Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

3.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции

Методические рекомендации
МР 3.1.0117—17

Издание официальное

Москва • 2018

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

3.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции

Методические рекомендации
МР 3.1.0117—17

ББК 51.9
Л12

Л12 **Лабораторная** диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции: Методические рекомендации.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—48 с.

ISBN 978–5–7508–1607–1

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. Б. Ежлова, Ю. В. Демина, А. А. Мельникова), Федеральным бюджетным учреждением науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» (В. В. Малеев, Г. А. Шипулин, С. Б. Яцышина, И. Н. Манзенюк, Е. Н. Родионова).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 6 сентября 2017 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.9

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 08.02.18

Формат 60x84/16 Печ. л. 3,0

Тираж 100 экз. Заказ 7

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2018

Содержание

I. Общие положения и область применения 4
II. Введение 4
III. Описание метода 9
3.1. Принцип метода 9
3.2. Показания к применению метода 14
IV. Биологический материал для исследования 15
4.1. Перечень биологического материала для исследования 15
4.2. Методика получения биологического материала и условия хранения 16
4.3. Сбор биологического материала для ПЦР как предварительного теста с целью последующего выделения культуры вируса с использованием культурального метода 18
4.4. Маркировка материала для лабораторного исследования 19
4.5. Транспортирование материала для проведения ПЦР-исследования 20
V. Материально-техническое обеспечение 20
5.1. Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала 20
5.2. Расходные материалы и оборудование для проведения ПЦР-анализа 21
VI. Порядок работы 25
6.1. Предварительная обработка и подготовка биологического материала 26
6.2. Экстракция нуклеиновых кислот 28
6.3. Проведение реакции обратной транскрипции 32
6.4. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 33
6.5. Интерпретация и выдача результатов исследования при использовании амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 35
6.6. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией флуоресценции в формате «по конечной точке» 36
6.7. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией фрагментов амплификации ДНК методом электрофореза 38
VII. Организация внутрилабораторного контроля качества исследований 42
Нормативные ссылки 44
Термины и сокращения 45
Использованная литература 46

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

А. Ю. Попова

6 сентября 2017 г.

3.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ПРОФИЛАКТИКА
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции

Методические рекомендации
МР 3.1.0117—17

I. Общие положения и область применения

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

1.2. Методические рекомендации предназначены для специалистов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, медицинских организаций, научно-исследовательских организаций, осуществляющих диагностику и исследования возбудителей ОРВИ.

II. Введение

2.1. Заболеваемость острыми инфекциями верхних дыхательных путей множественной или неуточненной локализации и гриппом в Российской Федерации, по данным официальной статистики, в совокупности составляет 19—20 тыс. на 100 тыс. населения ежегодно. Дети дошкольного возраста подвержены ОРЗ в среднем 4—8 раз в год, школь-

ники – от 2 до 6 раз в год, взрослые – 2—3 раза в год. В контингентах часто болеющих детей эпизоды ОРЗ регистрируются от 10 до 12 раз в году. В 90 % случаев ОРЗ составляют ОРВИ, основные возбудители которых относятся к шести семействам вирусов. Геном большинства из них представлен молекулой РНК (ортомиксовирусы, парамиксовирусы, коронавирусы и пикорнавирусы), геном других состоит из молекулы ДНК (аденовирусы, парвовирусы).

2.2. Ведущее место среди острых инфекций дыхательных путей занимает грипп, возбудитель которого периодически вызывает пандемии, последняя из которых наблюдалась в 2009—2010 гг. Эпидемии гриппа охватывают от 5 до 20 % населения, приводят к госпитализации порядка 3 млн человек и вызывают до 250—500 тыс. летальных исходов в мире ежегодно. У взрослых больных гриппом в 10—15 % случаев развиваются осложнения, причем, 80 % из них приходится на пневмонию. При развитии пневмонии у детей вирусы гриппа обнаруживают в 7—22 % случаев. Возбудители гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, в котором выделяют три рода – *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* и *Influenzavirus C*, каждый из которых имеет по одному виду – *Influenza A virus, Influenza B virus* и *Influenza C virus*.

2.2.1. Вирусы гриппа А широко распространены в природе, их выделяют от большинства зверей и птиц, в связи с чем они имеют высокий пандемический потенциал, так как способны преодолевать межвидовые барьеры. Способность вирусов гриппа А к быстрому накоплению мутаций, изменяющих их антигенные свойства, лежит в основе их высокого эпидемического потенциала. Вирусы гриппа А в настоящее время дифференцируют (типируют) с помощью генетических методов на подтипы (или субтипы) в соответствии с генетической структурой: генов гемагглютинина – на 16 субтипов и нейраминидазы – на 9 субтипов. В 2013 г. при скрининге у летучих мышей в Центральной Америке и Перу были обнаружены новые субтипы вирусов гриппа, обозначенные как H17N10 и H18N11. Значительную обеспокоенность вызывает циркуляция в природе патогенных для человека вирусов гриппа птиц. Регистрируются крупные эпизоотии с заболеванием людей, вызванные вирусами гриппа субтипов H7 и H9 (Гонконг – H9N2, 1998—1999 гг., Нидерланды – H7N7, 2003 г.), в ряде случаев со смертельным исходом. С 2005 г. эпизоотии гриппа H5N1 повлекли за собой заболевания людей в десятке стран мира с летальностью 60 %. С 2013 года в Китае регистрируются случаи тяжелой пневмонии с летальным исходом у людей, инфицированных вирусом гриппа птиц субтипа A/H7N9. На 21 января 2014 г. ВОЗ сообщила о 209 лабораторно подтвержденных случаях инфицирования людей этим вирусом. Таким образом, на настоящее время актуален мо-

ниторинг вирусов гриппа, имеющих в геноме сегмент, кодирующий гемагглютинин субтипов H5, H7 и H9.

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

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

2.3. Помимо вирусов гриппа, причиной ОРВИ являются парамиксовирусы: респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, 4 вида вирусов парагриппа (1—4), коронавирусы 229E, OC43, NL63, HKUI, риновирусы (виды A, B, C), относящиеся к пикорнавирусам, аденовирусы (виды B, C, E), бокавирус человека, относящийся к парвовирусам. Все вышеперечисленные вирусы, за исключением бокавируса человека, вызывают ОРЗ среди всех возрастных групп. У лиц со сниженной активностью иммунной системы причиной ОРЗ могут быть также энтеровирусы, вирусы герпеса, цитомегаловирус. Дифференциальная диагностика гриппа и других ОРВИ возможна только с помощью лабораторных методов исследования.

2.3.1. Респираторно-синцитиальный вирус (hRSv, РС-вирус) является основным возбудителем бронхиолитов и пневмоний у младенцев и детей младшего возраста во всем мире. В группу риска тяжелого течения РС-инфекции входят недоношенные младенцы, дети до 2 лет, дети и взрослые с ослабленной вследствие заболеваний или лечения иммунной системой, пожилые люди (старше 65 лет). В годы эпидемической активности hRSv вызывает 30—40 % всех ОРВИ; при пневмонии у детей до 2 лет доля hRSv доходит до 40 %. С hRSv связывают формирование хронических бронхитов и бронхиальной астмы у 30 % детей, перенесших бронхиолит в течение первых 6 месяцев жизни.

