

# НАРЕДБА № 24 ОТ 28 ЮНИ 2010 Г. ЗА УТВЪРЖДАВАНЕ НА МЕДИЦИНСКИ СТАНДАРТ "ВИРУСОЛОГИЯ"

*Издадена от Министерството на здравеопазването*

*Обн. ДВ. бр.55 от 20 Юли 2010г., изм. ДВ. бр.92 от 23 Ноември 2010г.*

Член единствен. (1) С тази наредба се утвърждава медицинският стандарт "Вирусология" съгласно приложението.

(2) Дейността по диагностика на вирусните инфекции от специалността вирусология се осъществява при спазване на стандарта по ал. 1 и се изпълнява от всички лечебни и здравни заведения, в които се осъществява дейност по вирусология.

## Заклучителни разпоредби

§ 1. Указания по прилагането на тази наредба се дават от министъра на здравеопазването.

§ 2. Контролът по изпълнението на наредбата се осъществява от Изпълнителна агенция "Медицински одит", регионалните центрове по здравеопазване и органите на управление на лечебните заведения.

§ 3. Тази наредба се издава на основание чл. 6, ал. 1 от Закона за лечебните заведения.

§ 4. Отменя се Наредба № 45 от 2009 г. за утвърждаване на медицински стандарт "Вирусология" (ДВ, бр. 3 от 2010 г.).

Приложение към член единствен, ал. 1

(Доп. - ДВ, бр. 92 от 2010 г.)

## МЕДИЦИНСКИ СТАНДАРТ "ВИРУСОЛОГИЯ"

1. Основна характеристика на медицинската специалност

1.1. Дефиниция, основни цели и задачи:

Вирусологията е медицинска специалност с преобладаваща клинично-диагностична насоченост, която осигурява необходимите познания и практически умения за изясняване на етиологията на заболяванията с вирусна генеза при хората чрез използването на количествени и качествени методи. Тя се занимава с комплексното проучване на голям брой патогенни агенти - вируси, с изразени характерни и строго специфични морфологични и генетични особености. Вирусите са способни само на вътреклетъчно размножаване, което основно ги отличава от останалите патогенни микроорганизми заедно с редица други характеристики.

В Република България специалността вирусология е застъпена предимно в извънболничната, но и в болничната помощ. Присъства в програмите за обучение в университетското образование. Представлява самостоятелна медицинска специалност в системата на здравеопазването на Република България и се придобива чрез следдипломна квалификация на завършилите висше медицинско образование и висше немедицинско образование, специалност биология.

Основната цел на стандарта е да осигури качеството на диагностичната дейност на вирусологичните лаборатории, осъществяващи своята дейност на територията на Република България.

Националният стандарт по вирусология съдържа задачи, изисквания и показатели за дейности, свързани с етиологичната диагноза на вирусните инфекции при хората, проследяване хода на инфекциозния процес и ефекта от лечението на вирусните заболявания, както и оценка на ефективността на вирусните

ваксини. Този стандарт регламентира основните изисквания, на които една вирусологична лаборатория трябва да отговаря за извършване на серологични и вирусологични изследвания. Той покрива изследванията, извършвани в нея, използвайки стандартизирани методи, методи, непокрити от стандартизираните, и методи, разработвани от лабораториите.

1.2. Общи условия и изисквания към вирусологичните лаборатории:

1.2.1. Този стандарт е приложим за всички вирусологични лаборатории независимо от обхвата и мащабите на дейността или от броя на персонала. Когато една лаборатория не извършва една или повече дейности, регламентирани в този стандарт, изискванията за същите са неприложими.

1.2.2. Този стандарт е предназначен за прилагане от лаборатории при разработването на техните системи по качество, така че да удовлетворява техните дейности. Той може да бъде използван от клиенти на лаборатории, контролни или акредитиращи органи, установяващи съответствието или регистриращи компетентност на лаборатории.

1.2.3. Персоналът на лабораторията носи отговорност за осъществяването от нея дейности по начин, удовлетворяващ изискванията на този стандарт и нуждите на клиентите, както и законно упълномощените органи, извършващи акредитация.

1.2.4. Лабораторията трябва да гарантира независимостта си при извършване на изследванията от външен натиск (търговски, финансов и др.), както и от вътрешен натиск, които биха оказали отрицателно въздействие върху извършваната дейност.

