



## **Лабораторное тестирование на новый коронавирус**

### **Предварительные рекомендации**

21 декабря 2012 г.

#### **1. ВВЕДЕНИЕ**

Назначение данного документа – представить предварительные рекомендации для лабораторий и других служб, имеющих отношение к лабораторному тестированию на новый коронавирус (последние выпуски обновленной информации о коронавирусной инфекции – см. [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/ru/index.html](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/ru/index.html)). Эти рекомендации основаны на имеющихся на сегодняшний день научных представлениях о природе и свойствах нового коронавируса.

Рекомендации составлены силами специалистов ВОЗ и отрецензированы лабораторными экспертами, в том числе обладающими опытом работы с данным вирусом и другими коронавирусами, а также имеющими экспертные знания и навыки в области разработки диагностических тестов на коронавирусы. В рамках процесса рецензирования в конце ноября 2012 г. была проведена глобальная телеконференция. ВОЗ тщательно отслеживает развитие ситуации в связи с данным вирусом и по мере необходимости будет вносить в рекомендации соответствующие изменения. При отсутствии обновления настоящий документ утрачивает силу 31 марта 2013 г.

#### **2. ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ**

ВОЗ рекомендует работникам клинического профиля, эпидемиологам и специалистам в области лабораторной диагностики при определении показаний для направления клинических образцов от пациентов на лабораторное тестирование руководствоваться стандартным определением случая, предложенным ВОЗ (см.

[http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/case\\_definition/ru/index.html](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/case_definition/ru/index.html)). Это определение также будет при необходимости обновлено. При наличии достаточных ресурсов следует исключать другие потенциальные респираторные инфекции, используя обычные

лабораторные методы, рекомендуемые местными инструкциями по ведению случаев внебольничной пневмонии для выявления первичных этиологических факторов. Примерами соответствующих возбудителей являются *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* тип b, *Legionella pneumophila*, вирус гриппа и респираторно-синцитиальный вирус. Известно, что ряд коронавирусов человека (в частности, бетакоронавирусы hCoV-OC43 и hCoV-NKU1 и альфакоронавирусы hCoV-229E и hCoV-NL63) также вызывают инфекции дыхательных путей.

Необходимо тщательно следить за тем, чтобы тестирование на новый коронавирус назначалось только при наличии клинических или эпидемиологических признаков возможного присутствия данного вируса в качестве причины единичного заболевания или кластера случаев – для того, чтобы избежать нерационального расходования ограниченных ресурсов, накопления ложно-положительных результатов и риска перегрузки системы здравоохранения за счет необоснованной активации групп реагирования на базе больниц и органов общественного здравоохранения. Для решения этой задачи следует использовать процесс сортировки.

### 3. ВЗЯТИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА ОБРАЗЦОВ

**При взятии клинических образцов при расследований возможных случаев инфицирования людей следует соблюдать правила инфекционного контроля.** С соответствующим руководством ВОЗ можно ознакомиться на сайте:

[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO\\_CDS\\_EPR\\_2007\\_6/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_CDS_EPR_2007_6/en/)

По имеющейся, хотя и ограниченной информации, наивысший титр вируса можно получить при исследовании проб из нижних дыхательных путей (таких как трахеальные аспираты и бронхоальвеолярные смывы; см. табл. 1). Рекомендуется также использовать образцы из верхних дыхательных путей, особенно при невозможности их взятия из нижних дыхательных путей. Следует также осуществлять забор парных проб сыворотки крови (первая проба – в течение первой недели после начала заболевания, вторая – не ранее чем через 21 день после первой); пробы следует хранить до появления возможности провести серологическое исследование.

Если образцы посылают для тестирования на новый коронавирус в другую лабораторию, то до отправки желательно исследовать их на предмет исключения известных респираторных возбудителей.

Типы клинических образцов, а также требования в отношении их хранения и перевозки приведены в таблице 1.

Образцы должны доставляться в лабораторию как можно раньше после их забора от пациентов. Исключительную важность имеет строгое соблюдение правил транспортировки образцов. Если высока вероятность задержки получения лабораторией образцов из дыхательных путей или сыворотки крови, настоятельно рекомендуется замораживать их с применением сухого льда.

