CoV-2. Биологический материал должен содержать максимальное количество генома возбудителя COVID-19 и быть доступным для получения неинвазивными методами.

Виды биологического материала для исследования на SARS-CoV-2.

Выделяют следующие виды образцов:

- из верхних дыхательных путей (мазки из зева, мазки из носа, носоглоточные секреты);
- из нижних дыхательных путей (мокрота, секреты дыхательных путей, жидкость бронхоальвеолярного лаважа);
- кровь;
- кал;
- конъюнктивальные секреты.

Выбор биоматериала.

Для диагностики нового коронавируса SARS-CoV-2 преимущественно рекомендован биологический материал из верхних и нижних дыхательных путей.

Материалом из верхних дыхательных путей (ВДП) являются мазки со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки, где максимальная концентрация вируса достигается на 2-й, 3-й день от момента появления симптомов заболевания. Рекомендовано выполнять забор биоматериала в эти сроки, несмотря на то, что в ПЦР-анализе РНК вируса SARS-CoV-2 обнаруживается гораздо позднее (в среднем до 7 дней и максимум – до 2 недель от начала заболевания, при условии сохранения признаков поражения верхних дыхательных путей). У госпитализированных пациентов биоматериал для исследования следует собирать как можно раньше при поступлении (не позднее вторых суток), т. к. в более поздние сроки не исключена возможность суперинфекции при контакте с другими пациентами.

Материалом из нижних дыхательных путей (НДП) являются мокрота (откашливаемая свободно или откашливаемая после индукции ингаляцией стерильного 5 % раствора натрия хлорида через небулайзер, или полученная аспирацией из трахеи), плевральная жидкость, эндотрахеальные аспираты (трахеобронхиальный аспират) из трахеи, получаемые с помощью хирургического (вакуумного или электрического) отсоса, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов, получаемые с помощью фибробронхоскопии. Отмечено, что мокрота и другие образцы из нижних дыхательных путей более информативны для исследования, т. к. содержат более высокое количество нуклеиновых кислот вируса, т. к. SARS-CoV-2 разрастается преимущественно в альвеолярных клетках II типа (AT2), а пик вирусовыделения наступает через 3–5 дней после начала болезни. Если результаты ПЦР-анализа вначале отрицательны, следует повторить их в последующие дни.

Если для выявления SARS-CoV-2 у пациента невозможно получить биологический материал из нижних дыхательных путей, следует исследовать мазки из верхних дыхательных путей (со слизистой носоглотки из нижнего носового хода и со слизистой задней стенки ротоглотки) [9].

Требования санитарного законодательства к биологическому материалу.

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 СП 1.3.3118-13.

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

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 материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами II группы патогенности, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты.

Правила взятия образцов биоматериала [4].

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

Рекомендован способ взятия мазков со слизистых оболочек верхних дыхательных путей у детей и взрослых: с помощью 2 разных зондов, сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, и объединяют вместе (концы зондов с тампонами после взятия мазков последовательно помещаются в одну пробирку объемом 1,5–2,0 мл с 0,5 мл транспортной среды) и исследуют как один образец, с целью повышения чувствительности исследования.

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

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

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

Мокроту при глубоком откашливании собирают в стерильные одноразовые герметично закрывающиеся контейнеры натошак после чистки зубов и полоскания полости рта водой. Пациента просят сделать несколько глубоких вдохов с задержкой дыхания на несколько секунд, затем с силой выдохнуть, что способствует появлению продуктивного кашля и очищению верхних дыхательных путей от мокроты. Мокроту помещают в стерильные одноразовые пластиковые контейнеры.

Получение плевральной жидкости осуществляют в одноразовые, плотно заворачивающиеся пробирки объемом 10–15 мл. Перед манипуляцией производят дезинфекцию кожи 70 % этиловым спиртом, затем 1-2 % раствором йода, избыток йода удаляют марлевой салфеткой, смоченной 70 % спиртом, во избежание ожога кожи пациента. После этого выполняют чрескожную аспирацию для получения пробы плевральной жидкости, при тщательном соблюдении правил асептики. Объем пробы должен составлять не менее 5 мл. Из шприца удаляют все пузырьки воздуха, после чего пробу немедленно переносят в стерильный пластиковый контейнер. Контейнер плотно закрывают крышкой.

Получение венозной крови для серологического исследования.

Взятие венозной крови для исследования на иммуноглобулины к COVID-19 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 (стерильной марлевой салфеткой или ватным шариком, смоченным антисептическим раствором). 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.

Получение образца кала для ПЦР-анализа: отобрать –2 г гнойной крови или слизи фекалий и поместить их в закрытый стерильный контейнер, тестирование желательно провести в течение часа от момента забора биоматериала.

2.6. Рекомендации по использованию транспортной среды для биоматериала на исследование методами амплификации нуклеиновых кислот

Для транспортировки биоматериалов пациента на исследование методами амплификации нуклеиновых кислот с целью определения РНК SARS-CoV-2 рекомендованы к использованию транспортные среды, содержащие стерильный физиологический раствор (0,85 % хлорида натрия) с противогрибковыми и антибиотиковыми добавками и другие, предназначенные для этих целей, зарегистрированные на территории РФ в установленном порядке.

2.7. Правила оформления проб с биоматериалом

2.7.1. Маркировка проб

Требования к маркировке проб с биоматериалом:

- для исследования методами амплификации нуклеиновых кислот: проба должна подлежать маркировке несмываемым маркером, с указанием персонального идентификационного номера пробы, ФИО пациента, вида биоматериала и даты сбора образца (например, и/н № 25, Иванов И. И., мазок, 19.02.2020 г.).
- для серологического исследования на иммуноглобулины медицинская сестра, проводящая взятие крови, должна: идентифицировать пациента (спросить фамилию, имя, отчество, дату рождения, сравнить ответы с имеющейся информацией в направлении), представиться, объяснить ход предстоящей процедуры, сверить данные пациента, указанные на бланке направления, наклеить один из парных штрих-кодов на центральную часть пробирки, на бумажную этикетку таким образом, чтобы считывание было возможно, второй из парных штрих-кодов наклеить на нижнюю часть бланка направления.

2.7.2. Оформление направлений на исследование

Требования к оформлению сопроводительного направления к пробе на ПЦР-анализ.

Направление на лабораторное исследование оформляют в электронном виде через систему удаленной электронной регистрации после авторизации в системе и распечатывают на бумажном носителе.

В направлении указывают:

- наименование направляющего биоматериал учреждения, телефон;
- фамилию и имя обследуемого лица;

- возраст или дату рождения больного;
- пол;
- контактный телефон;
- номер страхового полиса ОМС;
- дату заболевания;
- место регистрации больного;
- место жительства больного;
- предварительный диагноз МКБ-10;
- место работы;
- адрес работы;
- рабочий телефон;
- страну прибытия;
- вид биоматериала;
- дату и время взятия биоматериала для лабораторного исследования.

На каждый образец с биоматериалом пациента оформляют одно сопроводительное направление на бумажном носителе, распечатывают в 3 экземплярах: один помещают в зип-пакет к пробе (вторичная упаковка), второй в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и отправляют в лабораторию, третий экземпляр остается у лица, направляющего пробы на исследование.

Требования к оформлению сопроводительного направления к пробе для серологического исследования.

Направление на лабораторное исследование оформляют в электронном виде через систему удаленной электронной регистрации после авторизации в системе и распечатывают на бумажном носителе. В направлении указывают:

- название МО;
- контактное лицо от МО, Ф.И.О., номер телефона;
- лаборатория, куда сдали образец;
- Ф.И.О. пациента, пол, дата рождения, контактный телефон;
- номер страхового полиса ОМС;
- адрес фактического проживания и адрес регистрации пациента;
- название организации работодателя, Ф.И.О.;
- контактное лицо от работодателя, Ф.И.О., телефон;

- адрес фактического места работы пациента, рабочий телефон;
- дата и время взятия образца;
- дата и время отправки образца в лабораторию;
- номер направления (заявки) на лабораторное исследование;
- лицо, отбравшее материал: должность, Ф.И.О., подпись;
- лицо, доставившее биоматериал: должность, Ф.И.О., подпись;
- лицо, принявшее биоматериал: должность, Ф.И.О., подпись;
- дата и время доставки биоматериала;
- общее количество заказанных анализов.

2.7.3. Правила подготовки проб для транспортировки на исследование в сторонние медицинские организации

Подготовка проб на ПЦР-анализ с соблюдением принципа «Тройной упаковки»:

- первичная упаковка: это пробирка или контейнер, содержащий биоматериал для анализа; допускается емкость из пластика/пробирка, небьющаяся, герметично закрытая, при необходимости ее можно дополнительно герметизировать медицинским лейкопластырем;
- вторичная упаковка: пробирки с образцами от одного пациента помещаются в зип-пакет размером 5 x 7 см или 6 x 8 см с ватой (или другим гигроскопичным материалом) в количестве, достаточном для абсорбции всего образца в случае его утечки. На пакете указывается и/н, ФИО пациента, дата сбора образцов (например, № 25, Иванов И.И., 19.02.2020 г.). Не допускается упаковывание образцов биоматериала от разных людей в один и тот же зип-пакет.
- третичная упаковка: зип-пакеты помещают в герметичный металлический контейнер – кейс, на нем указывают наименование организации.

Металлические контейнеры помещают в термоконтейнеры с охлаждающими термоэлементами (при температуре от +2 до +8 °С). В контейнер желательно поместить одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение требуемой температуры. К наружной стенке термоконтейнера следует прикрепить этикетку с указанием вида биоматериала, условий транспортирования, названия пункта назначения, отправителя и числа проб. Для доставки единичных проб возможно использование термос-контейнера.

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 мин.;
- 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 направлятельные бланки;
- при доставке проб в лабораторию сотрудник лаборатории должен сверить количество направлений с количеством проб, зарегистрировать эти данные в журнале приема биоматериала, поставить свою подпись и получить подпись курьера.

2.7.4. Правила подготовки проб для транспортировки на исследование внутри одного здания

При необходимости транспортирования образцов с биологическим материалом внутри одного здания пробирки/контейнеры с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные контейнеры-переноски. Транспортирование производится при комнатной температуре в течение 3 часов. Запрещена система пневматической передачи для транспортировки образцов [5].

2.7.5. Режим хранения и транспортировки проб с биологическим материалом

Мазки из носоглотки или ротоглотки (зева) в стерильной пластиковой пробирке с транспортной средой (с учетом рекомендаций производителя применяемых тест-систем/наборов реагентов) транспортируют при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 5 дней при $+4^{\circ}\text{C}$, более долгое хранение допускается при -20°C или -70°C .