2.3.2. Клинико-эпидемиологические исследования инфекции, вызванной метапневмовирусом (hMPv), впервые описанной в 2001 г., демонстрируют сходство клинической картины с RSv-инфекцией. Сероэпидемиологические исследования свидетельствуют о широкой распространенности hMPv, практически все дети серопозитивны к 5 годам жизни. От 5 до 25 % случаев госпитализаций с острой инфекцией нижних дыхательных путей детей младшего возраста составляет hMPv-инфекция. Основными диагнозами hMPv-инфекции у детей являются

бронхиолиты, пневмония и бронхиальная астма. У детей при пневмонии метапневмовирус обнаруживают, по данным исследователей различных стран, от 0,3 до 14,5 % случаев заболевания. В домах малютки и домах престарелых hMPv, как и hRSv, служат причиной групповых заболеваний, вызывая заболевания нижних дыхательных путей более чем у половины инфицированных и летальный исход у 11 % заболевших.

2.3.3. Вирусы парагриппа (hPiv) разделяют на 4 вида, относящиеся к двум родам: респировирусы (парагрипп 1 и 3) и рубулавирусы (парагрипп 2 и 4). Вирусы парагриппа часто обнаруживаются у детей младшего возраста. Ко второму году жизни каждый ребенок хотя бы один раз переболевает ОРЗ, вызванным вирусами парагриппа. hPiv 2 и 4 чаще обнаруживают у детей первого года жизни по сравнению с другими возрастными группами, где превалируют вирусы парагриппа 1 и 3. Доля hPiv в этиологической структуре ОРЗ составляет от 9 до 30 %. При этом, в этиологической структуре крупов у детей первых лет жизни вирусы парагриппа 1—4 занимают до 20 %. Среди детей с заболеваниями нижних дыхательных путей, госпитализированных в стационары, инфицированных hPiv в среднем около 22 %. Все это ставит вирусы парагриппа на второе место по частоте госпитализации и тяжести заболевания детей младшего возраста после РС-вируса.

2.3.4. Среди аденовирусов (hAdv) выделяют 7 видов: A, B, C, D, E, F, G. В зависимости от вида аденовирусы вызывают различные инфекционные заболевания: конъюнктивиты и кератоконъюнктивиты (A, D), острые диарейные заболевания (F), гастроэнтериты (G), крупы, гриппоподобные заболевания, бронхиты и пневмонии – B, C, E. Известны случаи бессимптомного носительства на протяжение нескольких месяцев hAdv в лимфоидной ткани верхних дыхательных путей. Будучи относительно устойчивыми к химическим и физическим воздействиям, hAdv могут длительное время сохранять стабильность в окружающей среде, в связи с чем часто вызывают вспышки в детских дошкольных учреждения, домах ребенка, домах престарелых и, прежде всего, в воинских частях. При этом заболевание может протекать со случаями пневмонии тяжелого течения и даже заканчиваться летальным исходом.

2.3.5. Коронавирусы (hCov) представляют собой большую разнообразную группу вирусов, которая классифицируется как альфа-, бета- и гамма-коронавирусы. Различные виды коронавирусов широко распространены в природе, вызывая различную инфекционную патологию у животных: гастроэнтериты и респираторные инфекции у свиней, инфекционный бронхит кур, энтериты у собак, инфекционный перитонит у кошек. Как показали исследования последних двух лет, летучие мыши инфицированы разнообразными альфа- и бета-коронавирусами.

2.3.5.1. У человека острую респираторную инфекцию вызывают 4 вида коронавирусов: 229E, OC43, NL63, HKUI, она чаще регистрируется у детей первого года жизни и протекает преимущественно в форме круп. У детей старшего возраста и у взрослых коронавирусная инфекция может протекать в виде гриппоподобного заболевания. При развитии пневмонии у детей коронавирусы обнаруживаются в 1,5—6,5 % случаев.

2.3.5.2. В настоящее время семейство коронавирусов включает 2 вида вирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию у людей: SARS-Cov (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus* или ТОРС-коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром) и MERS-Cov (*Middle East respiratory syndrome coronavirus* или БВРС-коронавирус, вызывающий Ближневосточный респираторный синдром). Коронавирус ТОРС вызвал эпидемию в 2003 году в 33 странах мира (наибольшее количество заболевших было зарегистрировано в Китае, Сингапуре и Канаде) с общим числом заболевших 7 761 человек, у 623 из них заболевание закончилось летальным исходом. Вирус SARS-Cov легко передается от человека к человеку. С сентября 2012 г. на Ближнем Востоке регистрируются случаи новой инфекции, вызванные коронавирусом MERS-Cov; к маю 2016 года инфицировано 1 728 человек, 624 из них умерли. Предполагают, что инфицирование людей происходит при контакте с верблюдами или с контаминированными вирусом объектами окружающей среды. Подтверждена способность MERS-Cov передаваться от человека к человеку, зарегистрированы вспышки внутрибольничной инфекции вызванной этим возбудителем в Южной Корее в 2015 году. Природным резервуаром обоих коронавирусов зоонозной природы являются летучие мыши.

2.3.6. Чаще других вирусов у больных ОРЗ всех возрастных групп выявляются риновирусы (hRv). HRv преимущественно вызывают воспаление слизистой оболочки верхних дыхательных путей, сопровождающееся ринореей и кашлем, заболевание нередко осложняется трахеитом.

2.3.7. Бокавирус (hBov), впервые описанный в 2005 г., обнаруживается со среднегодовой частотой 1,5—19 % (чаще у больных ОРЗ детей в возрасте до 5 лет и в 75 % случаев – до 2 лет), вызывая лихорадку, кашель, риниты и диарею. Помимо моноинфекции бокавирус часто обнаруживается в сочетании с другими вобудителями ОРЗ. При пневмонии у детей бокавирусы обнаруживаются в 4—15 % случаев. У взрослых бокавирус в редких случаях обнаруживается при пневмонии на фоне иммунодефицита.

2.3.8. Наиболее тяжело протекают острые инфекции дыхательных путей, вызванные респираторно-синцитиальным вирусом, метапневмо-

вирусом, вирусами парагриппа и коронавирусами, у детей в возрасте до 5 лет, пожилых и у лиц с иммунодефицитом.

III. Описание метода

3.1. Принцип метода

3.1.1. Полимеразная цепная реакция является прямым методом быстрой диагностики инфекционных болезней, позволяющим обнаруживать в качестве аналита специфичные для возбудителя инфекции участки его генома. Метод направлен на обнаружение нуклеиновых кислот вирусов и бактерий в различных типах биологического материала, характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет проводить стандартизацию процедуры исследования, контролировать процесс обработки материала на всех этапах. Высокая аналитическая чувствительность ПЦР обеспечивается за счет лежащей в основе метода амплификации – многократного увеличения количества фрагмента нуклеиновой кислоты возбудителя. Цикличность реакции достигается путем многократного (от 40 до 45 раз) последовательного повторения шагов инкубации реакционной смеси при температурах: 90—95 °С (денатурация ДНК/кДНК), 50—65 °С (отжиг праймеров), 60—72 °С (элонгация или синтез цепи ДНК).

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

3.1.3. Некоторые виды биологического материала требуют предварительной обработки, заключающейся в гомогенизации (например, секционный материал), снижении вязкости (например, густая и неоднородная по консистенции мокрота) и фракционировании путем центрифугирования.

3.1.4. Непосредственно ПЦР-исследование состоит из нескольких этапов:

– экстракция нуклеиновых кислот (РНК/ДНК) из исследуемых образцов исследуемого биологического материала;

– в случае если геном возбудителя состоит из РНК, требуется получение кДНК в реакции ОТ;

– амплификация ДНК (или кДНК) при помощи специфичных к гену-мишени праймеров и фермента Taq-полимеразы;

– детекция, анализ и интерпретация результатов.