Таблица 1. Типы клинических образцов для исследования на наличие нового коронавируса и рекомендации по обращению с образцами

Тип образца	Транспортная среда	Транспортировка в лабораторию	Категория опасных грузов	Примечание
Мокрота (при естественном отхаркивании*)	не применяется	На льду. При транспортировке свыше 24 ч. – замораживание с помощью сухого льда	Биологический материал, Категория Б (Biological substance, Category B)	Следует убедиться, что материал получен из нижних дыхательных путей
Бронхоальвеолярный смыв (полученный путем бронхо-альвеолярного лаважа)	не применяется	На льду. При транспортировке свыше 24 ч. – замораживание с помощью сухого льда	См. выше	Возможно некоторое снижение концентрации вируса, однако образец все же пригоден для тестирования
Трахеальный аспират	не применяется	На льду. При транспортировке свыше 24 ч. – замораживание с помощью сухого льда	См. выше	
Носоглоточный аспират	не применяется	На льду. При транспортировке свыше 24 ч. – замораживание с помощью сухого льда	См. выше	
Комбинированный мазок из носа и зева	Транспортная среда для вирусов	На льду.	См. выше	В образцах данного типа был обнаружен вирус
Носоглоточный мазок	Транспортная среда для вирусов	На льду.	См. выше	
Тканевой образец (включая ткани легких), взятый путем биопсии или при вскрытии	Транспортная среда для вирусов или физ. раствор	На льду. При транспортировке свыше 24 ч. – замораживание с помощью сухого льда	См. выше	

Сыворотка крови для серологического исследования или выявления вируса – по возможности всегда собирайте парные образцы. Острый период – первая неделя заболевания; реконвалесценция – в идеале, 3–4 неделями позднее	не применяется	На льду <b>или</b> в замороженном виде	См. выше	
Цельная кровь	ЭДТА антикоагулянт	На льду.	См. выше	Для выявления вируса, особенно в течение первой недели заболевания

\* Сбор образцов индуцированной мокроты может сопровождаться дополнительным риском инфицирования для медицинских работников.

Транспортировка образцов внутри страны должна осуществляться с соблюдением применимых национальных правил. Международную транспортировку образцов, содержащих новый коронавирус, следует осуществлять с соблюдением соответствующих международных правил, изложенных в руководстве ВОЗ по правилам транспортировки инфекционных материалов (*WHO Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances 2011–2012, Applicable as from 1 January 2011*) (см. [http://www.who.int/ihr/publications/who\\_hse\\_ihr\\_20100801/en/index.html](http://www.who.int/ihr/publications/who_hse_ihr_20100801/en/index.html) (на англ. яз.))

## МЕТОДИКА И АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В обычных условиях подтверждение случаев инфекции, вызванной новым коронавирусом, будет основано на выявлении уникальных последовательностей вирусной РНК с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени с дальнейшим секвенированием.

При определенных обстоятельствах (но не в качестве стандартной диагностической процедуры) лаборатории, обладающие соответствующим опытом и оборудованием для безопасного хранения биоматериалов, могут предпринимать попытки изоляции вируса в клеточной культуре. Процедуры изоляции вируса в настоящих рекомендациях не рассматриваются.

Любые виды исследований на присутствие данного вируса следует проводить в надлежащим образом оборудованных лабораториях, силами сотрудников, прошедших подготовку по выполнению соответствующих технических процедур и соблюдению правил безопасности. Государства-члены принимают индивидуальные решения, должны ли в стране проводиться такие исследования и, если да, то в каких лабораториях.