1.2.5. Лабораторията трябва да има политика и процедури, предотвратяващи действия, които биха намалили доверието в нейната компетентност, независимост и безпристрастност.

1.2.6. Лабораторията трябва да създава условия за сътрудничество с пациентите си или техни представители, които да спомагат за изясняване на техните нужди, както и за изискванията на самата лаборатория.

1.2.7. На лабораторията се препоръчва да поддържа обратна връзка с пациентите си. Обратната връзка трябва да се използва с цел оптимизиране на броя и вида на извършваните изследвания, както и всички въпроси, свързани с взаимоотношенията с пациентите.

1.2.8. Персоналът на лабораторията носи отговорност за осъществяването дейности при работа с материали, отговарящи на изискванията за качествено извършване на изследванията.

1.2.9. Материалите, постъпващи за изследване в лабораторията, трябва да са съпроводени от медицински направления, съдържащи достатъчно информация, свързана с пациента и неговото заболяване.

1.2.10. Лабораторията създава, поддържа и съхранява необходими документи, свързани с нейната работа (лабораторни журнали, процедури и др.).

1.2.11. Лабораторията използва и съхранява правилно всички външни документи, свързани с нейната дейност (инструкции, наредби, стандарти, методи и др.).

1.2.12. Лабораторната документация се осъвременява в съответствие с настъпилите изменения в методите и оборудването на лабораторията.

1.2.13. Действащите и утвърдените документи са на разположение на определените работни места в лабораторията, доколкото са свързани с естеството на работа.

1.2.14. Остарелите и излезли от употреба документи, съхранявани в лабораторията, трябва да са подходящо обозначени и архивирани.

1.2.15. Резултатите от изследванията се изпращат на клиентите чрез подходящи за целта бланки.

1.3. Изисквания за професионална компетентност на персонала:

1.3.1. Персоналът на лабораторията трябва да има необходимите за дейността си квалификация, практически опит и умения в областта на вирусологията.

1.3.2. Ръководството се осъществява от лекар с призната специалност "Вирусология". В състава на лабораторията може да бъде включен и биолог. В лабораторията работят правоспособни медицински специалисти с квалификация "Медицински лаборант".

1.3.3. При използване на допълнителен персонал той трябва да бъде с необходимата квалификация.

1.3.4. Медицинският персонал трябва системно да повишава своята квалификация.

1.3.5. Началникът (ръководителят) на лабораторията определя нуждите от допълнителна квалификация.

1.3.6. Изборът на форми за обучение (външни, вътрешни) трябва да осигурява адекватна на извършваната дейност квалификация, която е подходящо документирана (сертификати, лични планове и др.).

1.3.7. Лабораторията трябва да има длъжностни характеристики за ръководителя и изпълнителския персонал.

1.3.8. Началникът (ръководителят) на лабораторията трябва да определи точно задълженията и отговорностите на персонала, както и взаимоотношенията между целия персонал.

## 2. Основна характеристика на местата за осъществяване на диагностичната дейност

2.1. Лабораторията трябва да има помещения, които благоприятстват извършването на изследванията, за които е предназначена, и не влияят отрицателно върху изискваното качество на работа.

### 2.1.1. Изисквания към помещенията:

2.1.1.1. Броят на помещенията да бъде съобразен с извършваните изследвания, така че да не се компрометира качеството на работата и безопасността на персонала.

2.1.1.2. При вирусологични изследвания, изискващи стерилни условия, да има специално обособени за целта помещения/боксове.

2.1.1.3. Помещенията, свързани с качеството на извършваните изследвания, трябва да са разположени по начин, позволяващ контрол върху достъпа и до използването им.

2.1.1.4. В лабораторията трябва да има обособени работни места, като се вземат мерки за предотвратяване на възможните замърсявания.

### 2.1.2. Изисквания към условията в помещенията на лабораторията:

2.1.2.1. Температурата в помещенията, свързани с качеството на извършваните изследвания, трябва да бъде в граници, които не влияят отрицателно върху персонала (стайна температура), както и да отговаря на изискваната от спецификациите на използваната апаратура.

2.1.2.2. Осветлението на обособените работни места трябва да благоприятства извършваните изследвания.

2.1.2.3. Въздухът в работните помещения по отношение на влажност, запрашеност, електромагнитни влияния трябва да благоприятства качеството на извършваните изследвания.

2.1.2.4. Електрическото захранване на използваната апаратура трябва да бъде осигурено по начин, който гарантира непрекъсваемост на диагностичните процедури (инкубация).