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

3.1.6. Реакция обратной транскрипции может проводиться в двух вариантах: как отдельный этап или совмещенная с амплификацией. Если ОТ проводится отдельным этапом, для инициации синтеза кДНК на молекулах РНК используются гексамеры случайной последовательности (рэндом-праймеры), фермент обратная транскриптаза и другие специальные реагенты. В результате такой реакции образуется кДНК на основе матриц всех РНК, присутствующих в растворе, полученном на этапе экстракции нуклеиновых кислот из исследуемого образца. В случае если ОТ совмещена в одной реакции (программе) с ПЦР, реагенты для ОТ входят в состав подготовленной смеси для амплификации, к которой добавляют РНК; в результате образуется только кДНК, синтез которой инициируется участвующим в ПЦР праймером. Первый вариант более удобен при необходимости постановки большого количества ПЦР (более трех): в диагностических целях для обнаружения широкого спектра возбудителей для каждого пациента, при проведении эпидемиологического мониторинга, при расследовании случаев группового заболевания или выяснения этиологии тяжелого (атипичного) или летального случая, а также при необходимости последующего субтипирования положительных образцов (например, при гриппе).

По сравнению с РНК кДНК более стабильна, она может более длительно храниться без замораживания при температуре от 2 до 8 °С – в течение недели (при условии проведения ОТ в пробирках, имеющих специальную маркировку «*RNase-free*», «*DNase-free*», что означает «свободные от РНКаз и ДНКаз-ферментов, разрушающих РНК и ДНК», или подвергшихся автоклавированию), а также при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 6 месяцев или при температуре не выше минус 68 °С – в течение года. Допустимо однократное повторное замораживание кДНК. РНК следует использовать сразу после ее получения. При необходимости хранения РНК не позднее 30 мин после экстракции ее следует перенести в стерильные пробирки и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение месяца и более длительно при температуре не выше минус 68 °С, причем повторное замораживание РНК не допускается. Отдельный этап ОТ также удобен в случае подозрения на инфекцию, вызванную возбудителем второй группы опасности (ТОРС, высоко патогенный грипп птиц), когда манипуляции с биологическим материалом (предварительная обработка, экстракция НК) и ОТ проводятся в помещениях, оборудованных для работы с возбудителем второй группы опасности, а далее кДНК, при необходимости, может быть передана для проведения ПЦР в помещения, оборудованные для работы с возбудителями III—IV групп опасности.

3.1.7. Для диагностики ОРВИ применяются варианты ПЦР, различающиеся способом детекции фрагментов амплификации: ПЦР с детек-

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

3.1.8. С целью контроля качества проведения ПЦР необходимо использовать контрольные реакции, в которых участвуют положительные и отрицательные контрольные образцы для различных этапов ПЦР-анализа.

3.1.9. Анализ результатов различается в зависимости от варианта ПЦР. Для некоторых вариантов ПЦР требуется дополнительное оборудование (например, для разделения ДНК методом электрофореза, визуализации ДНК в агарозном геле и детекции флуоресценции при ПЦР-КТ). В формате электрофоретической детекции ПЦР требует особых мер предотвращения контаминации (ложноположительных результатов), достигаемых проведением специальных мероприятий и соблюдением особых правил организации лаборатории согласно МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности». Для правильной интерпретации результатов обязательно использование положительных и отрицатель-

ных контрольных реакций для всех этапов анализа. С целью упрощения и ускорения этого этапа можно использовать специальное программное обеспечение, рекомендованное производителем конкретного диагностического набора реагентов.

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

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

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

3.1.13. Аналитические и диагностические характеристики (специфичность и чувствительность) анализа должны обязательно оцениваться при разработке и подтверждаться при регистрации наборов реагентов, после чего они разрешаются к использованию в целях диагностики. Важно учитывать, что характеристики диагностических наборов, установленные разработчиком, будут воспроизводиться только при условии соблюдения всех требований и рекомендаций, включая использование оборудования, комплектов реагентов, соблюдение всех этапов и процедур исследования от момента сбора биологического материала до интерпретации результатов.

3.1.14. ПЦР-исследования (работы с использованием методов амплификации НК при исследовании материала, содержащего (подозри-

тельного на содержание) микроорганизмы I—IV групп патогенности (опасности) проводят в организациях, имеющих лицензии на данный вид деятельности и аккредитованных в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.2. Показания к применению метода

3.2.1. Диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции может эффективно применяться для решения различных эпидемиологических задач:

– Определение этиологии острой инфекции верхних дыхательных путей при проведении мониторинга.

– Определение этиологии острой инфекции нижних дыхательных путей при проведении мониторинга.

– Изучение этиологии группового заболевания ОРЗ в целях проведения соответствующих профилактических и лечебных мероприятий.

– Проведение исследований при подозрении на инфекцию, вызванную вирусами, относящимися к I и II группам опасности (коронавирусы *SARS*, *MERS*, вирус гриппа птиц, высокопатогенный вирус гриппа), связанную с завозом из неблагополучных регионов мира.

– Лабораторное исследование с целью подтверждения случая гриппа (или другой ОРВИ) с летальным исходом.

– Проведение ПЦР-анализа как ускоренного предварительного теста с целью последующего выделения культуры вируса с использованием культурального метода исследования.

– С целью идентификации и типирования культур вирусов.

3.2.2. ПЦР может эффективно использоваться в инфекционных стационарах для выяснения природы похожих по клиническим проявлениям, но отличных по этиологии острых респираторных вирусных заболеваний в целях:

– раннего назначения специфических средств этиотропной терапии;

– прогнозирования тяжести развития заболеваний;

– рационального размещения больных по этиологическому принципу (во избежание перекрестного внутрибольничного инфицирования).

3.2.3. Общими показаниями для лабораторного обследования с целью проведения этиологической диагностики ОРВИ является наличие у пациента остро возникшего заболевания с локальными симптомами поражения дыхательных путей при наличии синдрома общей интоксикации.

IV. Биологический материал для исследования

4.1. Перечень биологического материала для исследования

4.1.1. С целью выяснения этиологического агента (агентов) инфекции верхних дыхательных путей исследуются мазки со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки. Максимальная концентрация вирусов в этих отделах достигается на 2-й—3-й день от момента появления симптомов заболевания. В связи с этим брать материал для исследования предпочтительно именно в эти указанные сроки. В то же время метод ПЦР позволяет обнаружить НК возбудителя и гораздо позднее – в среднем до 7 дней, и максимум – до 2 недель от начала заболевания (при условии сохранении признаков поражения верхних дыхательных путей). Тем не менее у госпитализированных пациентов материал для исследования следует собирать как можно раньше при поступлении (не позднее вторых суток), поскольку в более поздние сроки не исключена возможность суперинфекции при контакте с другими пациентами.

4.1.2. Материал 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. Мазки у пациента берут двумя разными зондами: сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом концы зондов с тампонами после взятия мазков последовательно помещаются в одну пробирку объемом 1,5—2,0 мл с 0,5 мл транспортной среды.

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

4.1.4. В случае невозможности получения материала из нижних дыхательных путей при исследовании на респираторные вирусы допустимо использование мазков из верхних дыхательных путей (мазки со слизистой носоглотки из нижнего носового хода и мазки со слизистой задней стенки ротоглотки).

4.2. Методика получения биологического материала и условия хранения

4.2.1. ***У детей мазки со слизистой носоглотки*** берут сухим стерильным назофарингеальным велюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (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.

