

Утверждаю
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А.Ю.ПОПОВА
10 октября 2022 г.

3.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВАРИАНТОВ "ОМИКРОН" И "ДЕЛЬТА" SARS-COV-2 МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ МР 3.1.0302-22

I. Область применения

1.1. В настоящих методических рекомендациях (далее - МР) представлен порядок проведения лабораторного исследования методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (далее - ПЦР-РВ) с целью обнаружения:

- двух мутаций S-белка геноварианта "Дельта" (B.1.617.2): L452R и P681R;

- четырех мутаций S-белка геноварианта "Омикрон" (B.1.1.529): мутация N501Y, делеция delHV69-70 (6 нуклеотидов), делеция delVYY143-145 (9 нуклеотидов) и инсерция Ins214EPE (6 нуклеотидов).

1.2. В МР представлен алгоритм работы с лабораторной методикой определения геновариантов "Омикрон" и "Дельта" SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов амплификации после проведения реакции обратной транскрипции (далее - ОТ) в присутствии флуоресцентно-меченых зондов.

1.3. МР предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы специалистами лабораторий и научных организаций, проводящих исследования методом ПЦР-РВ.

II. Общие положения

2.1. Пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в течение 2021 года сопровождалась сменой двух геновариантов.

В первой половине 2021 года по миру активно распространился геновариант "Дельта", к концу 2021 года началось распространение геноварианта "Омикрон".

Для проведения молекулярно-генетического мониторинга циркулирующих геновариантов SARS-CoV-2 и выявления новых геновариантов, обозначенных Всемирной организацией здравоохранения как VOCs (англ. Variants of Concern) и VOIs (англ. Variants of Interest), используется метод полногеномного секвенирования, а также секвенирование фрагментов генов с применением метода Сэнгера.

Для определения геновариантов "Омикрон" и "Дельта" SARS-CoV-2 разработана

лабораторная методика в формате ПЦР-РВ, в основе которой - детекция четырех мутаций S-белка линии В.1.1.529: delHV69-70, N501Y, delVYY143-145, Ins214EPE - и двух мутаций линии В.1.617.2: L452R и P681 R.

Методика представляет собой проведение полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации при помощи конформационно-блокированных зондов в режиме реального времени. Регистрация накопления специфического продукта амплификации происходит за счет измерения интенсивности флуоресцентного сигнала.

Детекция флуоресцентного сигнала при постановке ПЦР-РВ происходит непосредственно в ходе ПЦР при помощи программного обеспечения амплификатора с наличием не менее двух оптических каналов.

Лабораторная методика позволяет увеличивать долю определенных геновариантов в образцах с выявленным SARS-CoV-2, непригодных для секвенирования, за счет использования технологии ПЦР-РВ. С целью уменьшения времени и увеличения количества исследований, методика может быть модифицирована до 4 реакций для определения мутаций L452R, delHV69-70, Ins214EPE и N501Y. В связи с выявлением сублинии "Омикрон" BA.2, не содержащей мутации delHV69-70, delVYY143-145 и Ins214EPE, определение мутации N501Y проводится во всех исследованиях.

Применение методики позволяет оперативно получить результат с принадлежностью вируса к линии "Дельта" или "Омикрон", а также предположить появление нового геноварианта, что является, в совокупности с секвенированием выборочных проб, элементом мониторинга, осуществляемого в рамках эпидемиологического надзора за новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

III. Описание метода

3.1. Принцип метода. ПЦР позволяет экспоненциально увеличивать количество копий фрагмента исходной ДНК для решения различных задач, в том числе для этиологической диагностики инфекционных болезней. ПЦР является прямым методом диагностики, обнаруживающим специфичные для возбудителя инфекции участки генома. Метод ПЦР обладает высокой аналитической чувствительностью и специфичностью.

Цикличность ПЦР достигается путем многократного (от 40 до 45 раз) последовательного повторения шагов инкубации реакционной смеси при температурах: плюс 90 - 95 °С (денатурация ДНК/кДНК), плюс 50 - 65 °С (отжиг праймеров), плюс 60 - 72 °С (элонгация цепи ДНК).

Выбор, отбор, хранение и использование биологического материала осуществляются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями <1> и методическими документами <2>.