2.1.2.5. Повърхността на стените и на работните плотове трябва да бъде с покритие, позволяващо ефективно извършване на дезинфекция.

2.2. Трябва да се поддържа постоянен контрол върху достъпа до използваните помещения или места, влияещи върху качеството на работата.

2.3. Помещенията в лабораторията трябва да се поддържат в изряден вид и хигиена.

## 3. Структура и персонал на лабораториите, извършващи специализирана дейност по този стандарт

### 3.1. Характеристика на вирусологичните лаборатории, извършващи специализирана дейност:

3.1.1. Вирусологичната лаборатория е медико-диагностична лаборатория в рамките на лечебно или здравно заведение и РИОКОЗ или самостоятелна такава.

3.1.2. Лабораторията трябва да е ясно обозначена в организационната структурна схема на лечебното заведение и да са описани точно взаимоотношенията с останалите звена, като ясно са дефинирани дейностите, които извършва.

3.1.3. Лабораторията трябва да има кадрова и материална осигуреност за извършване на определен минимум серологични и вирусологични изследвания за нуждите на диагностичната, лечебно-профилактичната и други дейности на съответния вид лечебно или здравно заведение.

3.1.4. Лабораторията трябва да използва постоянен персонал, като числеността му се определя от обема на извършваната дейност. При използване на допълнителен персонал той трябва да бъде с необходимата квалификация.

3.1.5. Вирусологичните лаборатории могат да бъдат: в лечебни заведения за извънболнична помощ; в лечебни заведения за болнична помощ и здравни заведения. Дейностите и оборудването на лабораториите в лечебните заведения за болнична помощ и здравните заведения са съответно от второ и трето ниво на компетентност.

### 3.2. Отговорности и задължения на персонала на лабораториите:

#### 3.2.1. Отговорности и задължения на ръководителя на лабораторията:

3.2.1.1. Изготвя и утвърждава правилника за устройството, дейността и вътрешния ред на лабораторията, длъжностните характеристики, всички инструкции и изисквания, свързани с пряката дейност на лабораторията.

3.2.1.2. Следи за изпълнение на инструктажа на работниците и служителите по безопасност, хигиена на труда и противопожарна охрана.

3.2.1.3. Организира цялостната диагностична дейност на лабораторията, като контролира всички програми и задачи, свързани с тази дейност.

3.2.1.4. Организира въвеждането на нови диагностични методи и контрола по изпълнението на вече въведените такива.

3.2.1.5. Организира регистрацията и интерпретацията на резултатите от диагностичната дейност.

3.2.1.6. Повишава своята квалификация чрез участие в конгреси, курсове, семинари, самоподготовка.