4.2.2. ***У взрослых мазки со слизистой носоглотки*** берут сухим стерильным назофарингеальным велюр-тампоном на пластиковом аппликаторе (допустимо использовать сухой стерильный зонд из полистирола с вискозным тампоном). Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (5—6 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 движениями вниз/вверх/вниз, придерживая крышкой пробирки. Пробирку герметично закрывают.

4.2.3. ***Мазки из ротоглотки*** берут сухим стерильным зондом из полистирола с вискозным 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 (1 см) помещают в пробирку с транспортной средой и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают движениями вниз/вверх/вниз, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Допускается хранение в течение трех суток при температуре 2—8 °С, более длительно – при температуре не выше минус 16 °С.

4.2.4. ***Мокроту*** при глубоком откашливании собирают в стерильные одноразовые герметично закрывающиеся контейнеры натощак по-

сле 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. Допускается хранение в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С, более длительно – при температуре не выше минус 16 °С.

4.2.5. ***Получение трахеального аспирата*** проводят натощак после чистки зубов и полоскания полости рта водой. Пациента просят сделать несколько глубоких вдохов с задержкой дыхания на несколько секунд, затем с силой выдохнуть. Это способствует появлению продуктивного кашля и очищению верхних дыхательных путей от мокроты. После присоединения мукус-экстрактора через трубку-переходник к отсосу катетер для забора трахеального аспирата вводится в глотку через полость рта. Вследствие раздражения слизистой в области голосовой щели провоцируется кашлевой рефлекс и проводится извлечение трахеального содержимого через стерильный катетер (6 или 7 размера) с помощью вакуумного отсоса. Объем трахеального аспирата должен составлять не менее 3—5 мл; аспират помещают в стерильные одноразовые пластиковые контейнеры.

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

4.2.6. ***Получение индуцированной мокроты.*** С целью облегчения отхождения мокроты используют упражнения дыхательной гимнастики и вибрационный массаж грудной клетки. Наибольшего эффекта достигают с помощью ингаляций с использованием гипертонического раствора хлорида натрия. Перед процедурой целесообразно ввести 200 мкг сальбутамола через дозирующий ингалятор для предотвращения бронхоспазма. Затем в течение 15 минут через струйный небулайзер (аэрозольный аппарат) подается кислород со скоростью 5 л/мин с 5 мл 5%-го стерильного раствора натрия хлорида. После этого проводится постукивание по передней и задней стенкам грудной клетки с целью стимуляции отхождения мокроты. Затем пациента просят хорошо откашляться и собрать мокроту из нижних дыхательных путей (не слюну!) в стерильный контейнер. Объем образца мокроты должен быть не менее 3 мл (для взрослых и около 1 мл для детей).

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

В случае если мокрота не откашливается, процедуру рекомендуется комбинировать с последующим получением аспиратов из трахеи с це-

лью извлечения содержимого из трахеи с помощью стандартного отсоса с использованием стерильного катетера 6-го или 7-го размера.

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

4.2.7. В случае летального исхода исследуется посмертный (аутопсийный) материал.

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

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

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

4.3. Сбор биологического материала для ПЦР как предварительного теста с целью последующего выделения культуры вируса с использованием культурального метода

4.3.1. ***Мазки из носоглотки для вирусологической диагностики гриппа*** собирают стерильными зондами с вискозными тампонами со слизистой оболочки из нижнего носового хода. Зонд с тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход глубоко, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3—4 см для детей и 5—6 см для взрослых). После взятия материала тампон, не нарушая стерильности, помещают в пробирку с 2,0—5,0 мл вирусологической транспортной среды, рекомендованной в МР «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация». После приготовления вирусологическую транспортную среду аликвотируют в одноразовые стерильные пробирки из полипропилена стерильным наконечником в стерильных условиях (в ламинарном боксе) по 1,0 мл (при использовании пробирок объемом 1,5 мл), по

1,5 мл (при использовании пробирок объемом 2 мл) или по 2,0 мл (при использовании пробирок объемом 5—15 мл), маркируют и хранят до использования при температуре от 2 до 8 °С.

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

Мазки хранят в течение 24 ч при температуре 2—8 °С, более длительно – при температуре не выше минус 20 °С (желательно при температуре минус 70 °С).

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

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

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

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

4.4. Маркировка материала для лабораторного исследования

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

4.4.2. В сопроводительном документе (направлении) к материалу, собранному для исследования в лаборатории, указываются:

– наименование учреждения, которое направляет материал на исследования, телефон, адрес электронной почты;

– фамилия и имя обследуемого больного;

– пол обследуемого больного;
– возраст или дата рождения;
– дата взятия материала для лабораторного исследования;
– тип материала;
– дата заболевания или контакта с больным;
– предварительный клинический диагноз или повод к обследованию;
– степень тяжести заболевания;
– данные о вакцинации против гриппа в текущем эпидемическом сезоне (вакцинирован/не вакцинирован/нет данных);
– ФИО сотрудника, отправившего биоматериал, дата отправки материала и контактный телефон, по которому можно связаться с данным сотрудником.

4.5. Транспортирование материала для проведения ПЦР-исследования

4.5.1. При необходимости транспортирования внутри одного здания, пробирки/контейнеры с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные контейнеры-переноски. Транспортирование производится при комнатной температуре или при температуре от 2 до 8 °С.

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

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

V. Материально-техническое обеспечение

5.1. Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала

5.1.1. Расходные материалы и оборудование для сбора биологического материала включают в себя:

1. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе. Используется для получения материала из носоглотки у детей и, желательно, у взрослых.

2. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы) в индивидуальной упаковке, стерильный – зонд для сбора мазков из ротоглотки. Допустимо использовать для получения материала из носоглотки у взрослых.

3. Стерильный физиологический раствор хлорида натрия. Или коммерческая транспортная среда. Транспортную среду аликвотируют по 0,5 мл стерильным наконечником в стерильных условиях (в ламинарном боксе) в одноразовые стерильные пробирки из полипропилена (при использовании пробирок объемом 1,5—2,0 мл).

4. Герметичные одноразовые полипропиленовые контейнеры для мокроты, аспиратов, БАЛ.

5. Вакуумные системы для получения трахеальных аспиратов.

6. Небулайзер для проведения манипуляций с целью облегчения эвакуации мокроты.

7. Контейнеры для фекалий (при диагностике тяжелых вирусных респираторных инфекций, вызванных коронавирусами).

8. Пробирки для получения плазмы крови (при диагностике тяжелых вирусных респираторных инфекций, вызванных коронавирусами).

5.2. Расходные материалы и оборудование для проведения ПЦР-анализа

5.2.1. Рабочая зона 1

1. Бокс биологической безопасности III класса защиты или бокс биологической безопасности II класса защиты.

2. Центрифуга для пробирок объемом 5—100 мл до 3 тыс. об./мин.

3. Микроцентрифуга/вортекс.

4. Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5—2 мл до 10 тыс. g.

5. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °С.

6. Термостатируемый шейкер для пробирок.

7. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.

8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл или 2,0 мл.

9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1 000 мкл.

10. Штативы для наконечников, микропробирок объемом 1,5 мл.

11. Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и не выше минус 16 °С (для хранения исследуемого материала). Возможно отдельное использование холодиль-

ника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру не выше минус 16 °С.

12. Морозильная камера на минус 70 °С (при необходимости, в случае длительного хранения материала).

13. Емкость с регламентируемым дезинфицирующим раствором.