Мокроту в одноразовом стерильном пластиковом контейнере объемом 30–50 мл, герметично закрытом завинчивающейся пробкой (диаметр горлышка контейнера – не менее 30 мм) транспортируют при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 48 часов при $+4^{\circ}\text{C}$, более долгое хранение допускается в транспортной среде, содержащей противогрибковые и антибактериальные препараты, при -20°C или -70°C .

Эндотрахеальный аспират, аспират носоглотки или смыв из носа в стерильном одноразовом контейнере транспортируют при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Время хране-

ния образцов до исследования не должно превышать 48 часов при +4 °С, более долгое хранение допускается при -20 °С или -70 °С.

Бронхоальвеолярный лаваж в стерильном одноразовом контейнере транспортируют при температуре +4 °С. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 48 часов при +4 °С, более долгое хранение допускается при -20 °С или -70 °С.

Кал в одноразовом контейнере транспортируют при температуре +4 °С. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 48 часов при +4 °С, более долгое хранение допускается при -20 °С или -70 °С.

Сыворотку крови в пробирке для отделения сыворотки (от взрослого: собрать 3-5 мл цельной крови). Время хранения образцов до исследования не должно превышать 48 часов при +4 °С, более долгое хранение допускается при -20 °С или -70 °С.

Цельную кровь транспортируют в пробирке для забора крови. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 48 часов при +4 °С, более долгое хранение допускается при -20 °С или -70 °С [5].

2.7.6. Транспортировка проб с биологическим материалом

Взятые пробы с биоматериалом должны быть немедленно направлены на исследование в лабораторию или сохранены с соблюдением требований действующих санитарных правил по безопасности при работе с патогенами II группы опасности до прибытия специалиста.

Транспортировка образцов должна осуществляться с соблюдением требований СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I- IV групп патогенности».

Медицинские работники, которые транспортируют образцы в лабораторию, должны быть обучены требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты.

2.7.7. Прием проб с биологическим материалом при доставке в лабораторию

Передачу образцов биологического материала от пациентов при подозрении на новую коронавирусную инфекцию COVID-19 в лаборатории медицинских организаций, имеющих эпидемиологическое заключение на работу с III и IV группами патогенности, выполнять с оформлением двух актов приема-передачи.

2.7.8. Бракераж образцов с биоматериалом

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

Критерии выбраковки проб на ПЦР-анализ:

- немаркированные или несущие неверную (нечитаемую) маркировку;
- для которых не указана дата получения материала;
- хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением требований, установленных для данного типа биологического материала, не допускается размораживание-оттаивание материала;
- с нарушением целостности и/или герметичности тары (пробирок и др.) (в т. ч. пролитые образцы). В случае непригодности доставленного образца необходимо уведомить врача, назначившего исследование, и рекомендовать повторное взятие материала с соблюдением всех перечисленных правил.

Если повторное взятие таких образцов биоматериала 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 (мутная сыворотка);
- отсутствие направления к пробе с биоматериалом;
- неоформленный (пустой) бланк направления;
- биологический материал взят в несоответствующую емкость (не с тем консервантом, антикоагулянтом, в приспособленной посуде и др.);
- нарушены временные параметры доставки биоматериала после сбора или взятия;
- нарушены условия транспортировки (не в термоконтейнере, горизонтальная транспортировка проб, нарушена герметичность проб) [10].

3

Общие требования к диагностике COVID-19

При подозрении на новую коронавирусную инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, независимо от вида оказания медицинской помощи пациентам проводится комплекс клинического обследования для определения степени тяжести состояния.

Классификация COVID-19 по степени тяжести:

- легкое течение;
- среднетяжелое течение;
- тяжелое течение;
- крайне тяжелое течение.

Диагноз устанавливают на основании клинического обследования, данных эпидемиологического анамнеза и результатов лабораторных исследований.

Лаборатории, выполняющие исследования на определение маркеров возбудителя COVID-19 в биологических пробах от категории лиц, подлежащих обследованию, направляют результаты анализов незамедлительно, по их завершению, но не позднее 24 часов, наиболее доступным из доступных способов в медицинские организации, направившие биологический материал.

Медицинские организации, выявившие случай заболевания COVID-19 (в т. ч. подозрительный), незамедлительно, по электронным каналам связи передают информацию в территориальные органы Роспотребнадзора с указанием данных об обследуемом лице, в объеме, позволяющем провести противоэпидемические мероприятия.

Медицинские организации, установившие предварительный или заключительный диагноз COVID-19, направляют в органы, уполномоченные осуществлять федеральный государственный санитарно-эпидемиологический надзор, экстренное извещение.

Подтвержденным случаем COVID-19 считается случай с лабораторным подтверждением любым из методов с использованием диагностических препаратов и тест-систем, зарегистрированных в соответствии с законодательством Российской Федерации [11].

Лабораторное обследование на COVID-19 включает в себя: этиологическую диагностику, дифференциальную диагностику и диагностику прогностических маркеров воспалительной реакции SARS-CoV-2 [2].

3.1. Категории пациентов, подлежащих обследованию на SARS-CoV-2

В целях оперативной организации проведения исследований и противоэпидемических мероприятий лабораторное обследование на COVID-19, в условиях распространения инфекции, проводят населению исходя из приоритетов 1, 2 и 3 уровня.

К приоритету 1 уровня относятся:

- лица, прибывшие из-за рубежа с наличием симптомов инфекционного заболевания (или при появлении симптомов в течение периода медицинского наблюдения);
- контактные лица с больным COVID-19, при появлении симптомов, не исключающих COVID-19, в ходе медицинского наблюдения и при отсутствии клинических проявлений на 8-10-й календарный день медицинского наблюдения со дня контакта с больным COVID-19;
- лица с «внебольничной пневмонией»;
- медицинские работники, имеющие риск инфицирования при профессиональной деятельности при появлении симптомов, не исключающих COVID-19;
- лица при появлении респираторных симптомов, находящиеся в интернатах, детских домах, детских лагерях, пансионатах для пожилых и других стационарных организациях социального обслуживания, учреждениях уголовно-исполнительной системы;

К приоритету 2 уровня относятся:

- лица старше 65 лет при появлении респираторных симптомов;
- работники медицинских организаций, имеющие риск инфицирования при профессиональной деятельности (лабораторные исследования проводятся 1 раз неделю до появления иммуноглобулина G);
- работники стационарных организаций социального обслуживания населения, учреждений уголовно-исполнительной системы при вахтовом методе работы до начала работы в организации с целью предупреждения заноса COVID-19.

К приоритету 3 уровня относятся:

- дети из организованных коллективов при возникновении 3 и более случаев заболеваний, не исключающих COVID-19 (обследуются как при вспышечной заболеваемости) [2].

3.2. Лабораторная диагностика прогностических маркеров воспалительной реакции COVID-19, требующих мониторинга

В комплекс лабораторного обследования пациентов должны быть включены: общеклинические анализы крови и мочи, скрининговые коагулологические исследования и ряд биохимических тестов с контролем газового состава крови.

Общий (клинический) анализ крови, с определением уровня эритроцитов, гематокрита, лейкоцитов, тромбоцитов, лейкоцитарной формулы, скорости оседания эритроцитов. Характерен нормоцитоз. Чем тяжелее течение, тем более выражены: лейкопения, лимфопения, эозинофилия, тромбоцитопения; в случае присоединения бактериальной суперинфекции: лейкоцитоз и/или «сдвиг формулы влево»; нейтрофилия может быть связана с цитокиновым штормом, вызванным вирусной инфекцией.

Общий (клинический) анализ мочи: при развитии тяжелых форм заболевания демонстрирует повышение плотности осадка, лейкоцитурию, протеинурию, эритроцитурию, цилиндрурию, иногда возникает гипергликемия, появляются кетоновые тела, глюкоза в моче и повышенное содержание билирубина [12].

Коагулологические исследования рекомендованы пациентам с ОДН: протромбиновое время (ПТВ) и протромбин по Квику, международное нормализованное отношение (МНО), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), фибриноген, D-димер.

У части пациентов может отмечаться гиперкоагуляция, но наиболее часто наблюдают дискоагуляцию. О гипокоагуляции свидетельствует удлинение ПТВ, МНО и АЧТВ.

По данным, опубликованным китайскими исследователями из Уханя, одним из основных маркеров, ассоциированным с развитием ДВС-синдрома и летального исхода, является высокий уровень D-димера и продуктов деградации фибриногена [13].

Биохимический анализ крови, с определением аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), билирубина, креатинина и мочевины, миоглобина, тропонина, мозгового натрий-уретического пептида (BNP/NTpro-BNP), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинфосфокиназы (КФК), ферритина, общего белка, альбумина и глюкозы для выявления отклонений, указывающих на наличие органной дисфункции, декомпенсацию сопутствующих заболеваний и развитие осложнений.

Для COVID-19 характерно повышение уровня содержания всех перечисленных биохимических показателей, кроме общего белка и альбумина, значение которых снижается в сравнении с нормальными величинами. Полученные результаты имеют прогностическую ценность и влияют на выбор лекарственных препаратов и/или на режим их дозирования.

Исследование белков острой фазы, с определением уровня содержания С-реактивного белка и прокальцитонина.

Увеличение концентрации С-реактивного белка коррелирует с тяжестью течения, распространенностью воспалительной инфильтрации и прогнозом при пневмонии.

Уровень содержания прокальцитонина имеет значение для дифференциальной диагностики: при бактериальной пневмонии и сепсисе – повышается; при корона-вирусной инфекции остается в пределах нормальных значений и только при тяжелом ее течении – снижается [2].

Исследование динамики иммунологического ответа, с определением интерлейкинов IL-1, IL-6, IL-8 и интерферона- γ для более точного прогнозирования начала цитокинового шторма. Увеличение уровня этих показателей используют для оценки риска развития тяжелого состояния (ОРДС), с целью предотвращения.