- 3.2.1.7. Осигурява заместник при своето отсъствие.
- 3.2.1.8. Следи за стриктно спазване политиката на лечебното или здравното заведение по отношение на трудовата дисциплина, персонал, взаимоотношения.
- 3.2.2. Отговорности и задължения на лекаря ординатор:
  - 3.2.2.1. Контролира изпълнението на функциите на лаборанта по т. 3.2.3.
  - 3.2.2.2. Отчита и при необходимост интерпретира резултатите от извършените изследвания.
  - 3.2.2.3. Контролира унищожаването на изследвания материал, като съблюдава спазването на действащата нормативна уредба.
  - 3.2.2.4. Извършва по разпореждане на ръководителя на лабораторията изследвания на постъпили материали.
- 3.2.3. Отговорности и задължения на медицинския лаборант:
  - 3.2.3.1. Изпълнява правилника за устройството, дейността и вътрешния ред на лабораторията, всички инструкции и изисквания, свързани с пряката дейност на лабораторията.
  - 3.2.3.2. Следва изискванията за инструктаж на работниците и служителите по безопасност, хигиена на труда и противопожарна охрана.
  - 3.2.3.3. Изпълнява задачи, поставени от ръководителя на лабораторията и лекаря ординатор в лабораторията.
  - 3.2.3.4. Овладява въведените лабораторни методи, пряко участва в изпълнението им в лабораторната практика.
  - 3.2.3.5. Участва в поддръжката на работните места и следи за изправността на апаратурата.
  - 3.2.3.6. Участва в провеждания външен контрол на вирусологична диагностика.
  - 3.2.3.7. Уведомява ръководителя на лабораторията или неговия заместник за всички особености и нередности в хода на изпълнение на задачите.
  - 3.2.3.8. Участва в изпълнението на всички процедури и правила относно хигиената, дезинфекцията и инактивирането на инфекциозните отпадъци.
  - 3.2.3.9. Приема и оценява качеството на постъпващата проба за изследване.
  - 3.2.3.10. Регистрира на хартиен и/или електронен носител всички необходими данни от направлението, придружаващо пробата за изследване.
  - 3.2.3.11. До извършване на изследването пробата се съхранява при подходящи условия, така че да бъде запазена напълно годна за изследване.
  - 3.2.3.12. Извършва изследванията, посочени в направлението, придружаващо постъпилата за изследване проба.
  - 3.2.3.13. След завършване на изследванията по т. 3.2.3.12 уведомява лекаря ординатор, който отчита и при необходимост интерпретира получените резултати.
  - 3.2.3.14. Изследваният материал се съхранява за срок, определен в правилника за устройството, дейността и вътрешния ред на лабораторията. След изтичане на срока същият се унищожават съобразно правилата, установени в нормативни актове и договори.
4. Професионална дейност. Оптимален обем показатели и оборудване за извършване на специализирана дейност по вирусология на различни нива на извънболнична и болнична помощ в Република България
  - 4.1. Оптимален обем показатели за извършване на вирусологични и серологични изследвания в лаборатории в лечебни заведения за извънболнична помощ.
    - 4.1.1. Изследване на кръвен серум или плазма по имуноензимен метод (ELISA) или други сходни методи (MEIA, ChLIA, ELFA):
      - 4.1.1.1. Откриване на повърхностен антиген на хепатитен В вирус (HBV) - HBsAg.
      - 4.1.1.2. Откриване на антитела срещу HIV 1/2 или HIV Ag/Ab - бързи тестове (ELISA).
      - 4.1.1.3. Откриване на маркери на хепатитен С вирус (HCV) - anti-HCV или HCV Ag/Ab.
      - 4.1.1.4. Откриване на маркер на хепатитен А вирус (HAV) - anti-HAV IgM.
      - 4.1.1.5. Откриване на маркери за рубеолна инфекция - anti-Rubella IgM, IgG.
      - 4.1.1.6. Откриване на маркери за паротитна инфекция - anti-Mumps IgM, IgG.
      - 4.1.1.7. Откриване на маркери за морбилна инфекция - anti-Measles IgM, IgG.
    - 4.1.2. Лабораторна апаратура, необходима за извършване на вирусологични и серологични изследвания в лечебни заведения за извънболнична помощ.
      - 4.1.2.1. Отчитащо устройство за имуноензимен тест (ELISA) или други автоматични анализатори.
      - 4.1.2.2. Принтер.
      - 4.1.2.3. Термостат.
      - 4.1.2.4. Хладилник.
      - 4.1.2.5. Центрофуга.

4.1.2.6. Автоклав.

4.2. Оптимален обем показатели за извършване на вирусологични и серологични изследвания в лаборатория по вирусология във второ ниво на компетентност.

4.2.1. Изследване на кръвен серум или плазма по имуноензимен метод (ELISA) или други сходни методи (MEIA, ChLIA, ELFA и др.):

4.2.1.1. Маркер за хепатит А вирусна инфекция - HAV-IgM.

4.2.1.2. Маркери за хепатит В вирусна инфекция - HBsAg, anti-HBs, anti-HBcIgM, HBeAg, anti-HBe.

4.2.1.3. Маркери за хепатит С вирусна инфекция - anti-HCV или HCV Ag/Ab.

4.2.1.4. Маркер за хепатит D вирусна инфекция - anti-HDV.

4.2.1.5. Определяне на антитела срещу HIV.

4.2.1.6. Маркери срещу цитомегаловирус (CMV) и Епщайнбар вирус (EBV) anti-CMV IgM/IgG, antiEBV-VCA IgM, anti EBV-NA IgM.

4.2.1.7. Маркери за рубеолна инфекция - anti-Rubella IgM, IgG.

4.2.1.8. Маркери за паротитна инфекция - anti-Mumps IgM, IgG.

4.2.1.9. Маркери за морбилна инфекция - anti-Measles IgM, IgG.

4.2.1.10. Изследване на кръвен серум за откриване антитела срещу грипни вируси тип А и В - РЗХА/ELISA.