14. Емкость с 70%-м этиловым спиртом.

15. Препарат, расщепляющий дисульфидные связи мукополисахаридов.

16. Стерильный физиологический раствор хлорида натрия.

5.2.2. Рабочая зона 2

1. Бокс биологической безопасности II или III класса биологической защиты.

2. Микроцентрифуга/вортекс.

3. Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5—2 мл до 10 тыс. g.

4. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °С.

5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.

6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.

7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл.

9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и до 1 000 мкл.

10. Штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 мл.

11. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и не выше минус 16 °С (для хранения наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот). Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру не выше минус 16 °С.

12. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С (для хранения препаратов нуклеиновых кислот). Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот.

13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.

15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

16. При исследовании материала, подозрительного на зараженность возбудителями III—IV групп патогенности, не образующими спор, допускается использование автоматизированного оборудования для выделения нуклеиновых кислот.

17. Дезинфицирующий раствор, содержащий активный хлор для проведения деконтаминационных мероприятий.

18. Наборы реагентов для экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов, разрешенные для использования и зарегистрированные в Российской Федерации.

5.2.3. Рабочая зона 3

1. Бокс биологической безопасности II и III класса или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс, УФ-бокс).

2. Программируемые термоциклеры (персональные, многомодульные, с функцией амплификации в режиме «реального времени») и автоматизированные станции.

3. Выбор термоциклера или автоматизированной станции определяется методами амплификации нуклеиновых кислот и коммерческими наборами реагентов, используемыми в лаборатории, характером выполняемых задач и финансовыми возможностями.

4. Флуориметр (флуоресцентный детектор) – только при использовании учета продуктов амплификации гибридизационно-флюоресцентным методом детекции по конечной точке.

5. Микроцентрифуга/вортекс.

6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.

7. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0,5 (0,2) мл.

8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10, 100 и 200 мкл, свободные от РНКаз.

9. Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 (0,2) мл.

10. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и от минус 18 до минус 25 °С (для хранения наборов, предназначенных для проведения обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот). Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от минус 18 °С до минус 25 °С.

11. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

12. С целью автоматизации процедуры приготовления реакционных смесей для амплификации допускается использование автоматизированного оборудования для раскапывания реагентов.

13. Наборы реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК, разрешенные для использования и зарегистрированные в Российской Федерации.

14. Наборы реагентов для проведения ПЦР, разрешенные для использования и зарегистрированные в Российской Федерации.

5.2.4. Рабочая зона 4 (для электрофоретического анализа продуктов амплификации)

1. Камера для горизонтального электрофореза.

2. Источник постоянного тока с напряжением 150--460 В.

3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.

4. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов.

5. Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в чистой зоне и предназначенным для анализа результатов электрофореза).

6. Аквадистиллятор.

7. Микроволновая печь или другой нагревательный прибор для плавления агарозы.

8. Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы объемом 250 мл.

9. Мерные цилиндры объемом 100 и 1 000 мл.

10. Столик и набор гребенок для приготовления геля.

11. Штатив для микропробирок на 0,5 мл.

12. Отдельная автоматическая пипетка переменного объема до 100 мкл.

13. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл в штативе.

14. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С (для хранения наборов электрофоретической детекции).

15. Емкость с дезинфицирующим раствором для сброса отработанных расходных материалов.

16. Пластиковая емкость объемом 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

17. Стеклянная колонка емкостью 1—2 л для обеззараживания буфера.

18. Реагенты для обработки буфера и гелей: 0,5 М перманганат калия; 2,5 М соляная кислота; 2,5 М NaOH; активированный уголь.

VI. Порядок работы

Работа лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, организуется с использованием МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности». В лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III—IV групп патогенности, допускается исследование биологического материала, подозрительного на инфицирование микроорганизмами II группы патогенности только в тех случаях, для которых разработаны и утверждены нормативные документы, регламентирующие порядок проведения таких исследований в условиях данной лаборатории. Предусматривается для обеззараживания исследуемого материала наличие автоклавной комнаты, которая может быть общей с другими подразделениями учреждения при условии соблюдения требований биологической безопасности. Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с требованиями СП 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

– *рабочая зона 1* – для приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала, в которой осуществляют прием материала, его маркировку, регистрацию в специальном журнале, первичную подготовку (например, концентрирование материала путем центрифугирования, фильтрации, суспендирование), объединение или разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала;

– *рабочая зона 2* – для выделения (экстракции) нуклеиновых кислот, в которой проводят экстракцию и очистку нуклеиновых кислот микроорганизмов из проб, подготовленных в рабочей зоне 1;

– *рабочая зона 3* – для проведения реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридизационно-флуоресцентного метода детекции, где осуществляют приготовление реакционных смесей, проведение обратной транскрипции, амплификации нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридизационно-флуоресцентного метода детекции. Рекомендуется разделить рабочую зону 3 на две подзоны (3а и 3б) и разместить их в отдельных

помещениях. В подзоне 3а осуществляют приготовление реакционных смесей и проведение обратной транскрипции. В подзоне 3б проводят амплификацию нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридизационно-флуоресцентного метода детекции;

– рабочая зона 4 – для учета результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза.

6.1. Предварительная обработка и подготовка биологического материала

6.1.1. Работы проводятся в соответствии с действующими нормативными правовыми и методическими документами: СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.3.3118—13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)» (при подозрении на инфицированность биологического материала возбудителем, относящимся ко II группе патогенности, например, коронавирусом, вызывающим ТОРС), СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности», СанПиН 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

6.1.2. Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл, наконечников с фильтрами.

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

6.1.4. *Мокрота или аспират из трахеи.* Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке реагентами, расщепляющими дисульфидные связи мукополисахаридов. При этом реагент добавляется в емкость с мокротой в количестве, равном количеству мокроты. После инкубации при комнатной температуре до просветления мокроты (не более 20 минут) 100 мкл мокроты используют для экстракции НК. При необходимости повторного проведения анализа остаток обработанной мокроты замораживают.

6.1.5. *Бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов.* Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автома-

тическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс. об./мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции НК. При необходимости повторного проведения анализа оставшийся материал замораживают.

6.1.6. *Секционный материал* гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10%-ю суспензию на стерильном физиологическом растворе натрия хлорида. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс. об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции НК. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают. При необходимости последующей отправки материала в другие организации для гомогенизации используют лишь часть материала, остаток замораживают и хранят при температуре не выше минус 16 °С (с целью последующего ПЦР-исследования) или при температуре не выше минус 70 °С (для последующего выделения вируса).

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

Полученную суспензию фекалий осветляют одним из двух способов:

1. Центрифугирование суспензии фекалий 20 мин при 3 тыс. об./мин. Супернатант (осветленный экстракт фекалий) используют для экстракции НК.

2. Проведение экспресс фильтрации суспензии фекалий. Для экспресс-фильтрации используют два наконечника объемом 1 мл (один с аэрозольным фильтром, другой – без фильтра) и полистироловую палочку с ватным наконечником (например, палочку для ушей). Предварительно следует подготовить систему фильтрации: от ватной палочки отрезается кончик с ватой, который вставляется в наконечник без аэрозольного фильтра и проталкивается с помощью другого чистого наконечника до упора в его суженную часть. Автоматической пипеткой объемом 1 мл с наконечником с аэрозольным фильтром забирается 0,5 мл фекальной суспензии, наконечник с суспензией плотно до упора встав-

ляется в подготовленный наконечник с ватной вставкой. Фильтрация суспензии проводится из наконечника пипетки с фильтром через наконечник с ватной вставкой в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл под давлением поршня пипетки. В случае затруднений при фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию суспензии фекалий. Полученный фильтрат используют для экстракции НК.