Патофизиология ОРДС в тяжелых случаях инфекции SARS-CoV-2 объясняется гипериммунной реакцией организма-хозяина. Репликация вируса вызывает прямое клеточное повреждение и высвобождение провоспалительных факторов из гибнущих клеток, активирует врожденные иммунные ответы хозяина через различные механизмы, такие как активация альвеолярных макрофагов и каскад комплемента через лектиновый путь. Активация каскада комплемента вызывает повреждение эндотелия и дополнительно привлекает лейкоциты через образование и высвобождение в месте воспаления анафилотоксинов C3a и C5a (цитокиноподобные полипептиды), ответственных за массивное локальное высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины IL-1, IL-6, IL-8, интерферон- γ и др. [14]. В рамках такого массивного иммунного ответа хозяина лимфоциты, альвеолярные макрофаги, моноциты и нейтрофилы реализуют свои провоспалительные ответы, вызывая дополнительное повреждение тканей и массивное повреждение альвеолярных и эндотелиальных клеток сосудов, вызывая микрососудистый тромбоз, что подтверждается повышением уровня лактатдегидрогеназы и D-димера. На поздних стадиях ОРДС прогрессирование повреждения эндотелия при микрососудистом тромбозе может не только локально распространяться в легких, но и распространять системную воспалительную реакцию, вовлекающую микрососудистое русло почек, головного мозга и других жизненно важных органов [15].

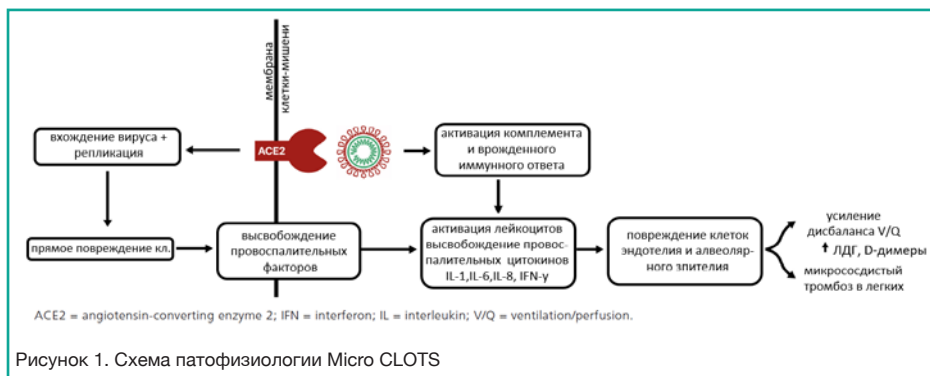


Рисунок 1. Схема патофизиологии Micro CLOTS

Исследование газов артериальной крови с определением PaO₂, PaCO₂, pH, бикарбонатов и лактата для госпитализированных пациентов при наличии признаков ОДН (SpO₂ менее 90 % по данным пульсоксиметрии): могут наблюдаться гиперкапния (повышение уровня углекислого газа) и гипоксемия (снижение уровня кислорода в крови и его количество, доставляемое к тканям) [2].

3.3. Дифференциальная диагностика COVID-19

У пациентов с COVID-19 возможно сочетание с другими респираторными вирусными и бактериальными инфекциями. Таким образом, выявление другого вируса не исключает COVID-19. В таких случаях, и при наличии оснований, необходимо тщательное микробиологическое и вирусологическое обследование. Образцы из ВДП и НДП исследуют на вирусы гриппа А и В (в том числе – зоонозный грипп А), респираторный синцитиальный вирус, вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, энтеровирусы (например, EVD68), человеческий метапневмовирус и эндемические человеческие коронавирусы (например, HKU1, OC43, NL63, and 229E). Целесообразно исследовать образцы из НДП на бактериальные патогены, в том числе – пневмофильную легионеллу [2].

3.4. Обнаружение вторичных бактериальных или грибковых инфекций при COVID-19

Пациенты в тяжелом или критическом состоянии подвержены риску развития вторичных бактериальных или грибковых инфекций. Следует квалифицированно собирать образцы в очаге инфекции для бактериологического исследования на грибы. При подозрении на вторичную легочную инфекцию рекомендовано исследовать образцы из нижних дыхательных путей (мокроты, трахейных аспиратов, бронхоальвеолярного лаважа). У пациентов с высокой температурой следует своевременно брать кровь на стерильность. У пациентов с подозрением на сепсис, которым был установлен постоянный катетер, следует брать кровь на бакпосевы из периферических внутривенных катетеров [9].

3.5. Порядок выполнения этиологической лабораторной диагностики COVID-19

Для пациентов взятие и исследование мазков из носа и ротоглотки в день обращения проводится по решению врача. Обследование пациентов в амбулаторных условиях выполняют по утвержденному алгоритму: взятие мазка из носа и ротоглотки на исследование методом амплификации нуклеиновых кислот осуществляют в 1-й, 3-й и 11-й дни после обращения.

При помещении пациента в стационар обязательно исследование трех образцов биологических материалов, собранных в течение первых трех дней после появления симптомов заболевания. Для выявления COVID-19 исследуются респираторные диагностические материалы пациента (мазки из носоглотки и ротоглотки, мокрота, эндотрахеальный аспират, бронхоальвеолярный лаваж; могут быть исследованы: кровь (сыворотка, цельная кровь), кал).

Взятие венозной крови для серологического исследования на антитела к SARS-CoV-2 выполняют 2 раза: в острую фазу (первая неделя болезни) и через 2 недели после острой фазы.

При выполнении методов специфической диагностики SARS-CoV-2 лабораторный персонал должен соблюдать «принцип парности»: все виды работ с биоматериалом, предположительно и/или содержащим вирус, проводят не менее двух человек, один из которых – врач или научный сотрудник. Время непрерывной работы с таким материалом ограничено до 4 часов, после которых положен 30–60-минутный перерыв [11].

3.6. Специфическая диагностика SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот

3.6.1. Целевые мишени SARS-CoV-2 для специфической диагностики COVID-19 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.

В качестве целевой мишени SARS-CoV-2 используют гены вируса, кодирующие белки: нуклеокапсидный (N), оболочечный (E), шиповидный Spike-протеин (S), РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP) и ORF1ab [9]. Различные РНК-мишени вируса используются разными производителями тест-систем, при этом большинство тестов нацелено на один или более генов.

3.6.2. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (rRT-PCR/ОТ-ПЦР – золотой стандарт в диагностике COVID-19) применяется для рутинного подтверждения случаев заболевания, основана на обнаружении уникальных последовательностей вирусной РНК.

Процедура этапов тестирования ОТ-ПЦР (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- экстракция тотальной РНК из клинического материала;
- реакция обратной транскрипции (получение кДНК на матрице РНК);
- амплификация кДНК SARS-CoV-2 методом ПЦР с гибридизационно – флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»;

- анализ и интерпретация результатов (положительный тест на гены-мишени SARS-CoV-2).

Одновременное обнаружение нуклеиновых кислот в нескольких видах образцов у одного пациента может повысить точность диагностирования. Так, например, у пациентов с положительным результатом ПЦР на РНК SARS-CoV-2 в образцах из дыхательных путей примерно в 30–40 % случаев обнаружена вирусная РНК в крови, а в 50–60 % случаев – в кале. Образцы мочи не информативны для ПЦР-исследования, т. к. коэффициент позитивности в диагностике COVID-19 ничтожно низок.

Комплексное тестирование разных типов образцов (из дыхательных путей, кала, крови и др.) от одного пациента помогает повысить диагностическую чувствительность в случае подозрения на болезнь, улучшить контроль за эффективностью лечения и изоляционными мероприятиями после выписки [9].

У большинства пациентов с выраженными симптомами инфекции COVID-19 вирусная РНК в мазке из носоглотки обнаруживается уже в первый день появления симптомов и достигает пика в течение первой недели после появления симптомов. «Позитивность» результата начинает снижаться к третьей неделе, и впоследствии вирусная нагрузка становится неопределяемой. Тем не менее отмечено, что у госпитализированных пациентов с тяжелой формой течения заболевания уровень «позитивности» результата выше, чем у пациентов с легким течением, и эта «позитивность» в ПЦР может сохраняться более трех недель после начала заболевания, когда у большинства пациентов с легким течением результат становится отрицательным. При этом нельзя забывать, что «положительный» результат ПЦР отражает только обнаружение вирусной РНК и не подтверждает наличие жизнеспособного вируса.

Продолжительность «позитивности» ПЦР в пробах с биоматериалом из верхних дыхательных путей отличается от проб с другим биоматериалом. «Позитивность» ПЦР снижается медленнее в мокроте и может оставаться положительной после отрицательного результата ПЦР в мазке из носоглотки. В одном из исследований описано, что «позитивность» ПЦР в кале наблюдалась у 55 из 96 (57 %) инфицированных пациентов и продолжала сохраняться в среднем от 4 до 11 дней после негативации результата ПЦР в пробе с биоматериалом из носоглотки, причем корреляция с клинической тяжестью течения заболевания отсутствовала. Отмечено, что сроки выявления РНК вируса методом ПЦР в образцах мокроты и кала сходны [16].

В исследовании 205 пациентов с подтвержденной новой коронавирусной инфекцией COVID-19 положительные результаты ОТ-ПЦР были самыми высокими в бразцах бронхоальвеолярного лаважа (93 %), за которыми следовали мокрота (72 %), мазок из носа (63 %) и мазок из глотки (32 %) [17].

Кинетика РНК в диагностике COVID-19 на текущий период времени:

- пациенты с COVID-19 имеют более высокую вирусную нагрузку до развития

симптомов, инфекция выявляется у первоначально бессимптомных пациентов из образцов верхних дыхательных путей еще до появления симптомов (в среднем за 2 дня с пиком за день) и максимально часто в самые первые дни – до 5 дней;

- в большинстве случаев симптомы ослабевают к концу первой недели, вирусная РНК из образцов глотки может присутствовать в течение второй недели, но начиная с 8-го дня отсутствует корреляция между выявлением РНК вируса из образца носоглотки и его инфекционной способностью в культуре клеток *in vitro*, поэтому рекомендовано вирусную РНК из носоглотки выявлять с 1-го по 7-й день от начала появления симптомов;
- вирусная РНК выявляется в кале, мокроте и другом биоматериале, в них РНК может оставаться положительной более 3 недель, даже при полном исчезновении симптомов;
- вирусная РНК не выявляется в моче [18].

Несмотря на то что специфичность большинства тестов ОТ-ПЦР составляет приблизительно 100 % (структура праймера специфична для последовательности генома SARS-CoV-2), не исключена возможность получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

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

- правильность выбора биоматериала для исследования (наиболее информативен из нижних дыхательных путей), уровень инфекционной нагрузки образца с биоматериалом, т. к. на различных стадиях заболевания распределение вирусной нагрузки разное, имеется специфическая разница в инвазии вируса в различные органы;
- нарушение требований преаналитического этапа ПЦР-анализа (условий и правил взятия биоматериала в соответствующую транспортную среду, маркировки и регистрации проб, соблюдения температурного режима хранения, транспортировки, временного режима доставки проб к месту исследования от момента взятия биоматериала и др.), т. к. РНК SARS-CoV-2 нестабильна и легко разрушается;
- нарушение требований аналитического этапа ПЦР-анализа (инструкции выполнения исследования, соблюдения температурного режима амплификации), чувствительность и специфичность 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 выполнении исследования;
- контаминации реагента;
- контаминации проб;
- технические ошибки.