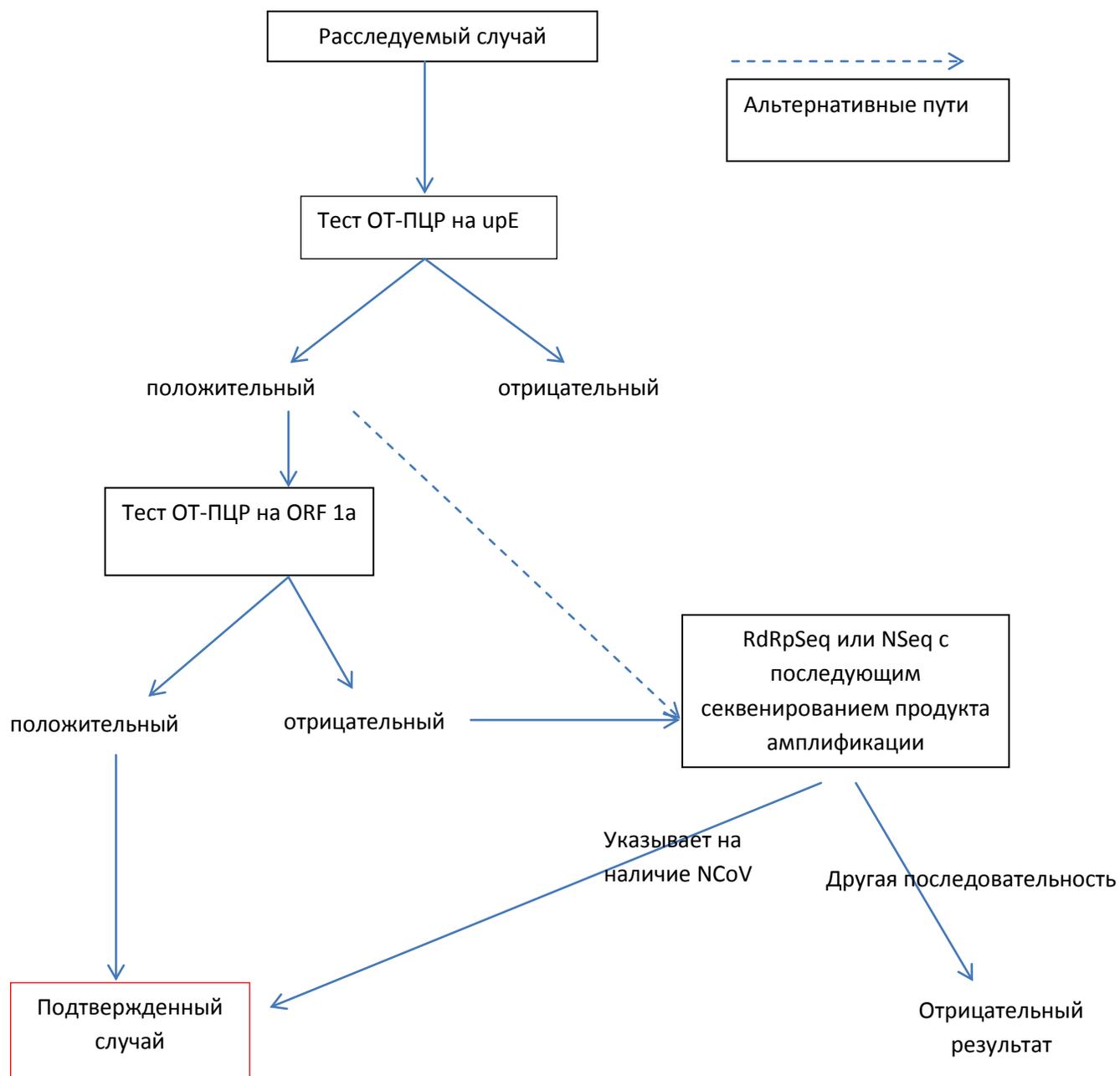
Разработан и опубликован ряд лабораторных протоколов для проведения ОТ-ПЦР исследований, специфичных на новый коронавирус. Описанные протоколы позволяют выявить мишени в отрезке гена верхней области Е-протеина (*npE*)<sup>1</sup>, открытой рамки считывания гена 1b (*ORF 1b*)<sup>1</sup> и открытой рамки считывания гена 1a (*ORF 1a*)<sup>2</sup>. *npE* и *ORF 1a* ОТ-ПЦР протоколы считаются высоко чувствительными. ОТ-ПЦР протокол *ORF 1b* рассматривается как менее чувствительный, по сравнению с *ORF 1a*, однако возможно обладает более высокой специфичностью. Работы, приведенные в библиографических ссылках 1 и 2, содержат детальное описание методики постановки этих ПЦР-тестов.

Кроме того, определен ряд сайтов-мишеней в геноме нового коронавируса, подходящих для секвенирования и подтверждения наличия вируса. Они находятся в генах РНК-зависимой РНК-полимеразы (*RdRp*) и белка нуклеокапсида (*N*)<sup>2</sup>.

Более подробная информация об этих методиках имеется на сайте Института вирусологии, Бонн, Германия: <http://www.virology-bonn.de/index.php?id=40> (на англ. яз.).

На рисунке 1 показан алгоритм тестирования для расследования случаев.

Рисунок 1. Алгоритм тестирования при расследования случаев с подозрением на инфекцию, вызванную новым коронавирусом



Если в двух тестах на уникальные сайты-мишени генома коронавируса получены дискордантные результаты, то для подтверждения результата следует провести секвенирование продукта амплификации, полученного в соответствующем ПЦР-тесте. Данные секвенирования, помимо подтверждения наличия вируса, могут также дать ценную информацию, помогающую понять происхождение вируса и определить, имеет ли он один или несколько источников. Таким образом, при получении положительных образцов рекомендуется в максимально возможном числе случаев проводить секвенирование нуклеиновой кислоты.

Недавно было опубликовано описание набора реагентов для использования в иммунофлуоресцентном анализе на выявление антител к новому коронавирусу<sup>2</sup>. Когда серологические тесты появятся в широком доступе, рекомендации по их использованию будут включены в последующие версии данного пособия.

Важно помнить, что даже несколько последовательных отрицательных результатов тестирования не исключают возможности наличия инфекции у пациента с клиническими проявлениями. К появлению ложно-отрицательных результатов приводит ряд факторов, в том числе следующие:

- низкое качество образцов, например при попадании в образец из дыхательных путей содержимого ротовой полости и ротоглотки;
- образец был взят слишком рано или слишком поздно в течение заболевания;
- при обращении с образцом и в ходе его транспортировки не были соблюдены необходимые требования;
- технические факторы, связанные с выполнением теста, например мутация вируса или ингибирование ПЦР.