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

6.2. Экстракция нуклеиновых кислот

6.2.1. Методика экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов с использованием метода высаливания

6.2.1.1. При работе с РНК используются одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку *RNase-free*, *DNase-free*, означающие «свободные от РНКаз и ДНКаз» соответственно.

Порядок работы

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО (если он предусмотрен для проведения ПЦР-исследования). Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.

3. Внести в пробирки с раствором для лизиса и ВКО (если используется) по 100 мкл исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.

4. В пробирку ОК экстракции внести 100 мкл ОКО, пробирку ПК экстракции внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО (если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования).

5. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой 65 °С на 5 мин. Перемешать и затем осадить капли на вортексе.

6. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 12 тыс. g (например, 13,4 тыс. об./мин для настольной микроцентрифуги).

8. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.

9. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3—5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 12 тыс. g.

11. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.

12. Аналогично провести одну отмывку 200 мкл раствора для отмывки 4.

13. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка.

14. Добавить в пробирки по 50 мкл буфера для элюции и перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой 65 °С на 5 мин, периодически перемешивая на вортексе. Допускается увеличение объема элюции до 120 мкл (в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов для амплификации).

15. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 12 тыс. g. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и/или ПЦР.

Реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК. Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

6.2.2. Методика экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов с использованием сорбента

6.2.2.1. При работе с РНК используются одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку *RNase-free*, *DNase-free*, означающие «свободные от РНКаз и ДНКаз» соответственно.

Порядок работы

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

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО (если он предусмотрен для проведения ПЦР-исследования). Добавить в пробирки по 450 мкл лизирующего раствора. Промаркировать пробирки.

3. Внести в пробирки с лизирующим раствором и ВКО (если используется) по 100 мкл исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. Перемешать пипетированием. Инкубировать при комнатной температуре 3 мин.

4. В пробирку ОК экстракции внести 100 мкл ОКО, в пробирку ПК экстракции внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО (если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования).

5. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе. Осадить капли на вортексе. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), центрифугировать на микроцентрифуге в течение 1 мин при 7 тыс. g (например, 10 тыс. об./мин для настольной микроцентрифуги) и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новые пробирки.

6. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин. Перемешать и затем осадить капли на вортексе.

7. Ресуспендировать сорбент, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента, плотно закрыть крышки. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 7 тыс. g.

9. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.

10. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 1, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

11. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 30 с при 7 тыс. g.

12. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.

13. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

14. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 30 с при 7 тыс. g.

15. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.

16. Повторить процедуру отмывки раствором для отмывки 3, следуя подпунктам 13—15 пункта 6.2.2.1 главы VI.

17. Аналогично провести одну отмывку 400 мкл раствора для отмывки 4.

18. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента.

19. Добавить в пробирки по 50 мкл буфера для элюции. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 60 °С на 5 мин. Допускается увеличение объема элюции до 120 мкл (см. инструкцию к используемому набору реагентов для амплификации).

20. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 2 мин при 12 тыс. g (например, 13,4 тыс. об./мин для настольной микроцентрифуги).

Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции ОТ и (или) ПЦР.

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

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года. Для этого необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

6.3. Проведение реакции обратной транскрипции

6.3.1. При работе с РНК используются одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку *RNase-free*, *DNase-free*, означающие «свободные от РНКаз и ДНКаз» соответственно.

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

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

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением реакции обратной транскрипции.

Порядок работы

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 0,2 (0,5) мл.

2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с *RT-mix* внести 5 мкл *RT-G-mix-1*, тщательно перемешать и осадить капли на вортексе.

3. К полученному раствору добавить 6 мкл ревертазы, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли на вортексе.

Следует иметь в виду, что ревертаза термочувствительна, в связи с чем ее нельзя оставлять при комнатной температуре в течение длительного времени.

4. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл приготовленной реакционной смеси.

5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл РНК-пробы, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. Осторожно перемешать пипетированием. Промаркировать пробирки.

6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 37 °С на 30 мин.

Для последующей постановки ПЦР полученную в реакции обратной транскрипции кДНК развести в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником с фильтром добавить 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).

Готовый препарат кДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в

течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

6.4. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

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

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

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

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

Порядок работы

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.

2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-буфера-А, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-FL.

3. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.

4. Поставить контрольные реакции:

а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл К–;

б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл К+;

в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ОКО;

г) положительный контроль экстракции (ПК, если используется в наборе реагентов) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ПКО.

6.4.4. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплектов реагентов «ПЦР-комплект» с комплектацией фермента полимераза в отдельной пробирке.

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

Порядок работы

1. Разморозить необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-FL, ПЦР-буфером-В и полимеразой (TaqF) и осадить капли кратковременным центрифугированием (1—2 с) с помощью центрифуги/вортекса.

2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.

3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке 10×(N+1) мкл ПЦР-смеси-FL, 5×(N+1) мкл ПЦР-буфера-В, и 0,5×(N+1) мкл полимеразы (TaqF).

4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.

5. Внести в каждую пробирку по 15 мкл подготовленной смеси.

6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.

7. Поставить контрольные реакции:

а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл К–;

б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл К+;

в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ОКО;

г) положительный контроль экстракции (ПК, если используется в наборе реагентов) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ПКО.

6.4.5. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».

Порядок работы

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения амплификации и детекции флуоресцентного сигнала в соответствии с инструкцией к набору реагентов, учитывая рекомендованные каналы для флуорофоров.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Перед установкой в амплификатор планшетного типа необходимо осадить капли со стенок пробирок кратковременным (1—3 с) центрифугированием на центрифуге/вортексе.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

6.4.6. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Согласно инструкции производителя наборов реагентов устанавливают все необходимые настройки параметров, включая уровень пороговой линии, устранение выбросов (если предусмотрено) и другие, указанные для конкретного набора реагентов. Положительным считают образец, в котором кривая флуоресценции пересекает установленную на соответствующем уровне пороговую линию,

что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов по определенному каналу детекции. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. В случае если экспоненциальный подъем не очевиден (линия флуоресценции похожа на прямую линию) следует проанализировать необработанные («сырые» данные). Если в «сырых» (непроанализированных) данных экспоненциальный подъем флуоресценции отсутствует, результат по этой пробе считать отрицательным.

6.5. Интерпретация и выдача результатов исследования при использовании амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

– НК искомого возбудителя обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для соответствующего флуорофора определено значение порогового цикла Ct, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение;

– НК искомого возбудителя не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для соответствующего флуорофора не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct, а значение порогового цикла Ct по каналу для детекции ВКО не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение;

– результат анализа невалидный, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналу для детекции НК возбудителя, и по каналу для детекции ВКО значение Ct также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК. При повторении результатов рекомендовать повторный сбор материала для анализа;

– результат анализа сомнительный, если для данной пробы значение порогового цикла Ct по каналу для детекции НК возбудителя превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение, а значение порогового цикла Ct по каналу для детекции ВКО не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК. При повторении результатов

или получении значения порогового цикла Ct по каналам для детекции НК возбудителя менее граничного образец считать положительным.

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

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

6.6. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией флуоресценции в формате «по конечной точке»

6.6.1. Выбор диаметра пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

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

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

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

Порядок работы

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования/амплификации.