3.6.3. Геномное секвенирование (NGS) SARS-CoV-2 показывает его высокую гомологичность к известным новым коронавирусам. Регулярное определение последовательности вируса в образцах из клинических материалов может быть полезным для мониторинга мутаций вирусного генома, способных повлиять на эффективность диагностических тестов, и указывает на наличие различных генотипов вируса в образцах верхних и нижних дыхательных путей пациента.

Для пациентов с подозрением на COVID-19, в дополнение к традиционному ПЦР-анализу, используют стратегию макрогеномного обнаружения (mNGS), основанную на технологии секвенирования второго поколения, с непосредственным извлечением нуклеиновых кислот всех микроорганизмов в зараженных образцах для высокопроизводительного секвенирования. Путем сравнения специальной микробной базы данных с интеллектуальным алгоритмом анализа получают информацию о видах подозреваемых патогенных микроорганизмов и одновременно обнаруживают различные респираторные патогены, включая вирус SARS-CoV-2, обеспечивая более точную и всестороннюю картину заражения.

Краткая схема технологии секвенирования:

- экстракция нуклеиновых кислот из образца биоматериала,
- высокопроизводительное секвенирование,
- биоинформационный анализ,
- получение результатов тестирования, их интерпретация.

Положительным считают результат при обнаружении относительного числа копий хотя бы одной специфической последовательности РНК SARS-CoV-2 в образцах носоглотки или мокроты.

Секвенирование генома показало различие генома вируса, выделенного из отделяемого носоглотки и из легких, что, возможно, объясняет независимую репликацию вируса в верхних и нижних дыхательных путях [18].

3.6.4. Петлевая изотермальная амплификация / RT-LAMP (reverse transcription-coupled – Loop-Mediated Isothermal Amplification) (синтез нуклеиновых кислот с вытеснением цепи). Предназначена для качественного выявления РНК

коронавируса SARS-CoV-2 в образцах, полученных из назальных и/или фарингеальных мазков, или раствора бронхоальвеолярного лаважа.

Используется для выявления РНК коронавируса у лиц с симптомами ОРВИ и контактировавшими с заболевшими COVID-19, независимо от возраста, а также у лиц без признаков ОРВИ в очагах инфекции / в условиях распространения инфекции с целью раннего выявления коронавируса для предотвращения дальнейшего распространения инфекции.

Процедура этапов тестирования (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- экстракция РНК коронавируса SARS-CoV-2 из анализируемых образцов;
- петлевая изотермальная амплификация при постоянной температуре 60–65 °С, 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.

3.7. Специфическая диагностика вируса SARS-CoV-2 культуральным методом

Выделение и культивирование вируса не рекомендуется в качестве обычной диагностической процедуры, должно осуществляться в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение на возможность проведения работ с ПБА I–II группы патогенности.

Для выявления возбудителей пневмонии взятие образцов крови и образцов из дыхательных путей на бактериологический посев осуществляют до начала антибактериальной терапии.

Краткое описание процедуры:

- культивирование вируса: взятые у пациента свежие образцы мокроты, кала и др. инокулируют в клетках Vero-E6;
- наблюдают цитопатический эффект (ЦЭ) через 96 часов;
- обнаружение РНК SARS-CoV-2 в культуральной среде (свидетельствует об успешном культивировании);
- определяют инфекционный титр вируса после последовательного растворе-

ния вирусного посевного материала в 10 раз TCID50 микроцитопатическим методом (наибольшее разведение, которое вызывает цитопатический эффект в 50 % зараженных клеточных культур), либо подсчетом числа бляшкообразующих единиц (БОЕ) [9].

При культуральном исследовании мазков со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки некоторых пациентов, у которых вирус определялся в ПЦР с вирусной нагрузкой ниже 10^5 копий на образец после 10-го дня от начала заболевания, показана низкая способность передачи вируса другим в эти дни [20,21,22,23]. Начиная с 6-го дня после появления симптомов COVID-19 из-за отсутствия роста вируса в культуре клеток доказано отсутствие контагиозности вируса SARS-CoV-2 в этот период. Несмотря на участие небольшого количества пациентов в этом исследовании и на отрицательный результат в культуральном методе по сравнению с ПЦР, эти данные были приняты во внимание международным научным сообществом для установления сроков контагиозности заболевания [24,25].

Отмечено, что у пациентов с легким течением COVID-19 после первой недели от начала появления симптомов вероятность заразить других людей SARS-CoV-2 очень низкая, даже если вирус продолжает выявляться в ПЦР [23], что, вероятно, обусловлено иммунной реакцией организма. Кроме того, показано, что у пациентов с более тяжелым клиническим течением заболевания вирусная нагрузка до 60 раз выше, чем у пациентов с легким течением, поэтому период выделения вируса у них более продолжителен. У 191 пациента, которым потребовалась госпитализация, средняя продолжительность выделения вируса была 20 дней (интерквартильный интервал 17–24), максимально до 37 дня [26].

3.8. Специфическая диагностика антигена SARS-CoV-2 методом иммунохроматографии с последующей визуальной либо приборной (флуоресцентной) детекцией

На текущий период времени тесты такого рода только начинают использоваться, поэтому конкретные данные об эффективности их применения отсутствуют. По аналогии с экспресс-тестами, используемыми для диагностики других респираторных инфекций, в частности, гриппа, можно рассчитывать, что они будут выявлять антиген SARS-CoV-2 в течение первых 3–5 суток после появления симптомов. Меньшая, по отношению к методам амплификации нуклеиновых кислот, ожидаемая чувствительность этих экспресс-тестов не позволит их применять для скрининга. Однако возможность быстрого (в течение 20 минут) получения результата, при высокой специфичности, позволит идентифицировать носителя инфекции в случае получения положительного результата и приступить к соответствующим лечебным и эпидемиологическим мероприятиям. Отрицательный результат такого экспресс-теста должен быть обязательно перепроверен в исследовании методом амплификации нуклеиновых кислот.

3.9. Специфическая диагностика сывороточных антител IgM, IgA и IgG к SARS-CoV-2

Инфекция COVID-19 также может быть обнаружена косвенно – путем измерения иммунного ответа хозяина на вирус SARS-CoV-2. Серологическая диагностика особенно важна для пациентов с легкой и средней тяжестью течения заболевания, которые могут обратиться за помощью по прошествии двух недель от начала заболевания. Серологическая диагностика – важный инструмент для оценки распространенности COVID-19 в сообществе и выявления людей, которые являются иммунизированными и потенциально «защищены» от заражения.

Серологические исследования целесообразны:

- с диагностическими целями: если ПЦР-исследование не проводилось или дало отрицательный либо неопределенный результат, при сохраняющемся подозрении на COVID-19 (определение IgM, IgG, IgA);
- для оценки уровня антител к вирусу у медицинского персонала, работающего с больными COVID-19 (определение IgM, IgG, IgA);
- в эпидемиологических исследованиях: для обследования популяции с целью определения доли переболевших, перенесших инфекцию без симптомов, не контактировавших с возбудителем (определение IgG);
- при разработке, испытаниях и контроле эффективности вакцин (определение IgG);
- результаты серологических тестов помогают идентифицировать потенциальных доноров реконвалесцентной плазмы (один из методов лечения тяжелых больных COVID-19) [18].

3.9.1. Целевые мишени SARS-CoV-2 для специфической диагностики COVID-19 серологическими методами

В качестве целевой мишени SARS-CoV-2 на текущий период времени используют белки вируса: нуклеокапсидный (N), мембранный (M), оболочечный (E), различные формы шиповидного Spike-протеина (S). Именно белковые мишени определяют кросс-реактивность и специфичность. Так, например, белок N является более консервативным среди коронавирусов, чем S, а среди S более консервативна его форма RBD. Различные белковые мишени вируса используются разными производителями тест-систем, при этом большинство тестов нацелено на один или более белков [18].

3.9.2. Методы определения сывороточных антител для выявления вирусных белков:

- Point-of-care (POC), «прикроватные» тесты с использованием метода ИХА (RDT(боковой поток)/иммунохроматографический анализ), в них могут выяв-

ляться IgG или IgG и IgM, или общие антитела в сыворотке, плазме, цельной крови и/или слюне. Важные преимущества – возможность использования капиллярной крови, быстрое исполнение;

- лабораторные тесты методами ELISA/ИФА (иммуноферментный анализ) и CLIA/ИХЛА (иммунохемилюминесцентный анализ) для выявления антител требуют обученного персонала и специального оборудования. В зависимости от реагентов выявляют антитела IgG, IgM и IgA или комбинированные общие антитела. Используются в лабораторных условиях, обеспечивая высокий уровень качества. Незаменимы при массовом скрининге. Существуют разнообразные решения, варьирующие по аналитическим характеристикам чувствительности и специфичности, уровня автоматизации, операционной эффективности, производительности, скорости выдачи результатов, подключению к информационным решениям и пр.

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 SARS-CoV-2 являются качественными (т. е. интерпретируются как «положительный» или «отрицательный»), даже если результат пропорционален количеству выявляемого анализата [18].

По имеющимся данным, антитела класса IgM, IgA и IgG могут определяться начиная с 5–10-го дня после появления симптомов. Исследования сероконверсии (динамики появления разных классов антител) по отношению к SARS-CoV-2 только начали проводиться. На основании имеющихся данных можно утверждать, что потенциальное диагностическое значение имеют все три класса антител. Антитела класса IgM при ответе на инфекцию обычно появляются на несколько дней раньше других. Антитела класса IgA образуются параллельно с IgG и характеризуют местный иммунитет, их выявляют в секрете слизистых оболочек, где они могут продуцироваться в больших концентрациях во время инфекционного процесса, но их роль в данном заболевании еще предстоит изучить [18]. По первым имеющимся данным, при COVID-19 в начале сероконверсии концентрация (титр) антител IgA может превышать уровень антител IgG. Совместное определение антител IgG и IgA увеличивает диагностическую чувствительность анализа [19].