<1> [Глава IV](#) СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный N 62500), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 N 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный N 67587); от 25.05.2022 N 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный N 68934) (далее - СанПиН 3.3686-21); [главы II, III](#) СП 3.1.3597-20 "Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от

22.05.2020 N 15 (зарегистрировано Минюстом России 26.05.2020, регистрационный N 58465). с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 13.11.2020 N 35 (зарегистрировано Минюстом России 16.11.2020 N 60909); от 11.10.2021 N 25 (зарегистрировано Минюстом России 14.10.2021, регистрационный N 65406); от 09.11.2021 N 29 (зарегистрировано Минюстом России 12.11.2021, регистрационный N 65801); от 04.12.2021 N 33 (зарегистрировано Минюстом России 06.12.2021, регистрационный N 66208); от 21.01.2021 N 2 (зарегистрировано Минюстом России 25.01.2022, регистрационный N 66988); от 28.01.2022 N 3 (зарегистрировано Минюстом России 22.02.2022, регистрационный N 67407); от 04.02.2022 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 04.02.2022, регистрационный N 67165); от 20.06.2022 N 18 (зарегистрировано Минюстом России 01.07.2022, регистрационный N 69091).

<2> [MP 3.1.0272-22](#) "Молекулярно-генетический мониторинг штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции", утвержденные Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 10.01.2022.

При работе с данной методикой используется биологический материал, с подтвержденным наличием РНК вируса SARS-CoV-2 (мазки из носоглотки и ротоглотки) качественным или количественным исследованием.

Организация работы лабораторий осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями <3> и методическими документами <4>.

<3> [Глава IV СанПиН 3.3686-21](#).

<4> [МУ 1.3.2569-09](#) "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности", утвержденные Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 22.12 2009 (далее - МУ 1.3.2569-09).

Исследование методом ПЦР состоит из следующих этапов:

- экстракция нуклеиновых кислот (далее - НК) из образцов исследуемого биологического материала (экстракция НК может проводиться различными способами, включая автоматизированные);

- получение кДНК в реакции ОТ, которая проводится отдельным этапом, позволяющим сделать постановку большого количества исследований методом ПЦР, кДНК стабильнее, чем РНК, и может храниться без замораживания при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение недели <5>, более длительно - при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев или при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Допускается однократное повторное замораживание кДНК;

<5> Примечание. При условии проведения реакции ОТ в пробирках, имеющих маркировку "Не содержащий РНК" (англ. "RNase-free"), "Не содержащий ДНК" (англ. "DNase-free") или подвергшихся автоклавированию.

- амплификация кДНК при помощи специфичных к выбранным мутациям праймеров в присутствии флуоресцентно-меченных зондов, специфичных для определяемых мутаций SARS-CoV-

2;

- анализ и интерпретация результатов.

Для получения более точных результатов рекомендуется использование положительных (подтвержденных секвенированием образцов, содержащих соответствующую мутацию (при наличии)) и отрицательных (ТЕ-буфер) контрольных реакций.

ПЦР-исследования проводятся в организациях, имеющих лицензию на деятельность <6>, связанную с обнаружением возбудителей инфекционных заболеваний человека, в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение, выданное в установленном порядке <7>.

<6> [Постановление](#) Правительства Российской Федерации от 01.06.2021 N 852 "О лицензировании медицинской деятельности (за исключением указанной деятельности, осуществляемой медицинскими организациями и другими организациями, входящими в частную систему здравоохранения, на территории инновационного центра "Сколково") и признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации".

<7> [Пункт 135, 136](#) СанПиН 3.3686-21.

По результатам анализа выдается заключение о наличии в пробе геновариантспецифических мутаций S-гена SARS-CoV-2.

3.2. Показания к применению метода. Лабораторная методика определения геноварианта SARS-CoV-2 "Омикрон" методом ПЦР-РВ позволяет проводить эпидемиологические исследования циркулирующих геновариантов, выявлять и дифференцировать геноварианты "Дельта" (B.1.617.2, VOC-вариант) и "Омикрон" (B.1.1.529, BA^(*)) <8>, VOC-вариант) при проведении молекулярно-генетического мониторинга с целью идентификации и типирования вируса.

<8> Примечание: * - все сублинии.

IV. Биологический материал для исследования

4.1. В методике применяются биологические образцы, отобранные в рамках качественных исследований на наличие РНК вируса SARS-CoV-2.

V. Материально-техническое обеспечение

5.1. Организация работы. Работа лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, должна быть организована в соответствии с методическими указаниями <9>.

<9> [МУ 1.3.2569-09](#).