2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

6.6.1. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

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

6.6.2. Интерпретация результатов

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

– НК возбудителя обнаружена, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу детекции выше установленного порогового значения положительного результата;

– НК возбудителя не обнаружена, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу детекции ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу ВКО выше установленного порогового значения;

– результат анализа невалидный, если для данной пробы сигнал по каналу детекции возбудителя ниже установленного порогового значения отрицательного результата и сигнал по каналу ВКО ниже установленного порогового значения. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца с этапа экстракции НК. При повторении результатов рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К–» отрицательный результат по всем каналам является нормой;

– результат анализа сомнительный, если для данной пробы сигнал по каналу детекции возбудителя выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями). В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК. При повторении результатов считать образец положительным.

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

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

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

6.7. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией фрагментов амплификации ДНК методом электрофореза

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

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

6.7.2. *Порядок работы.*

– Подготовка пробирок для проведения ПЦР:

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-R для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

2. На поверхность воска раскапать по 10 мкл ПЦР-смеси-2, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-R.

3. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

– Проведение амплификации:

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

2. Поставить контрольные реакции амплификации:

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

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

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

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

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

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

6.7.3. Детекция фрагментов амплификации ДНК методом электрофореза.

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

6.7.3.2. *Приготовление рабочего буфера для электрофореза.* В мерный цилиндр влить 25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ), концентрированного с бромидом этидия, довести дистиллированной водой до 500 мл, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

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

При хранении трис-боратного буфера (ТБЕ), концентрированного с бромидом этидия, возможно выпадение осадка соли борной кислоты, что не влияет на качество реактива. Если в концентрированном буфере имеется осадок, то готовят рабочий раствор (согласно инструкции к комплекту реагентов), который затем прогревают при помешивании каждые 10—15 мин в кипящей водяной бане в течение 30 мин до растворения осадка. Допускать попадания нерастворенных частиц борной кислоты в агарозный гель нельзя.

6.7.3.3. *Приготовление агарозного геля.* Навеску агарозы соответствующую ожидаемой концентрации агарозного геля пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить 100 мл рабо-

чего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности одной колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65—70 °С.

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

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

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

6.7.3.7. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. Оптимальная напряженность электрического поля должна составлять 10 В/см.

6.7.3.8. По завершении времени электрофореза (краситель ксиленцианол при этом пройдет примерно половину длины геля), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Следует иметь в виду, что при просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной.

6.7.3.9. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

6.7.4. Учет результатов

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

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

6.7.4.3. Отрицательными считаются образцы, которые содержат только полосу на уровне внутреннего контроля и не содержат полосы на уровне положительного контроля амплификации искомого возбудителя.

6.7.4.4. Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

– если результаты анализа контрольных точек не совпадают с указанными в инструкции к набору реагентов, то соответствующий этап анализа следует переделать;

– если в дорожке какой-либо из исследуемых проб отсутствуют обе полосы, соответствующие искомому возбудителю и ВКО. Результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой клинической пробы с самого начала. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки биологического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Если результат повторного тестирования останется прежним, необходимо вторично провести забор материала;

– если в дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях (возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора);

– если в отрицательном контроле (ОК, К–) выявляется специфическая полоса на уровне К+, значит произошла контаминация реактивов или проб. Требуется повторить анализ проб с первого этапа проведения

анализа (выделение НК из исследуемого материала), а также принять меры по выявлению источника контаминации.

6.7.5. Порядок обеззараживания отработанных реагентов

6.7.5.1. *Первый способ.* Один литр отработанных гелей и буфера из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 л 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 л 2,5 М соляной кислоты, закрывают крышкой. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4—6 ч. Добавляют 1 л 2,5 М натрия гидроксида, закрывают крышкой и аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

6.7.5.2. *Второй способ обеззараживания буфера.* Заполнить стеклянную колонку емкостью на 1—2 л активированным углем и пропускать отработанный буфер через нее небольшими порциями. Дезактивированный раствор можно сливать в канализацию.

VII. Организация внутрилабораторного контроля качества исследований

7.1. Внутрилабораторный контроль представляет собой систему контроля достоверности получаемых в лаборатории результатов. Для внутрилабораторного контроля качества исследований рекомендуется использовать содержащие выявляемые организмы (или их НК) контрольные образцы, а также панели контрольных образцов (при их наличии), прошедшие государственную регистрацию и разрешенные к применению на территории Российской Федерации.

7.2. С целью предотвращения появления недостоверных, в том числе ложноположительных результатов, необходимо соблюдать требования по организации лаборатории, правила работы персонала с оборудованием и реактивами и требования, указанные в инструкции и методических рекомендациях производителей конкретного набора реагентов.

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

7.4. Внутрилабораторный контроль включает следующие специализированные процедуры:

– постоянная оценка контрольных образцов в каждой постановке (серии) амплификации;

– периодическое проведение повторного испытания (выполняется двумя операторами параллельно при смене оборудования, специалиста, введении нового набора реагентов);

– использование контрольных образцов для внутрилабораторного контроля качества (данный вид контрольных процедур рекомендуется проводить при входном контроле наборов реагентов, смене оборудования, специалиста, введении нового набора реагентов);

– контроль загрязнения лаборатории продуктами амплификации (проводится не реже 1 раза в месяц).

7.5. В случае *получения постоянных положительных* сигналов в отрицательных контролях все исходные реактивы подлежат немедленной замене, а также необходимо провести деконтаминационные мероприятия в соответствии с МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

7.6. Порядок проведения контроля на наличие загрязнения лаборатории продуктами амплификации.

7.6.1. Подготовить пробирки с ТЕ-буфером или деионизованной водой (раскапать по 300 мкл в микропробирки объемом 1,5 мл в стерильных условиях).

7.6.2. Промаркировать пробирки соответственно следующим контрольным точкам (объекты, с которых производится взятие смывов):

1. Ручки холодильников.
2. Рукоятки ламинарных шкафов.
3. Поверхность вортекса.
4. Рукоятки пипеток в зоне ПЦР.
5. Поверхность термостата.
6. Рукоятки пипеток в зоне выделения НК.
7. Ручки двери.
8. Корпус, блоки и роторы приборов для ПЦР.
9. Клавиатура компьютеров.
10. Телефон (если имеется в рабочих зонах).

7.6.3. *Порядок взятия смывов.*

1. Надеть перчатки, протереть их салфеткой, смоченной 70%-м этиловым спиртом.

2. Зонд с ватным тампоном (например, гигиенический тампон для ушей) смочить в подготовленной пробирке с ТЕ-буфером (деионизованной водой).

3. Вращательными движениями протереть поверхности объекта соответственно контрольным точкам.

4. После взятия смыва зонд поместить в микропробирки с ТЕ-буфером (деионизованной водой), вращать в течение 10—15 секунд, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удалить зонд в емкость для сброса.

5. Для взятия смывов с каждой новой контрольной точки использовать отдельный зонд.

6. Провести постановку ПЦР (без экстракции и обратной транскрипции) с интересующим набором реагентов, контаминация фрагментами амплификации которого контролируется в данный момент. Работать по инструкции к данному набору реагентов.

7.6.4. *Постановка ПЦР.*

1. Подготовить необходимое количество микропробирок для ПЦР объемом, включая отрицательный (К–) и положительный (К+) контроли этапа ПЦР.

2. В качестве положительного контроля этапа ПЦР (К+) необходимо использовать соответствующий ПКО для контролируемого набора реагентов.