4.2.2. Изследване на фекална проба:

4.2.2.1. Определяне на ротавируси във фекална проба - имунохроматографски/ELISA.

4.2.2.2. Определяне на норовируси във фекална проба - имунохроматографски/ELISA.

4.2.3. Изследване на носоглътъчен смив на кокоши ембриони/клетъчни култури:

4.2.3.1. Изолиране на грипни вируси.

4.2.3.2. Изследване на носоглътъчен смив за доказване на грипни вируси и вируси на ОРЗ с бързи имуносорбентни тестове.

4.2.4. Лабораторна апаратура за извършване на вирусологични и серологични изследвания в лаборатория по вирусология във второ ниво на компетентност.

4.2.4.1. Отчитащо устройство за имуноензимен тест (ELISA) или други автоматични анализатори.

4.2.4.2. Миещо устройство за ELISA.

4.2.4.3. Принтер.

4.2.4.4. Термостат.

4.2.4.5. Хладилник.

4.2.4.6. Центрофуга.

4.2.4.7. Микроскоп за клетъчни култури.

4.2.4.8. Сух стерилизатор.

4.2.4.9. Автоклав.

4.2.4.10. Водна баня.

4.2.4.11. Ламиниран бокс (боксово помещение).

4.2.5. (нова - ДВ, бр. 92 от 2010 г.) Минимален брой лекари в лаборатория по вирусология от второ ниво на компетентност - двама, от които единият със специалност "Вирусология".

4.3. Оптимален обем показатели, апаратура и дейности за извършване на вирусологични и серологични изследвания в трето ниво на компетентност:

4.3.1. Показатели за високоспециализирани изследвания и дейности, свързани с референтна диагностика, консултанска, учебна и научна дейност в трето ниво на компетентност:

4.3.1.1. Организира и осъществява национална система за външна оценка на качеството на лабораторната диагностика в лаборатории по вирусология в страната.

4.3.1.2. Осигуряване на потвърдителна и референтна диагностика на трето ниво на компетентност с интерпретация.

4.3.1.3. Вирусологични изследвания за изолиране на вируса причинител и за доказване на вирусни антигени.

4.3.1.4. Вирусологично изследване на клетъчни култури за изолация и типизация на вирусите на полиомиелита и други ентеровируси.

4.3.1.5. Вирусологично изследване на кокоши ембриони за изолация и типизация на грипни вируси.

4.3.1.6. Вирусологично изследване на клетъчни култури за изолация и типизация на някои вируси на ОРЗ (аденовируси, парагрипни вируси, РС вируси).

4.3.1.7. Вирусологично изследване на клетъчни култури за изолация и типизация на херпес симплекс вирус тип 1 и тип 2.

4.3.1.8. Вирусологично изследване на новородени бели мишки за изолиране и типизиране на вируса на Кримско-хеморагична треска (КХТ).

4.3.1.9. Вирусологично изследване на новородени бели мишки за изолиране и типизиране на причинителя на Хеморагична треска с бъбречен синдром (ХТБС).

4.3.1.10. Вирусологично изследване на новородени бели мишки за изолиране и типизиране на причинителя на Лимфоцитарен хориоменингит (ЛХМ).

4.3.1.11. Вирусологично изследване на новородени бели мишки и клетъчни култури за изолиране и типизиране на причинителите на сезонни енцефалити: вирус Западен Нил/флави вируси/Синдбис/алфа вируси/, кърлежови енцефалити.

4.3.1.12. Изследване на кокоши ембриони и бели мишки за изолиране и идентифициране на причинителите на Ку-треска (*C. Burnetii*) и Марсилска треска, кърлежови петнисти трески (*R. conorii* и др.).

4.3.1.13. Изследване на кокоши ембриони и бели мишки за изолиране и идентифициране на *C. psittaci*.

4.3.1.14. Имунофлуоресцентна диагностика на носоглътчни смивове за доказване на причинителя на грипни вируси тип А и В.

4.3.1.15. Имунофлуоресцентна диагностика на носоглътчни смивове за доказване на някои респираторни вируси (адено-, парагрипни, РС и др.).

4.3.1.16. Имунофлуоресцентна диагностика на трупен материал за доказване на причинителя на КХТ.

4.3.1.17. Имунофлуоресцентна диагностика на трупен материал за доказване на причинителя на ХТБС.

4.3.1.18. Серологични изследвания за доказване на вирусни антитела и антигени.