5.1.1. Рекомендовано зонирование помещений для проведения работ, связанных с методами амплификации нуклеиновых кислот:

- рабочая зона 1 - прием, регистрация, разбор и первичная обработка материала. Осуществление приема материала, его маркировка, регистрация в журнале, первичная подготовка, объединение или разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала;

- рабочая зона 2 - выделение (экстракция) нуклеиновых кислот. Проведение экстракции и очистки НК микроорганизмов из проб, подготовленных в рабочей зоне 1;

- рабочая зона 3 - проведение реакции амплификации и учет ее результатов. Приготовление реакционных смесей, проведение реакции ОТ, амплификация НК и учет результатов амплификации.

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 реакции ОТ. В подзоне 3б проводят амплификацию НК и учет результатов амплификации при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции.

5.1.2. Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями <10>.

<10> Глава X СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 3 (зарегистрировано Минюстом России 29.01.2021, регистрационный N 62297), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 26.06.2021 N 16 (зарегистрировано Минюстом России 07.07.2021, регистрационный N 64146); от 14.12.2021 N 37 (зарегистрировано Минюстом России 30.12.2021, регистрационный N 66692); от 14.02.2022 N 6 (зарегистрировано Минюстом России 17.02.2022, регистрационный N 67331).

VI. Оборудование и материалы

6.1. Список рекомендованного оборудования и расходных материалов для использования методики в рабочей зоне 3 (см. п. 5.1.1);

- бокс биологической безопасности II и III класса или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс);

- программируемый термоциклер роторного или планшетного типа с функцией амплификации в режиме реального времени;

- микроцентрифуга/вортекс;

- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;

- одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0,2; 0,6; 1,5 мл;

- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10 мкл, 100 мкл и 200 мкл, имеющие маркировку "Не содержащий РНК" (англ. "RNase-free"), "Не содержащий ДНК" (англ. "DNase-free") или подвергшиеся автоклавированию;

- штативы для наконечников, микропробирок на 0,2 мл;

- холодильник с камерами, поддерживающими температуру от плюс 2 до плюс 8 °С и от минус 24 °С до минус 16 °С (для хранения наборов, предназначенных для проведения реакции ОТ и амплификации нуклеиновых кислот);

- емкость для сброса обработанных расходных материалов.

VII. Порядок работы

7.1. Подготовительным этапом работы является проведение на наборах реагентов <11> реакции ОТ.

<11> Пример методики представлен на наборах реагентов, указанных на официальном сайте: www.amplisens.ru (в открытом доступе). Примечание: допускается использовать наборы реагентов с аналогичными характеристиками.

Для данной работы с РНК рекомендуется использовать одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие маркировку "Не содержащий РНК" (англ. "RNase-free"), "Не содержащий ДНК" (англ. DNase-free") или подвергшиеся автоклавированию.

На подготовительном этапе работы компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением реакции ОТ.

Стандартный конечный объем реакции ОТ - 20 мкл, объем РНК-пробы - 10 мкл. Полученную в реакции ОТ кДНК разводят буфером в 2 раза (40 мкл кДНК - на 4 реакции ПЦР).

При использовании методики определения геновариантов "Омикрон" и "Дельта" требуется 60 мкл кДНК, необходимо увеличить объем реакции ОТ и всех реагентов в 2 раза: конечный объем - 40 мкл, объем РНК-пробы - 20 мкл.

Готовый препарат кДНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 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.

7.2. Проведение ПЦР-РВ.

7.2.1. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора. Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

7.2.2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов.

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

7.2.4. Реагенты перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

Для приготовления реакционных смесей стерильные пробирки объемом 1,5 мл поставить в штатив "рабочее место", промаркировать их.

7.2.5. Смешать каждую реакционную смесь в отдельной пробирке:

- (N + 1) x 10 мкл ПЦР-смеси-FL (название каждой смеси соответствует названию выявляемой мутации);

- (N + 1) x 5 мкл ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT и (N + 1) x 0,5 полимеразы (TaqF), где N - количество исследуемых образцов кДНК.

7.2.6. Перемешать реакционные смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

7.2.7. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации и расставить в штативе "рабочее место".

7.2.8. Внести в пробирки для амплификации по 15 мкл готовых реакционных смесей.

7.2.9. В пробирки с реакционными смесями добавить по 10 мкл проб кДНК, полученных на этапе ОТ.

7.2.10. Поставить контрольные реакции:

- отрицательный контрольный образец ПЦР (К-) - внести в пробирку 10 мкл К- (ТЕ-буфер);

- в качестве положительного контрольного образца ПЦР (К+) возможно использование кДНК подтвержденных секвенированием образцов (при наличии) - внести в пробирку 10 мкл кДНК образца с соответствующей мутацией.

7.2.11. Запрограммировать амплификатор, установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора и провести ПЦР-РВ. Программа амплификации указана в табл. 1.