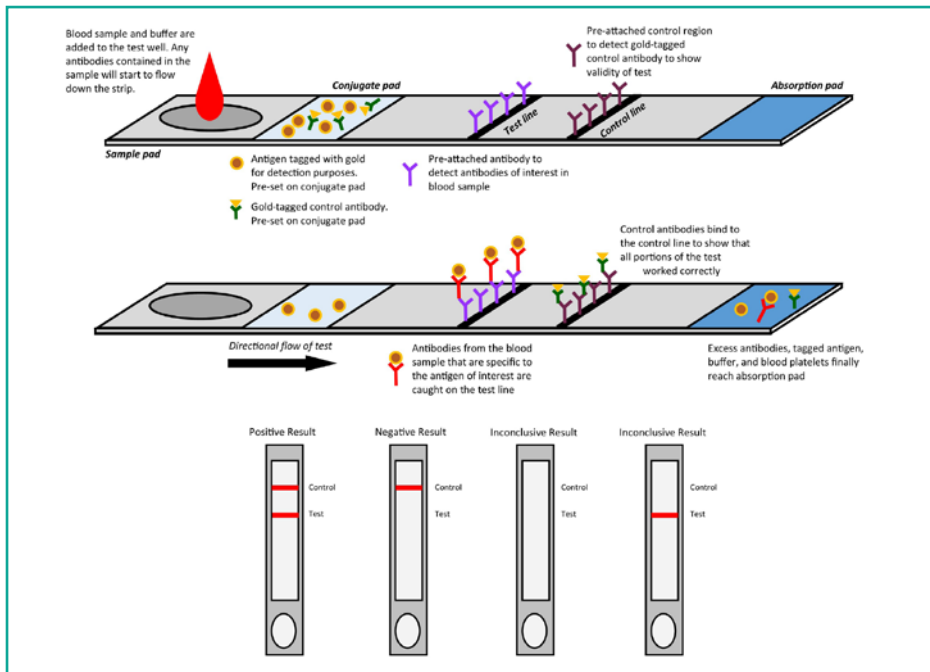
3.9.2.1. «Экспресс-тесты» (иммунохроматографические) нашли широкое применение в местах оказания медицинской помощи, используются в диагностике COVID-19 для качественного выявления антител и указывают только на наличие или отсутствие антител IgM и IgG против SARS-CoV-2. Портативность тест-кассеты и быстрота исполнения (результат в течение нескольких минут) делают эти тесты привлекательными для использования в point-of-care, начиная с 3-го дня появления симптомов заболевания [18].

Процедура тестирования (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ) представляет собой качественный мембранный иммуно-

анализ для выявления антител IgG и IgM к COVID-19 в пробах цельной крови, сыворотки или плазмы:

- 1 полную каплю (примерно 20 мкл) пробы внести в ячейку для проб (S);
- добавить 2 капли буфера (примерно 80 мкл);
- запустить таймер;
- учет результата.

Тест содержит нечеловеческий IgM и нечеловеческий IgG в качестве реагента для захвата и антиген COVID-19. В системе контрольной линии используется козий IgG. Во время тестирования проба реагирует с частицами, покрытыми антигеном COVID-19, в тест-кассете. Затем смесь с комплексами «антиген–антитело» перемещается по тестовой полоске. Если проба содержит антитела IgM к COVID-19, комплекс конъюгат–образец реагирует с нечеловеческим IgM. В результате в области тестовой линии IgM проявится цветная линия. Таким образом, если проба содержит антитела IgG к COVID-19, в области тестовой линии IgG проявится цветная линия. Если проба не содержит антител к COVID-19, цветная линия не проявится ни в одной из областей тестовой линии, что указывает на отрицательный результат. Для контроля процедуры тестирования в области контрольной линии всегда будет проявляться цветная линия, указывающая на то, что был использован правильный объем пробы и произошло его впитывание мембраной.



Результаты иммунохроматографического теста не должны использоваться в качестве единственного критерия для диагностики инфекции COVID-19 [19].

3.9.2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA) в диагностике COVID-19 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 SARS-CoV-2.

Процедура тестирования на антитела класса IgM основана на двухстадийном capture – варианте твердофазного иммуноферментного анализа (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- первый этап: связывание содержащихся в анализируемом образце антител класса IgM с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgM человека;
- второй этап: связавшиеся антитела класса IgM к SARS-CoV-2 взаимодействуют с конъюгатом рекомбинантного антигена SARSCoV-2 с пероксидазой хрена. При инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся иммунные комплексы. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации выявляемых IgM антител к SARS-CoV-2 в анализируемом образце. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты анализа регистрируются измерением оптической плотности в лунках планшета. 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.

Процедура тестирования на антитела класса IgG основана на двухстадийном «непрямом» варианте твердофазного иммуноферментного анализа (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- первый этап: специфические антитела (в том числе IgG) связываются с иммобилизованным на поверхности лунок планшета рекомбинантным антигеном SARS-CoV-2;
- второй этап: конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена взаимодействует с комплексами «антиген–IgG». При инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген–IgG–конъюгат».

Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к SARS-CoV-2 в анализируемом образце. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты анализа регистрируются измерением оптической плотности в лунках планшета. Учет результата (см. как Процедура тестирования на антитела класса IgM).

3.9.2.3. Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА) является аналогом ИФА. В диагностике COVID-19 привлекателен тем, что, предположительно, позволяет определить количественный уровень содержания антител IgM или IgG к штамму SARS-CoV-2 коронавируса в клиническом образце (сыворотке, гепаринизированной или цитратной плазме) на автоматизированных анализаторах. Принцип реакции: двухстадийный сэндвич-метод. В реакционную систему входят субстрат, окислитель, фермент-катализатор.

В качестве метки обычно используют фермент-катализатор (пероксидаза, микропероксидаза (фрагмент цитохрома C)), чувствительность метода в данном случае оценивается в 10–13 М антигена, или молекулы субстрата (изолюминол, эфиры акридина), чувствительность метода в данном случае оценивается в 10–12 М или до 0,2 пг антигена для изолюминола, до 10–18 М антигена для эфиров акридина.

Процедура тестирования с использованием в качестве метки «фермента-катализатора» (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- Первый этап: в реакционную ячейку дозируются определенные количества образца, раствора для обработки образца, парамагнитных микрочастиц, покрытых SARS-CoV-2 антигеном в буфере с консервантами, затем инкубация, в результате антитела к SARS-CoV-2, присутствующие в образце, связываются с SARS-CoV-2 антигенами, иммобилизованными на поверхности микрочастиц. Микрочастицы захватываются магнитом, в то время как несвязанные вещества удаляются путем промывки. После промывки в реакционную ячейку дозируются раствор разбавителя, конъюгат щелочной фосфатазы с моноклональными мышинными античеловеческими антителами в буфере с консервантами. При инкубации конъюгат щелочной фосфатазы с моноклональными мышинными античеловеческими антителами связывается с комплексом парамагнитных частиц и SARS-CoV-2 антителами. Микрочастицы захватываются магнитом, в то время как несвязанные вещества удаляются путем промывки.
- Второй этап: в реакционную ячейку добавляется раствор субстрата. Разложение субстрата катализируется конъюгатом щелочной фосфатазы с моноклональными мышинными античеловеческими антителами иммунокомплекса, оставшегося на микрочастицах. Полученная хемилюминесцентная реакция измеряется в относительных световых единицах (ОСЕ) при помощи встроенного фотоумножителя. Количество SARS-CoV-2 антител в образце пропорционально количеству относительных световых единиц (ОСЕ), образованных в ходе реакции. Концентрация SARS-CoV-2 антител определяется по калибровочной кривой.

Процедура тестирования с использованием в качестве метки «молекул субстрата» (по приведенным инструкциям в наборах, имеющих РУ на территории РФ):

- первый этап: образец смешивается с парамагнитными частицами, сенсibilизированными с антигеном SARS-CoV-2. Реакционная смесь промывается от несвязавшихся антител.
- второй этап: добавляется акридин-меченый конъюгат к IgG антителам человека. После промывки добавляются претриггерные и триггерный растворы. Получаемая в результате хемилюминесцентная реакция измеряется в относительных световых единицах. (RLU). Между количеством антител к SARS-CoV-2, присутствующими в образце, или RLU, детектированными оптикой системы, существует прямая зависимость. Данное соотношение отражено в коэффициенте реактивности (S/C), т. е. отношением сигнала образца (S) к пороговому значению (C).

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, IgA, 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 SARS-CoV-2 указывает на то, что существует стимуляция антигена, но не обязательно инфекционное заболевание, поэтому этот метод является эффективным дополнением к обнаружению нуклеиновых кислот и является лишь косвенным доказательством заболевания COVID-19.

Во время диспансерного наблюдения IgM к SARS-CoV-2 обнаруживали через 3–5–10 дней от начала заболевания, а IgG к SARS-CoV-2 – через 12 дней. По мере увеличения уровня сывороточных антител вирусная нагрузка постепенно уменьшается. Диагностическим критерием в фазе выздоровления считают выявление титра специфических антител класса IgG в ≥ 4 раза выше по сравнению с острой фазой, но при отрицательном результате в тесте амплификации нуклеиновых кислот [9].

Результаты исследования 140 пациентов свидетельствуют, что в диагностике COVID-19 при комбинированном применении двух методов – количественный ПЦР-анализ и ИФА/ИХЛА (IgM к нуклеокапсидному (NC) антигену), процент выявления больных составил 98,6 %, а при применении одного количественного ПЦР-анализа – 51,9 %. Отмечалось, что наибольший уровень «позитивности» результата ПЦР наблюдался в течение первых 5,5 суток от начала болезни, по истечении которых уже наблюдалось максимальное количественное содержание IgM. [9].

Кинетика гуморального ответа в диагностике COVID-19 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 [18].

3.9.3. Анализ «нейтрализации антител»

Наличие одних только антител не обязательно приводит к иммунитету, так как не все антитела могут нейтрализовать вирус. Защитный иммунитет состоит в иммунном ответе, который может защитить от SARS-CoV-2. Серологические тесты могут обеспечить информацию о качественном (да/нет) или количественном (титры) содержании антител к определенной части вируса. Однако способность антител предотвращать вирусную репликацию и защитить от инфекции определяется с помощью анализа нейтрализующей способности антител. Предварительные исследования показали, что у пациентов с COVID-19 вырабатывались антитела уже через 5 дней после заражения, и эти антитела сохранялись по крайней мере 49 дней после появления симптомов. В лабораторных условиях было обнаружено, что антитела пациентов с COVID-19 нейтрализуют вирус SARS-CoV-2, но как долго эти антитела сохраняются и действительно ли они защищают от реинфекции, на текущий период времени не изучено.

Анализ нейтрализующей способности антител является золотым стандартом для определения наличия у пациента эффективных антител и защитного иммунитета против COVID-19, т. к. дает количественную информацию о способности антител пациента придавать защитный иммунитет.