Если, несмотря на отрицательные результаты ПЦР-тестов, клиническая картина и эпидемиологические данные заставляют подозревать наличие инфекции, вызванной новым коронавирусом, в подтверждении диагноза может помочь серологическое исследование. Поэтому особенно важно при проведении расследования проводить забор парных образцов сыворотки крови.

На начальном этапе, когда лаборатории осваивают применение новых тестов и реагентов, они могут счесть целесообразным обращаться в другие лаборатории, где имеется больше опыта обращения с материалом, содержащим данный вирус, для подтверждения результатов путем секвенирования. Штаб-квартира и региональные бюро ВОЗ готовы оказывать помощь государствам-членам, желающим воспользоваться услугами лабораторий в других странах.

## 4. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Случай может считаться лабораторно подтвержденным при наличии одного из следующих условий:

положительные ПЦР-тесты для не менее двух специфичных мишеней генома нового коронавируса

ИЛИ

один положительный ПЦР-тест для специфичной мишени генома нового коронавируса и дополнительное секвенирование другого продукта амплификации ПЦР, подтверждающее идентичность с известными геномными сегментами нового вируса<sup>3</sup>.

Позитивные результаты ПЦР-теста для специфичной мишени без дальнейшего тестирования расцениваются в качестве косвенного свидетельства о наличии инфекции, вызванной новым коронавирусом. Установление окончательного диагноза проводится на основе клинической и эпидемиологической информации в сочетании с лабораторными данными. Определения случая – см. [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/case\\_definition/ru/index.html](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/case_definition/ru/index.html)

Государствам-членам предлагается незамедлительно уведомлять ВОЗ о всех предварительно полученных положительных результатах лабораторного тестирования, в том числе до завершения всех тестовых процедур и окончательного подтверждения.

## 5. РЕАГЕНТЫ

Поскольку опубликованы олигонуклеотидные последовательности праймеров и зондов для ПЦР-тестов на новый коронавирус, лаборатории могут заказывать их через своих обычных поставщиков. В качестве альтернативного варианта лаборатории могут обращаться на сайт: <http://www.virology-bonn.de/index.php?id=40> (на англ. яз.).

Позитивные контроли для ОТ-ПЦР тестов на нрЕ и 1А можно заказать через портал Европейского архива вирусов ([http://www.european-virus-archive.com/Portal/produit.php?ref=1386&id\\_rubrique=9](http://www.european-virus-archive.com/Portal/produit.php?ref=1386&id_rubrique=9)).

## 6. УПРАВЛЕНИЕ БИОРИСКОМ

Все лабораторные манипуляции с клиническими образцами от пациентов с подозреваемой или подтвержденной инфекцией, вызванной новым коронавирусом, следует производить с соблюдением рекомендаций ВОЗ (см.

[http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/NovelCoronavirus2012\\_InterimRecommendationsLaboratoryBiorisk/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/NovelCoronavirus2012_InterimRecommendationsLaboratoryBiorisk/en/index.html) (на англ. яз.)).

## 7. ГЛОБАЛЬНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО ЛАБОРАТОРИЙ

Доступ к своевременному и достоверному лабораторному тестированию клинических образцов в расследуемых случаях – это важнейший компонент эпиднадзора за данной новой инфекцией. Все страны должны иметь возможности для надежного тестирования – либо своими силами, либо в лабораториях других стран, которые выразили желание и в состоянии осуществлять первичное выявление или подтверждающее тестирование. ВОЗ, через свои региональные бюро, может при необходимости оказывать помощь государствам-членам в организации тестирования на основе международного сотрудничества. Государства-члены могут счесть целесообразным до отправки клинических образцов в международные лаборатории заключить с ними Соглашение о передаче материалов (СПМ), в котором оговариваются такие вопросы, как права собственности на клинический материал и права интеллектуальной собственности.

Более подробные сведения о мерах, принимаемых ВОЗ в связи с возникновением нового коронавируса, – см. [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/ru/index.html](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/ru/index.html)

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, van Boheemen S, Gopal R, Ballhause M, Bestebroer TM, Muth D, Müller MA, Drexler JF, Zambon M, Osterhaus AD, Fouchier RM, Drosten C (2012) Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill* 17: pii=20285.
2. Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, Kreher P, Lattwein E, Eschbach-Bludau M, Nitsche A, Bleicker T, Landt O, Schweiger B, Drexler JF, Osterhaus AD, Haagmans BL, Dittmer U, Bonin F, Wolff T, Drosten C. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill*. 2012;17(49):pii=20334.
3. Van Boheemen S, et al. 2012. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio* 3(6): e00473-12. doi:10.1128/mBio.00473-12.