Таблица 1

Программа амплификации

Цикл	Температура, °С	Время	Канал для флуорофора, по которому проводится детекция	Количество циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	10 с	-	45
	60	20 с	FAM, R6G	

7.3. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР-РВ (роторного или планшетного типа с наличием не менее двух оптических каналов).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции, имеющей экспоненциальный подъем, с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла (далее - Ct).

Анализ результатов для каждой реакционной смеси проводится отдельно. Для анализа необходимо задать пороговую линию для каждой реакционной смеси, соответствующую величине 10% от среднего значения флуоресценции образцов по каждому каналу.

Кривая флуоресценции пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. При неочевидном экспоненциальном подъеме (т.е. линия флуоресценции похожа на прямую линию), следует проанализировать необработанные данные. Если в необработанных данных экспоненциальный подъем флуоресценции отсутствует, результат по этой пробе считать отрицательным.

7.4. Интерпретация и выдача результатов исследования. Детекция результатов, полученных с реакционными смесями, проводится по каналам, указанным в табл. 2.

Таблица 2

Детекция результатов по соответствующим каналам

Детектируемая мутация	Детекция по каналу для флуорофора
L452R	R6G
P681R	R6G
N501Y	FAM
delHV69-70	R6G
delVYY143-145	FAM
Ins214EPE	R6G

Детектируемая мутация считается обнаруженной, если определено значение Ct по соответствующему каналу детекции, табл. 3.

Таблица 3

Интерпретация результатов

Геновариант	Мутация					
	L452R	P681R	N501Y	delHV69-70	delVYY 143-145	Ins214EPE
Дельта	Обнаружена	Обнаружена	Не обнаружена	Не обнаружена	Не обнаружена	Не обнаружена
Омикрон	Не обнаружена	Не обнаружена	Обнаружена	Обнаружена	Обнаружена	Обнаружена

Примечание.

Наличие мутации L452R при отсутствии мутаций геноварианта "Омикрон" является достаточным условием для отнесения образца к геноварианту "Дельта".

Методика рассчитана на выявление четырех сублиний "Омикрона" (Омикрон ВА.1, ВА.1.1, ВА.2, ВА.3) и их дифференцирования от геноварианта Дельта.

Учитывается текущая эпидемиологическая обстановка и спектр циркулирующих геновариантов, для определения принадлежности к геноварианту "Омикрон".

Методика является эпидемиологическим инструментом, с помощью которого возможно дифференцировать геноварианты "Дельта" и "Омикрон" и предположительно обозначать сублинию ВА.2 геноварианта "Омикрон".

Отрицательный результат ПЦР-РВ может быть получен при низком содержании кДНК в образце и не исключает возможность наличия мутаций N501Y, delHV69-70, Ins214EPE, delVYY143-145, L452R, P681R.

Если кривая флуоресценции пересекает пороговую линию на последних циклах амплификации, - в пробе содержатся следовые количества НК возбудителя.

Результаты исследования носят предварительный характер. Для достоверного установления принадлежности к геноварианту рекомендуется проводить секвенирование.

Интерпретация результатов и оформление заключений проводятся на базе организаций, выполнявших лабораторные исследования.

Воспроизводимое появление неописанных сочетаний определяемых мутаций может свидетельствовать о появлении нового геноварианта. Такие образцы необходимо передавать на секвенирование

7.5. Результаты анализа считаются достоверными только при отсутствии амплификации (недетектируемых значений Ct) в отрицательных контрольных образцах для каждой ПЦР-смеси-1.

Библиографические ссылки

1. Федеральный закон Российской Федерации от 30.03.1999 N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".

2. Постановление Правительства Российской Федерации от 01.06.2021 N 852 "О лицензировании медицинской деятельности (за исключением указанной деятельности, осуществляемой медицинскими организациями и другими организациями, входящими в частную систему здравоохранения, на территории инновационного центра "Сколково") и признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации".

3. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

4. СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".

5. Приказ Роспотребнадзора от 19.02.2021 N 56 "О совершенствовании молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции".

6. Приказ Роспотребнадзора от 08.07.2021 N 377 "О внесении изменений в приказ Роспотребнадзора от 19.02.2021 N 56 "О совершенствовании молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции".

7. МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности".

8. МР 3.1.0272-22 "Молекулярно-генетический мониторинг штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции".

Методические рекомендации разработаны ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора (А.С. Есьман, К.О. Миронов, А.С. Черкашина, В.Г. Акимкин).