В сыворотке крови людей, иммунизированных или перенесших вирусное заболевание, обнаруживаются антитела, способные нейтрализовать инфекционные свойства вируса. Эти антитела выявляются при смешивании сыворотки с соответствующим вирусом и последующем введении этой смеси в культуру клеток. На основании отсутствия цитопатического действия вируса судят о нейтрализующей способности антител. Эта реакция в условиях *in vitro* широко используется в вирусологии для определения вида или типа вируса и титра нейтрализующих антител.

Метод исследования трудоемкий, по времени занимает до 5 дней, не рекомендуется в качестве обычной диагностической процедуры. Исследование проводят в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение на возможность проведения работ с ПБА I–II группы патогенности, т. к. в ходе исследования используется суспензия живого или рекомбинантного вируса. Если в анализе нейтрализующих антител используется рекомбинантный псевдовирс, то методика может выполняться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на возможность проведения работ с ПБА III–IV группы патогенности.

Нейтрализующая способность сыворотки пациента против вируса может быть определена количественно. Краткая схема выполнения исследования:

- из сыворотки крови пациента готовят серийные разведения (1:100, 1: 1000, 1:10000 и т. д.);
- к каждому серийному разведению добавляют одно и то же количество суспензии вируса одинаковой концентрации, затем перемешивают;
- серийные разведения сыворотки крови пациента, содержащие вирус и антитела, инкубируют, затем наносят на монослойные клетки хозяина;
- монослой клеток + вирусная суспензия + образец с разведением сыворотки покрывают агаром и инкубируют в течение нескольких дней;
- монослой клеток + только вирусная суспензия той же концентрации, что добавляли в серийные разведения, покрывают агаром и инкубируют несколько дней;
- через несколько дней на чашке появляются единичные бляшки, образуемые вирусом, или небольшие участки без роста клеток (без налета);
- учет результата: разбавление, при котором концентрация антител способна уменьшить образование налета на 50 %, показывает, что у пациента су-

ществуют антитела, способные нейтрализовать дальнейшую вирусную активность.

В диагностике COVID-19 применяют 2 типа нейтрализационных тестов:

- вирус-нейтрализационный тест (VNT), такой как plaque-reduction neutralization (PRNT)/нейтрализация бляшкообразования или микро-нейтрализация, когда используется SARS-CoV-2 вирус из клинического изолята или рекомбинант SARS-CoV-2 expressing reporter proteins;
- псевдовироз-нейтрализационный тест (pVNT), при котором используется рекомбинантный псевдовироз (подобно vesicular stomatitis virus, VSV) с инкорпорированным S белком SARS-CoV-2 [19].

В ходе проведения вирус-нейтрализационных тестов в образцах сыворотки, взятых у 6 госпитализированных пациентов с умеренными симптомами заболевания в каждый из последующих дней пребывания в стационаре, начали выявлять низкие титры нейтрализующих антител лишь на 5-й день после появления симптомов, а повышенные нейтрализующие титры ($\geq 1/512$) стали выявлять начиная с 12-го дня. Это указывает на то, что исчезновение контагиозности вируса в назофарингеальных мазках (см. 3.7. «Специфическая диагностика вируса SARS-CoV-2 культуральным методом») является эффектом иммунной реакции с растущими уровнями нейтрализующих антител [27]. Результат анализа нейтрализации антител демонстрирует способность плазмы или сыворотки пациента, перенесшего COVID-19, оказывать нейтрализующее действие на вирус в условиях живой культуры *in vitro*. В настоящее время этот метод применяется главным образом для научных целей. В стадии изучения способность и титр антител сыворотки/плазмы пациента блокировать репликацию вируса в условиях *in vitro* [18].

4

Подход к созданию алгоритма лабораторного обследования на COVID-19

4.1. Характеристики теста для принятия решения о его использовании

При проведении любого клинического обследования, в том числе лабораторного, всегда существует вероятность того, что полученные результаты объективно не отразят наличие или отсутствие заболевания.

Наличие (или отсутствие) патологии устанавливается определенным референтным «эталонным» методом, называемым «золотой стандарт диагностики».

Известно, что ни один метод лабораторной диагностики, в том числе используемый в качестве эталона, не обладает 100 % чувствительностью и 100 % специфичностью и имеет свои ограничения.

В целях оценки пригодности того или иного диагностического лабораторного исследования относительно эталонного существуют такие критерии, как чувствительность и специфичность.

Чувствительность (sensitivity) определяется как доля лиц с заболеванием, у которых диагностический тест положителен.

Специфичность (specificity) – это доля лиц без заболевания, у которых диагностический тест отрицателен.

Для иллюстрации соотношений между результатами клинического теста и объективно существующей или не существующей патологией строят так называемую четырехпольную таблицу.

		Заболевание		
		Присутствует	Отсутствует	
Тест	Положительный	a	b	a+b
	Отрицательный	c	d	c+d
		a+c	b+d	

$$\text{Чувствительность (Se)} = a/(a+c)$$

$$\text{Специфичность (Sp)} = d/(b+d)$$

Чувствительный тест часто дает положительный результат при наличии заболевания (обнаруживает его). Его информативность особенно высока в том случае, когда он дает отрицательный результат, т. к. редко пропускает пациентов с заболеванием.

Специфичный тест редко дает положительный результат при отсутствии заболевания. Особенно информативен при положительном результате, т. к. подтверждает предполагаемый диагноз.

При анализе чувствительности и специфичности диагностического теста следует понимать, что:

- тест, имеющий высокую чувствительность, при отрицательном его результате исключает заболевание;
- тест, имеющий высокую специфичность, при положительном его результате подтверждает заболевание.

После проведения клинического теста (не обязательно только лабораторного) для получения ответа на основной вопрос – «болен ли обследуемый?» оценивают прогностическую ценность этого теста, т. е. вероятность наличия или отсутствия заболевания при известном результате исследования. Когда распространенность заболевания стремится к 0 %, прогностическая ценность положительного результата стремится к нулю, если же распространенность заболевания стремится к 100 %, прогностическая ценность отрицательного результата стремится к нулю. Таким образом, прогностическая ценность положительного результата отражает вероятность наличия заболевания при положительном (патологическом) результате теста, а прогностическая ценность отрицательного результата отражает вероятность отсутствия заболевания при отрицательном (нормальном) результате теста.

К факторам, определяющим прогностическую ценность теста, относят не только чувствительность и специфичность метода диагностики, но и распространенность заболевания в исследуемой популяции.

Распространенность (prevalence) определяется как отношение числа лиц с наличием заболевания ко всей исследуемой популяции. Распространенность характеризуют как:

- априорную (пре-тестовую) – вероятность выявления болезни до того, как стали известны результаты теста;
- апостериорную (пост-тестовую) – вероятность заболевания после того, как стали известны результаты теста.

Формула, связывающая чувствительность, специфичность и распространенность заболевания с прогностической ценностью положительного и отрицательного результата, выводится из теоремы Байеса, где:

- прогностическая ценность отрицательного результата: $-PV=c/c+d$;
- прогностическая ценность положительного результата: $+PV=a/a+b$;
- распространенность заболевания: $P=a+c/a+b+c+d$.

Чем чувствительнее тест, тем выше прогностическая ценность его отрицательного результата (т. е. возрастает вероятность того, что отрицательные результаты теста отвергают наличие заболевания). Наоборот, чем специфичнее тест, тем выше прогностическая ценность его положительного результата (т. е. возрастает вероятность того, что положительные результаты теста подтверждают предполагаемый диагноз).

Интерпретация прогностической ценности положительного или отрицательного результата теста меняется в зависимости от распространенности заболевания. Следует учитывать, что в популяции:

- с низкой вероятностью заболевания положительные результаты даже высокоспецифичного теста окажутся преимущественно ложноположительными, т. к. в такой популяции распространенность заболевания стремится к нулю, следовательно, прогностическая ценность положительного результата тоже стремится к нулю;
- с высокой вероятностью заболевания отрицательные результаты высокочувствительного теста, скорее всего, будут ложноотрицательными, т. к. в такой популяции распространенность заболевания стремится к 100 %, следовательно, прогностическая ценность отрицательного результата стремится к нулю.

В клинической практике для лабораторного обследования применяют, как правило, несколько лабораторных тестов.

Подходы к применению нескольких тестов:

- параллельный, при котором несколько тестов назначаются одновременно, причем положительный результат любого из них рассматривается в пользу наличия болезни, применяют при необходимости быстрой оценки состояния, например у госпитализированных больных, при неотложных состояниях или же у амбулаторных пациентов, прибывших для обследования на короткое время, обеспечивает более высокую чувствительность и большую прогностическую ценность отрицательного результата при данной распространенности заболевания, чем каждый тест в отдельности. С другой стороны, при таком подходе снижаются специфичность и прогностическая ценность положительного результата теста, т. е. уменьшается вероятность того, что заболевание будет пропущено;
- последовательный, при котором каждый новый тест назначается с учетом результатов предыдущего и для установления диагноза все тесты должны дать положительный результат, поскольку в случае отрицательного результата диагностический поиск прекращается, – такой подход предпочтителен в клинических ситуациях, не требующих быстрой оценки состояния больного, например в амбулаторной практике. При последовательном применении тестов повышаются специфичность и прогностическая ценность положительного результата, но снижаются чувствительность и прогностическая ценность отрицательного результата, в итоге положительный результат теста подтверждает наличие предполагаемой болезни, но одновременно возрастает риск пропустить заболевание. Последовательное применение тестов особенно полезно, когда ни один из имеющихся в распоряжении методов диагностики не обладает высокой специфичностью.

Обычно для того, чтобы получить достаточно надежный диагноз, приходится использовать несколько лабораторных тестов параллельно или последовательно [28].

4.2. Стратегии тестирования на COVID-19

В условиях текущей пандемии максимальные цифры специфичности, а соответственно, и положительного предсказательного значения в алгоритме тестирования являются ключевыми, поскольку общая распространенность антител в популяции скорее всего низкая. Например, если в популяции распространенность – 5 %, то тест с чувствительностью 90 % и специфичностью 95 % будет иметь положительное предсказательное значение 49 %, это означает, что только менее чем у половины обследованных, получивших положительный результат, он будет истинным. Совсем иначе выглядит ситуация при применении того же теста, но в популяции с распространенностью в 52 %, его положительное предсказательное значение – 95 %, что значит, что только у 1 из 20 человек с положительным результатом этот положительный результат будет ошибочным.