3. Для постановки отрицательного контроля этапа ПЦР (К–) использовать ТЕ-буфер (деионизованную воду), который был использован для смывов.

7.6.5. Поверхности контрольных точек, где выявлены положительные результаты ПЦР-анализа смывов, подвергают обработке раствором, содержащим активный хлор (0,1 % по активному хлору), с последующей экспозицией 30 мин и тщательным удалением дезинфицирующего раствора водопроводной водой. После этого проводятся повторные смывы. Следует принимать во внимание, что можно обрабатывать только поверхности, выдерживающие подобную обработку.

Нормативные ссылки

1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2. СП 1.3.3118—13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

3. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

4. СанПиН 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

5. СП 3.1.12.3117—13 «Профилактика гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций».

6. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

7. МУ 3.1.2.3047—13 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями».

8. МУК 4.2.3115—13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний».

9. МУ 1.3.1877—04 «Порядок сбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторного анализа биологического материала от больных (и умерших) пациентов с подозрением на тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)».

10. МУ 3.4.3008—12 «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней».

11. Приложение 4 Приказа от 19 апреля 1995 г. № 101/46 «О защите населения от гриппа и других острых респираторных заболеваний».

12. МР «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация» (утв. 18 апреля 2006 г. № 0100/4430-06-34).

Термины и сокращения

БАЛ	Бронхо-альвеолярный лаваж
БВРС	Ближневосточный респираторный синдром
ВКО	Внутренний контрольный образец
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	Комплементарная ДНК
К–	Отрицательный контроль
К+	Положительный контроль
МАНК	Методы амплификации нуклеиновых кислот
МР	Методические рекомендации
МУ	Методические указания
МУК	Методические указания по методам контроля
НК	Нуклеиновая кислота
ОК	Отрицательный контроль
ОКО	Отрицательный контрольный образец
ОРВИ	Острая респираторная вирусная инфекция
ОРЗ	Острое респираторное заболевание
ОТ	Обратная транскрипция
ПК	Положительный контроль
ПКО	Положительный контрольный образец

ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-КТ	ПЦР с детекцией в формате «по конечной точке»
ПЦР-РВ	ПЦР с детекцией в формате «реального времени»
РНК	Рибонуклеиновая кислота
СанПиН	Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы
ТОРС	Тяжелый острый респираторный синдром
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
Ct	Значение порогового цикла амплификации
FEP	*Fluorescence End Point* Детекция флуоресценции в формате «по конечной точке»
FRT	*Fluorescence Real Time* Детекция флуоресценции в формате «реального времени»
hAdv	*Human Adenovirus*
hBov	*Human Bocavirus*
hCov	*Human Coronavirus*
hPiv	*Human Parainfluenza virus*
hRSv	*Human Respiratory Syncytial virus*
hRv	*Human Rhinovirus*
MERS	*Middle East Respiratory Syndrome*
Mpv	*Metapneumovirus*
RT	*Reverse Transcrption*
SARS	*Severe Acute Respiratory Syndrome*
ТЕ-буфер	Буфер Трис-ЭДТА

Использованная литература

1. CDC. Estimates of deaths associated with seasonal influenza—United States, 1976–2007. MMWR 2010;59:1057–62.

2. Influenza-associated pediatric deaths-United States, September 2010-August 2011. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011; 60(36): 1233-8.

3. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. Lancet 2010;375:1545–55.

4. Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ, Fischer-Langley G. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among infants and young children in the United States, 1997–2006. Ped Infect Dis J 2012;31:5–9.

5. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg, GA, Hall CB, Szilagyi PG, Staat MA, Iwane MK, Prill MM, Williams JV, for the New Vaccine Surveillance Network (NVSN). The burden of human metapneumovirus infection in young children. Burden of Human Metapneumovirus Infection in Young Children. New England Journal of Medicine 2013;368:633-643.

6. Population-Based Incidence of Human Metapneumovirus Infection among Hospitalized Children John V. Williams Journal of Infectious Diseases 2010; 201(12):1890–1898.

7. Outbreaks of Human Metapneumovirus in Two Skilled Nursing Facilities – West Virginia and Idaho, 2011–2012. MMWR. 2013;62(46):909-913. gost.e-ecolog.ru .htm.

8. Weinberg GA, Hall CB, Poehling KA, Edwards KM, Iwane MK, Bridges CB, Staat MA, Griffin MR, Szilagyi PG. Parainfluenza virus infection of young children: population-based burden of hospitalization. Journal of Pediatrics 2009;154:694-699.

9. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. Memish Z.A. Emerging Infectious Diseases. 2013. Vol. 19, No. 11, P. 1819—1823. gost.e-ecolog.ru

10. Hospital Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. Assiri A.M.D. The New England Journal of Medicine. 2013., Vol. 369, No. 5, P. 407—416.

11. Rohde GGU. The role of viruses in CAP. Eur Respir Monogr. 2014; 63:74-87.

12. Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swingler G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. Lancet. 2005; 365:130–4.

13. Вартанян Р.В., Швецова Ю.В., Бунин С.В., Яцышина С.Б., Малышев Н.А. Бокавирусная инфекция у детей раннего возраста. Детские инфекции. 2010, № 3, С. 10—14.

14. Горелов А.В., Швец Е.Ю., Кондратьева Т.Ю., Евсеева Е.Л., Яцышина С.Б., Шипулин Г.А. Клинические особенности бокавирусной инфекции у детей. Инфекционные болезни. 2008. Т. 6. № 4. С. 11—15.

15. Евсеева Е.Л., с соавт. Клинико-эпидемиологические особенности метапневмовирусной инфекции у детей. Инфекционные болезни. 2008. Т. 6. № 3. С. 27—32.

16. Информационная сводка ВОЗ: оценка риска. Случаи заболевания гриппом A(H7N9) среди людей по состоянию на 21 января 2014 г. gost.e-ecolog.ru int/_data/assets/pdf_file/0003/242166/WHO-RISKASSESSMENT,-Human-infections-with-avian-influenza-AH7N9-virus,-21-January-2014-Rus.pdf (дата обращения 11.05.2016).

17. Кондратьева Т.Ю., Яцышина С.Б., Демченко Е.А., Горелов А.В., Шипулин Г.А., Мелев В.В. Первый опыт изучения метапневмовирусной инфекции. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007, № 1, С. 21—23.

18. Кондратьева Т.Ю., Швец Е.Ю., Евсеева Е.Л., Горелов А.В., Яцышина С.Б., Шипулин Г.А., Семина Н.А. Эпидемиологические аспекты бокавирусной инфекции у детей. Инфекционные болезни . 2008. Т. 6. № 2. С. 1—16.

19. Яцышина С.Б., с соавт. Мониторинг гриппа и ОРВИ: сезон 2008—2009. Бюллетень Проблемной комиссии «Грипп и гриппоподобные инфекции». СПб. 2010. С. 100—111.

20. Яцышина С.Б., Коновалов А.В., Магкоева З.Г., Прадед М.Н., Шелковская Л.П., Перевозчикова Л.А., Андронова М.М., Горелов А.В. Лабораторная диагностика в оценке заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями в эпидемическом сезоне 2010—2011 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 1. С. 33—38.

21. Яцышина С.Б., Спичак Т.В., Ким С.С., Воробьева Д.А., Агеева М.Р., Горелов А.В., Учайкин В.Ф., Покровский В.И. Выявление респираторных вирусов и атипичных бактерий у больных пневмонией и здоровых детей за десятилетний период наблюдения // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2016. Т. 95. № 2. С. 43—50.

gost.e-ecolog.ru