4.3.1.19. Вируснеутрализираща реакция (ВНР) за вирус херпес симплекс 1 и 2 тип.

4.3.1.20. Вирус неутрализираща реакция (ВНР) за Коксаки вирус.

4.3.1.21. Изследване на ротавируси и норовируси във фекална проба - имунохроматографски метод, ELISA, PCR.

4.3.1.22. Реакция за задръжка на хемагутинацията (РЗХА) за идентификация на грипни вируси. Серологична диагностика на грипни вируси РЗХА/ELISA.

4.3.1.23. Имуноензимна реакция (ELISA) за доказване на морбили, паротит и рубеола.

4.3.1.24. Реакция за свързване на комплемента (РСК) ELISA за вируси на ОРЗ (аденовируси, парагрипни вируси, РС вирус и др.).

4.3.1.25. Серологична диагностика на Q треска I и II фаза - ELISA.

4.3.1.26. Серологична диагностика на вирусите Западен Нил, Синдбис, кърлежов енцефалит - РСК, РЗХА, имунофлуоресцентно титриране на вирусите.

4.3.1.27. Серологична диагностика на Кримска хеморагична треска (КХТ), ХТБС и ЛХМ - реакция за свързване на комплемента (РСК) или ELISA.

4.3.1.28. Имунофлуоресцентно титриране с определяне на имуноглобулиновия клас (IgG, IgM, IgA) на антитела срещу рикетсии.

4.3.2. Имуноензимен метод (ELISA) или други сходни методи (MEIA, ChLIA, ELFA и др.) за определяне в кръвен серум или плазма на:

4.3.2.1. Маркер за хепатит А - anti-HAV-IgM.

4.3.2.2. Маркер за хепатит В - HBsAg.

4.3.2.3. Маркер за хепатит В - anti-HBs.

4.3.2.4. Маркер за хепатит В - anti-HBc.

4.3.2.5. Маркер за хепатит В - HbeAg/anti-HbeAg.

4.3.2.6. Маркер за хепатит В - anti-HbcIgM.

4.3.2.7. Маркер за хепатит D - anti-HDV.

4.3.2.8. Маркер за хепатит С - anti-HCV или HCV Ag/Ab.

4.3.2.9. Маркер за антитела срещу CMV - anti-CMV IgM.

4.3.2.10. Антитела срещу CMV - anti-CMV IgM.

4.3.2.11. Антитела срещу EBV - anti-EBV IgM/IgG.

4.3.2.12. Антитела срещу херпес симплекс тип 1 и 2.

4.3.2.13. Антитела IgM/ IgG срещу варицела зостер вирус (VZV).

4.3.2.14. Антитела IgG срещу *Chlamydia psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*.

4.3.2.15. Антитела IgM/IgG срещу морбилен, паротитен и рубеолен вирус.

4.3.2.16. Откриване на антитела срещу HIV 1/2 или HIV Ag/ Ab - бързи тестове/ ELISA.

4.3.2.17. Откриване на P 24 антиген на HIV/Anti - p 24 антитела срещу HIV.

4.3.3. Качествено или количествено откриване на вирусни геноми (NAT): грипни вируси тип А и В, РС вируси, HBV, HCV, рота- и норовируси, полиома и папилома вируси, HIV 1/2, КХТ,ХТБС.