Стратегии для получения результата от скрининга:

- выбрать тест со специфичностью не ниже 99,5 % или выше, тогда будет получен хороший результат в популяции с распространенностью выше 5 %;
- фокусироваться на популяции с высокой распространенностью инфекции (высокая пре-тестовая вероятность), например на пациентах с подозрением или возможно перенесенным COVID-19;
- использовать алгоритм последовательного тестирования, когда пациентам, у которых получены первоначальные положительные результаты, проводят другой тест [18].

5

Алгоритм лабораторного обследования на COVID-19

5.1. Алгоритм лабораторного обследования для легких случаев COVID-19 (амбулаторное лечение):

1. Выявление ПНК SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная на две/три мишени генома вируса) (биоматериал из верхних дыхательных путей), скрининг методом ОТ-ПЦР/изотермальная амплификация (в 1-й, 3-й и 11-й дни после обращения);
2. Выявление ПНК SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная на две/три

мишени генома вируса) методом ОТ-ПЦР (биоматериал из верхних дыхательных путей), верификация сомнительного/положительного результата в скрининге;

3. Серологическое исследование на специфические антитела IgM, IgG, IgA либо суммарные в различных комбинациях к SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная не меньше чем на два белка вируса) (в острую фазу болезни + через 2 недели после острой фазы);
4. Маркеры воспалительной реакции COVID-19:
 - общий (клинический) анализ крови (при обращении + по показаниям);
 - биохимический анализ крови: АСТ, АЛТ, билирубин, креатинин и мочевины, ЛДГ, КФК, ферритин, общий белок, альбумин, глюкоза (по показаниям);
 - коагулологические исследования: протромбиновое время (протромбиновое отношение и % протромбина по Квику), МНО, АЧТВ, фибриноген (по показаниям);
 - копрограмма + кал на скрытую кровь (по показаниям).

5.2. Алгоритм лабораторного обследования для случаев средней тяжести COVID-19 (госпитализация):

1. Выявление РНК SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная на две/три мишени генома вируса) (биоматериал из верхних дыхательных путей/мокрота), скрининг методом ОТ-ПЦР/изотермальная амплификация (исследование трех образцов биологических материалов, собранных в течение первых трех дней после появления симптомов заболевания + в динамике);
2. Выявление РНК SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная на две/три мишени генома вируса) методом ОТ-ПЦР (биоматериал из верхних дыхательных путей/мокрота), верификация сомнительного/положительного результата в скрининге;
3. Дифференциальная диагностика наличия других респираторных вирусов **ОДНОКРАТНО**;
4. Серологическое исследование на специфические антитела IgM, IgG, IgA либо суммарные в различных комбинациях к SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная не меньше чем на два белка вируса) (в острую фазу + в динамике);
5. Маркеры воспалительной реакции COVID-19:
 - общий (клинический) анализ крови (1 раз в 2–3 дня);

- общий (клинический) анализ мочи (1 раз в 2–3 дня);
- копрограмма + кал на скрытую кровь (при поступлении + повтор по показаниям);
- коагулологические исследования: протромбиновое время (протромбиновое отношение и % протромбина по Квику), МНО, АЧТВ, фибриноген, D-димер (при поступлении + ежедневно + по показаниям);
- расширенный биохимический анализ крови, в том числе: АСТ, АЛТ, билирубин, креатинин и мочевины, миоглобин, тропонин, мозговой натрий-уретический пептид (BNP/NTpro-BNP), ЛДГ, КФК, ферритин, общий белок, альбумин, глюкоза (1 раз в 2–3 дня);
- исследование белков острой фазы: С-реактивный белок и прокальцитонин (при поступлении + повтор по показаниям);
- цитокины: IL-1, IL-6, IL-8, интерферон- γ и др. (при поступлении + по показаниям);
- исследование газов артериальной крови: PaO₂, PaCO₂, pH, бикарбонаты и лактат (по показаниям).

5.3. Алгоритм лабораторного обследования для тяжелых случаев COVID-19 (госпитализация в ОПИТ):

1. Выявление РНК SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная на две/три мишени генома вируса) (биоматериал из нижних дыхательных путей/кал), скрининг методом ОТ-ПЦР/изотермальная амплификация, исследование трех образцов биологических материалов, собранных в течение первых трех дней после появления симптомов заболевания + в динамике);
2. Выявление РНК SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная на две/три мишени генома вируса) методом ОТ-ПЦР (биоматериал из нижних дыхательных путей / кал), верификация сомнительного/положительного результата в скрининге;
3. Дифференциальная диагностика наличия других респираторных вирусов ОДНОКРАТНО;
4. Серологическое исследование на специфические антитела IgM, IgG, IgA либо суммарные в различных комбинациях к SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная не меньше чем на два белка вируса) (в острую фазу + в динамике);
5. Маркеры воспалительной реакции COVID-19:
 - общий (клинический) анализ крови (при поступлении + ежедневно + по показаниям);
 - общий (клинический) анализ мочи (при поступлении + ежедневно + по показаниям);

- копрограмма + кал на скрытую кровь (по показаниям);
- коагулологические исследования: протромбиновое время (протромбиновое отношение и % протромбина по Квику), МНО, АЧТВ, фибриноген, D-димер (при поступлении + ежедневно + по показаниям);
- расширенный биохимический анализ крови, в том числе: АСТ, АЛТ, билирубин, креатинин и мочевины, миоглобин, тропонин, мозговой натрий-уретический пептид (BNP/NTpro-BNP), ЛДГ, КФК, ферритин, общий белок, альбумин, глюкоза (при поступлении + ежедневно + по показаниям);
- исследование белков острой фазы: С-реактивный белок и прокальцитонин (при поступлении + в динамике);
- цитокины: IL-1, IL-6, IL-8, интерферон- γ и др. (при поступлении + в динамике);
- исследование газов артериальной крови: PaO₂, PaCO₂, pH, бикарбонаты и лактат (ежедневно + по показаниям).

5.4. Алгоритм лабораторного обследования для крайне тяжелых случаев COVID-19:

1. Выявление РНК SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная на две/три мишени генома вируса) (биоматериал из нижних дыхательных путей/кал), скрининг методом ОТ-ПЦР / изотермальная амплификация, исследование трех образцов биологических материалов, собранных в течение первых трех дней после появления симптомов заболевания + в динамике);
2. Выявление РНК SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная на две/три мишени генома вируса) методом ОТ-ПЦР (биоматериал из нижних дыхательных путей / кал), верификация сомнительного/положительного результата в скрининге;
3. Дифференциальная диагностика наличия других респираторных вирусов ОДНОКРАТНО;
4. Посев крови при риске развития вторичных бактериальных инфекций (по показаниям);
5. Посев образцов из очага инфекции при риске развития вторичных грибковых инфекций (по показаниям);
6. Серологическое исследование на специфические антитела IgM, IgG, IgA либо суммарные в различных комбинациях к SARS-CoV-2 (тест-система, ориентированная не меньше чем на два белка вируса) (в острую фазу + в динамике);
7. Маркеры воспалительной реакции COVID-19:
 - общий (клинический) анализ крови (при поступлении + ежедневно + по показаниям);

- общий (клинический) анализ мочи (при поступлении + ежедневно + по показаниям);
- копрограмма+ кал на скрытую кровь (по показаниям);
- коагулологические исследования: протромбиновое время (протромбиновое отношение и % протромбина по Квику), МНО, АЧТВ, фибриноген, D-димер (при поступлении + ежедневно + по показаниям);
- расширенный биохимический анализ крови, в том числе: АСТ, АЛТ, билирубин, креатинин и мочевины, миоглобин, количественный анализ на тропонин, мозговой натрий-уретический пептид (BNP/NTpro-BNP), ЛДГ, КФК, ферритин, общий белок, альбумин, глюкоза (при поступлении + ежедневно + по показаниям);
- исследование белков острой фазы: С-реактивный белок и прокальцитонин (при поступлении + в динамике);
- цитокины: IL-1, IL-6, IL-8, интерферон- γ и др. (при поступлении + в динамике);
- исследование газов артериальной крови: PaO₂, PaCO₂, pH, бикарбонаты и лактат (ежедневно + по показаниям).

6

Требования к выполнению этиологического лабораторного обследования на COVID-19

1. Всем пациентам с подозрением на COVID-19 своевременно, в максимально быстрые сроки организовать взятие и скрининговое исследование проб методом амплификации нуклеиновых кислот: у амбулаторных пациентов с биоматериалом из верхних дыхательных путей (мазок из носоглотки и ротоглотки); у стационарных пациентов с более тяжелой формой респираторного заболевания: образцы из нижних дыхательных путей (мокрота (если есть) и/или эндотрахеальный аспират/ или бронхоальвеолярный лаваж). Следует не забывать о высоком риске образования аэрозолей и строго придерживаться требований санитарно-эпидемиологического режима.
2. Скрининговое исследование выполнять в скрининговой лаборатории.
3. Верификацию (подтверждение) скринингового положительного/сомнительного результата на COVID-19 (при доставке образца биоматериала для подтверждения, строго соблюдать правила транспортировки) выполнять верификационным ОТ-ПЦР с применением валидированных тест-систем.

4. Верификационное исследование выполнять в соответствующей референс-лаборатории.
5. В популяции с высокой распространенностью заболевания использовать тест-системы, ориентированные на две/три разные мишени в геноме вируса SARS-CoV-2, а в популяции с низкой распространенностью заболевания допускается использование тест-системы, ориентированной на одну/две селективные мишени SARS-CoV-2.
6. Если отрицательный результат в ОТ-ПЦР/изотермальной амплификации получен у пациента с высокой вероятностью подозрения на вирусную инфекцию COVID-19, особенно если были исследованы только образцы из верхних дыхательных путей, следует собрать и исследовать дополнительные образцы, в том числе из нижних дыхательных путей, если это возможно.
7. В тех случаях, когда результаты амплификации нуклеиновых кислот отрицательны, а клинические симптомы заболевания присутствуют у пациента, с учетом напряженной эпидемиологической ситуации в отношении нового коронавируса заболевания диагноз косвенно подтверждается положительными результатами серологического исследования парных образцов сыворотки, взятых в острой фазе и в фазе выздоровления, но при выполнении главного условия: серологические исследования должны быть проведены только валидированными серологическими тестами, из-за возможной кросс-реактивности с другими коронавирусами.
8. В случае наличия клинической симптоматики ОРВИ или внебольничной пневмонии провести дифференциальную диагностику на наличие других респираторных патогенов. Причем скрининговое исследование методами амплификации нуклеиновых кислот на возбудитель COVID-19 выполнять независимо от того, обнаружен ли другой респираторный патоген.
9. Провести исследование на антитела IgG и IgM к SARS-CoV-2 в качественном или количественном варианте:
 - для госпитализированных пациентов с клиникой COVID-19 в тяжелой форме и соответствующей картиной КТ, но с отрицательным результатом в амплификации нуклеиновых кислот;
 - для уточнения диагноза у госпитализированных пациентов с клиникой COVID-19 в тяжелой форме, но с невыполненным исследованием на РНК в течение 7 дней от начала симптомов;
 - для нетяжелых симптоматических пациентов, подозрительных на COVID-19, находящихся под наблюдением с отрицательным результатом исследования на РНК, в качестве первичной диагностики;
 - для нетяжелых симптоматических пациентов, подозрительных на COVID-19, находящихся под наблюдением, но без выполненных ис-

следований методами амплификации нуклеиновых кислот в течение 7 дней после появления симптомов, с целью уточнения диагноза;

- для нетяжелых симптоматических пациентов с ранее перенесенным ОРВИ до этапа проведения амплификации нуклеиновых кислот, в качестве этиологической диагностики;
- медицинскому персоналу и работникам других служб наряду с действующими рекомендациями в дополнение к исследованию на наличие РНК вируса.

10. Серологические исследования должны быть валидированными, точными и качественными, из-за возможной кросс-реактивности с антигенными детерминантами других возбудителей, во избежание возникновения риска для здоровья пациента, искажения эпидемиологической ситуации и принятых ошибочных управленческих решений.

11. Процедуры выполнения всех лабораторных исследований должны включать выполнение как внешнего, так и внутреннего контроля качества для валидации функциональности исследования и контроля потенциальной контаминации.

12. Лаборатории должны строго соблюдать требования к отчетности [29].

7

Контроль качества лабораторных исследований на COVID-19

Для диагностики COVID-19 в России зарегистрировано большое количество наборов как для выявления РНК SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот (полимеразной цепной реакции в реальном времени и изотермальной амплификацией, с флуоресцентной детекцией и обратной транскрипцией), так и выявления антител методами иммуноферментного, иммунохемилюминесцентного и иммунохроматографического анализа, включая экспресс-тесты.

С целью оценки степени сопоставимости результатов исследований на COVID-19, выполняемых в различных учреждениях здравоохранения, и соответствия их установленным нормам аналитической точности Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК) на основе обработки результатов проведенных клинико-диагностическими лабораториями исследований образцов контрольных материалов, рассылаемых Центром внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований, проводит межлабораторные сличения по разделам:

- «Выявление РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР»;
- «Выявление антител IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2».

Основываясь на положениях стандарта ГОСТ Р ИСО 15189 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности», основной целью применения которого является признание результатов, на пункт 5.6.3. Межлабораторные сличения, подпункт 5.6.3.1. Участие. «Лаборатория должна участвовать в программе (программах) межлабораторных сличений (таких как программы внешней оценки качества или программы испытания профессиональной компетентности) соответственно исследованиям и интерпретациям результатов исследований».

Еще одним важным элементом комплекса мероприятий, направленных на обеспечение качества клинических лабораторных исследований, является внутрилабораторный контроль качества, который состоит в постоянном (повседневном в каждой аналитической серии) проведении контрольных мероприятий: исследовании проб контрольных материалов или осуществлении мер контроля с использованием проб пациентов. Целью внутрилабораторного контроля является оценка соответствия результатов исследований установленным критериям их приемлемости при максимальной вероятности погрешности и минимальной вероятности ложного отбрасывания результатов выполненных лабораторией аналитических серий.

В случае отсутствия аттестованного контрольного материала используют неаттестованный материал или сливные сыворотки. По полученным результатам рассчитывают: среднюю арифметическую результатата повторных измерений контрольного материала (\bar{X}), среднее квадратическое отклонение (S) и коэффициент вариации (CV). Если полученные значения величины относительного смещения (B) и коэффициент вариации (CV) не превышают их предельно допустимых значений, делают вывод о возможности использования рассматриваемой методики для целей лабораторной диагностики и переходят к построению и анализу контрольных карт по правилам Westgard. В случае превышения одним из полученных значений B или CV соответствующих предельно допустимых значений проводят дополнительную работу по устранению источников повышенного смещения или вариации.

Внутрилабораторный контроль качества обязателен в отношении всех видов исследований, выполняемых в лаборатории. Правила внутрилабораторного контроля качества количественных исследований содержатся в Приказе МЗ РФ № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На текущий период времени многие аспекты вируса SARS-CoV-2 и вызываемого им заболевания COVID-19 не изучены. Отсутствуют однозначные ответы на вопросы:

1. Какова вирусная динамика, оптимальные сроки забора образца и тип клинического материала для молекулярно-биологического исследования?
2. Какова связь между концентрацией вируса и тяжестью заболевания?
3. Какова продолжительность вирусывыделения и связь с клинической картиной (например, клиническое выздоровление происходит с вирусным клиренсом или выделение продолжается, несмотря на клиническое улучшение)?
4. Какова динамика иммунологического ответа?
5. Являются ли выявляемые антитела в серологических тестах вируснейтрализующими и какова динамика их эффективности и долгосрочности в защите от реинфекции?
6. Каков порог защитных антител, необходимых для истинной защиты от COVID-19?
7. Развивается ли феномен антитело-зависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE), который приводит к ухудшению течения COVID-19 при реинфекции у лиц с низким содержанием уровня антител, специфических к SARS-CoV-2? [30, 31, 32].
8. Какова роль клеточно-опосредованного иммунитета в контроле за SARS-CoV-2 и как количество Т-лимфоцитов (CD4+, CD8+ и др.) коррелирует с тяжестью заболевания? [19].

Кроме того, отсутствуют широкомасштабные сравнительные исследования населения доступными молекулярными и серологическими методами диагностики, из-за отсутствия в практическом доступе достаточного перечня валидированных, высокочувствительных и высокоспецифичных тест-систем для серологического исследования. В связи с этим, для совершенствования настоящих рекомендаций потребуются более полные данные.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Team NCPERC. Vital surveillances: the epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) – China. *China CDC Weekly*. 2020;2(8):113-22
2. Временные методические рекомендации МЗ РФ Версия 7 от 03.06.2020. «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».
3. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020. Epub 2020/02/28. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5. PubMed PMID: 32105632.
4. Письмо Минздрава России от 10.04.2020 № 17-1/И/1-2004 «О направлении Временной инструкции по вопросам забора биологического материала у всех пациентов с подозрением на пневмонию или с подтвержденной пневмонией, поступающих на госпитализацию в стационары».
5. Методические рекомендации МР 3.1.0169-20 (в редакции МР 3.1.0174-20 «Изменения № 1 в МР 3.1.0170-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», утверждены Роспотребнадзором 30.04.2020).
6. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (утверждены Роспотребнадзором от 28 января 2008 г. № 4).
7. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» (утверждены Роспотребнадзором от 28 ноября 2013 г. № 64).
8. Письмо Роспотребнадзора от 07.04.2020 № 02/6339-2020-32 «О направлении памятки по применению многоразовой защитной одежды при COVID-19».
9. Руководство по профилактике и лечению новой коронавирусной инфекции COVID-19. Первая академическая клиника Университетской школы медицины провинции Чжэцзян.
10. Методические рекомендации МР ДЗМ №28 от 04.07.2017 г. «Организация работы пунктов приема биологического материала».

11. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 22.05.2020. №15).
12. www.krasotaimedicina.ru/diseases/infectious/COVID-19
13. www.rmj.ru/articles/kardiologiya/koronavirusnaya-bolezn-covid-19-neispolzovannye-vozmozhnosti-terapii/#ixzz6KzFH4x2G
14. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2017; 377: 562-72
15. Fabio Ciceri, Luigi Beretta, Anna Mara Scandroglio, Sergio Colombo, Giovanni Landoni, Annalisa Ruggeri, Jacopo Peccatori, Armando D'Angelo, Francesco De Cobelli, Patrizia Rovere-Querini, Moreno Tresoldi, Lorenzo Dagna and Alberto Zangrillo *Crit Care Resusc.* 2020 Apr 15. [Epub ahead of print] PMID: 32294809
16. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020. Published online April 1, 2020. doi:10.1038/s41586-020-2196-xPubMedGoogle Scholar.
17. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA.* 2020. Published online March 11, 2020. doi:10.1001/jama.2020.3786 ArticlePubMedGoogle Scholar
18. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings, CDC (May, 2020), www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html
19. G. Gronvall et al. Developing a National Strategy for Serology (Antibody Testing) in the United States, Published on April 22, 2020, Johns Hopkins University
20. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med.* 19 de febrero de 2020;
21. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis.* 24 de febrero de 2020
22. To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S, Tam AR, Wu T-C, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 23 de marzo de 2020;
23. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 1 de abril de 2020;
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the EU/EEA and the UK – eighth update [Internet]. 2020 abr.

Disponibile en: www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-coronavirus-disease-2019-covid-19-pandemic-eighth-update

25. World health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 73 [Internet]. Disponible en: www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200402-sitrep-73-covid-19.pdf?sfvrsn=5ae25bc7_2
26. Liu Y, Yan L-M, Wan L, Xiang T-X, Le A, Liu J-M, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 19 de marzo de 2020
27. Wu F, Wang A, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv* [Internet]. 6 de abril de 2020 [citado 14 de abril de 2020];2020.03.30.20047365. Disponible en: www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.30.20047365v1
28. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины. М., Медиа Сфера, 1998. 352 с.
29. Global Surveillance for human infection with coronavirus disease (COVID-2019), Interimguidance, Geneva, World Health Organization, 2020. [www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](http://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)).
30. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol* 2013;158(7):1445-1459.
31. Tetro JA. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? *Microbes Infect* 2020;22(2):72-73.
32. Brian D. Quinlan, et al. // The SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits a potent neutralizing response without antibody-dependent enhancement. // *bioRxiv*, 12 April 2020; DOI: 10.1101/2020.04.10.036418

Методические рекомендации № 89

**ВРЕМЕННОЕ РУКОВОДСТВО
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ COVID-19
В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ**

Корректурa: Е. Н. Малыгина

Верстка: П. В. Жеребцов

Подписано в печать ???.2020 г.

Формат 60×84/16. Усл. печ. л. ???

Тираж 500 экз.

Заказ № ??

Отпечатано в ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ»

115088, Москва, ул. Шарикоподшипниковская, д. 9

Тел.: 8 (495) 530-12-89

www.niioz.ru



MOCKBA
2020