- 4.3.3.1. Неамплифициращи методи: хибридизационни реакции.
- 4.3.3.2. Амплифициращи методи: верижна полимеразна реакция (PCR), multiplex PCR Real-timePCR, BranchDNA, TMA.
- 4.3.3.3. Електрофоретично разделяне на вирусни геноми.
- 4.3.3.4. Фрагментно-рестриктазен анализ за типизиране на вируси.
- 4.3.3.5. Секвенционен анализ на вирусни геноми.
- 4.3.3.6. Електрофоретично разделяне на вирусни антигени.
- 4.3.3.7. Имуноблот за вирусни антитела.
- 4.3.3.8. Определяне на генотипа/субгенотипа на вируси чрез хибридизация на специфични олигонуклеотидни проби с амплифициран вирусен геном (line probe assay).
- 4.3.4. Лабораторна апаратура за извършване на вирусологични и серологични изследвания в трето ниво на компетентност.
  - 4.3.4.1. Отчитащо устройство за ELISA или други автоматични анализатори.
  - 4.3.4.2. Миещо устройство за ELISA.
  - 4.3.4.3. Принтер.
  - 4.3.4.4. Термостат.
  - 4.3.4.5. Хладилник.
  - 4.3.4.6. Центрофуга.
  - 4.3.4.7. Микроскоп за клетъчни култури.
  - 4.3.4.8. Сух стерилизатор.
  - 4.3.4.9. Автоклав.
  - 4.3.4.10. Водна баня.
  - 4.3.4.11. Инкубатор CO<sub>2</sub>.
  - 4.3.4.12. Ламинарен бокс клас 2.
  - 4.3.4.13. Ултрацентрофуга.
  - 4.3.4.14. Ултразвуков дезинтегратор.
  - 4.3.4.15. PH метър.
  - 4.3.4.16. Вортекс миксер.
  - 4.3.4.17. Компютърни конфигурации.
  - 4.3.4.18. Електронна везна.
  - 4.3.4.19. Инвертен микроскоп.
  - 4.3.4.20. Флуоресцентен микроскоп.
  - 4.3.4.21. Вани за вертикална и хоризонтална електрофореза.
  - 4.3.4.22. Апаратура за провеждане на нуклеотидни анализи.
  - 4.3.4.23. Апарат за поддържане на циклични температурни режими.
  - 4.3.4.24. Апаратура за секвениране.
- 4.3.5. (нова - ДВ, бр. 92 от 2010 г.) Минимален брой лекари в лаборатория по вирусология от трето ниво на компетентност - четирима, от които двама с призната специалност "Вирусология".
- 4.4. Аналитични принципи за осъществяване професионалната дейност на специализираните вирусологични дейности:

Необходимо е да се използват аналитичните принципи за осъществяване дейността на вирусологичните лаборатории, възприети от Националния комитет за клинични лабораторни стандарти (NCCLS, USA), Българското научно дружество по вирусология и подзаконовите нормативни актове.

  - 4.4.1. Изследвания за изолиране и индентификация на вируса причинител:
    - 4.4.1.1. Вирусологични изследвания, свързани със заразяване на кокоши ембриони. Материали от болни (носогълтъчни смивове, трупни материали) се инокулират на кокоши ембриони с цел изолация на вируса причинител.
    - 4.4.1.2. Вирусологични изследвания, свързани със заразяване на клетъчни култури. Материали от болни (носогълтъчни смивове, трупни материали, везикуларна течност, ликвор, фекални проби и др.) се инокулират на биологичен модел - клетъчни култури, с цел изолация на вируса причинител.
    - 4.4.1.3. Вирусологични изследвания, свързани със заразяване на опитни животни. Материали от болни (кръвни проби, трупни материали и др.) се инокулират на биологичен модел - опитни животни, с цел изолация на вируса причинител.
  - 4.4.2. Изследвания за откриване на вирусни антигени и/или антитела срещу тях:
    - 4.4.2.1. Реакция имунофлуоресценция (РИФ):

Конюгираните с флуоресцеин-изотиоцианат специфични антисеруми се свързват с хомоложните антигени в материали от болни, което прави виден комплексът антиген-антитяло с флуоресцентен микроскоп.
    - 4.4.2.2. Реакция за задръжка на хемаглутинацията (РЗХА):

Основава се на свойството на вирусни антихемаглутиници да възпрепятстват специфичната хемаглутинация, причинена от изследваните вируси.

#### 4.4.2.3. Реакция неутрализация (РН):

Основава се на свойството на специфичните вируснеутрализиращи антитела от изследваните серуми да неутрализират цитопатичния ефект на клетъчната култура или да изменят рН на културалната среда.

#### 4.4.2.4. Реакция свързване на комплемента (РСК):

Основава се на свойството на антителата от серума да се свързват специфично с вирусните антигени в присъствие на комплемента и да възпрепятства хемолизата в хемолитичната система.

#### 4.4.2.5. Имуноензимен метод (ELISA; EIA):

Методът има различни модификации и варианти. Основава се на специфичното свързване на търсените антигени и антитела на твърда фаза с последваща специфична имуноензимна реакция с конюгиран с ензим антитела или антигени. Цветната реакция след прибавянето на субстрата се отчита спектрофотометрично. Конкурентният вариант на метода се базира на инхибиция на имуноензимната реакция вследствие на конкуренцията на търсените и конюгираните с ензим антитела за едно и също количество антиген.

Сходни методи са: микрочастици EIA-MEIA, имунохемилюминесценция - ChLIA, ензимносвързана флуоресценция - ELFA, електрохемилюминесценция - ECLIA и др.

4.4.2.6. Електрофоретично разделяне на вирусни антигени - идентифициране на вирусните антигени според молекулните им тегла на денатуриращи полиакриламидни гелове, визуализирани с комаси или сребърен нитрат.

4.4.2.7. Имуноблот - доказване на вирусни специфични антитела срещу отделни вирусни антигени. Принципът на метода е на основата на взаимодействие на електрофоретично разделен вирус - специфични протеини, имобилизирани върху твърди носители с нерадиоактивно белязани вирусни поликлонални/моноклонални антитела. Специфичните антиген-антитяло комплекси се визуализират с ензимно-субстратна реакция.

#### 4.4.3. Изследвания за идентифициране и доказване на генетични вирусни последователности:

4.4.3.1. Типизиране на вируси въз основа на големината на вирусните геноми. Електрофоретично разделяне на нуклеотидни последователности на полиакриламидни или агарозни гелове, визуализирани с етидиев бромид. Вирусните геноми се идентифицират въз основа на дължината на нуклеотидните последователности на вирусния геном в килобази.

4.4.3.2. Фрагментно-рестриктазен анализ за типизиране на вируси: методът типизира вирусни щамове въз основа на консервативни последователности от вирусния геном, които се разпознават от специфични екзонуклеазни ензими.

4.4.3.3. Полимеразна верижна реакция (PCR): идентифицира и доказва присъствието на вирусни геноми в биологични течности, тъкани и клетъчни популации чрез амплифициране на нуклеотидни последователности от вирусния геном с помощта на ензими и специфични синтетични олигонуклеотиди.

Когато вирусният обект е РНК съдържащ вирус, предварително се прилага ензимна стандартизирана обратна транскриптазна реакция *in vitro* (RT-PCR) с последваща амплификация на DNA провирусния геном за определяне на наличие (качествено) или концентрация (количествено) на вирусни геноми в биологични течности/тъкани. Прилага за определяне на вирусното размножение - количествено или качествено (наличие, липса), както и за проследяване и оценка на ефекта при прилагане на антивирусни терапии.

#### 4.4.3.4. Секвенционен анализ:

Разчита нуклеотидните бази, кодиращи вирусния геном чрез електрофоретично разделяне. Нуклеотидите са белязани с радиоизотопни или флуоресцентни маркери. Методът дава възможност за пълно идентифициране на нуклеотидните последователности на вирусния геном и определяне на единични точкови мутации. Намира все по-широко приложение за определяне на резистентност при прилагане на антивирусни терапии. Съществуват различни методи за определяне на вирусните секвенции.

4.4.3.5. Определяне на генотипа/субгенотипа на вируси чрез хибридизация със специфични олигонуклеотидни проби (line probe assay). Амплифицирани чрез RT-PCR нуклеотидни последователности на изследвания вирус се хибридизират специфично с имобилизирани на нитроцелулозни стрипове, специфични за генотипа/субгенотипа на търсения вирус олигонуклеотидни проби. След прибавяне на специфичен ензимен конюгат и субстрат се отчита цветна реакция върху използваните стрипове, като по този начин се определя генотипът/субгенотипът на изследвания вирус.

### 5. Критерии за качество на извършваната дейност

5.1. Ръководният персонал на лабораторията трябва да създаде, внедри и поддържа система по качеството, отговаряща на сферата на дейностите, които тя извършва, подкрепено със съответната



документация.

5.2. Лабораторията участва в Националната система за външна оценка на качеството на резултатите (НСВОК) и/или международна нетърговска система за външна оценка на качеството.

5.3. Лабораторията въвежда национални и международни стандарти за качество (ISO/IEC/DIS 17025:2006) и др.

5.4. Лабораторията използва контроли и стандарти за проверка на качеството на изследванията, съобразени с използваните методики и вида на извършваните изследвания. При използване на готови набори за изследване (китове) на вирусни маркери (антигени, антитела, нуклеинови киселини) стриктно да се придържа към изискванията на производителя за използване и отчитане на предоставените от него контроли.

5.5. Лабораторията при необходимост повтаря изследванията с други методи и/или тестове за осигуряване качеството на извършваните изследвания.

6. Информираност на пациентите

6.1. Необходимо е пациентът да бъде информиран:

6.1.1. за значението и диагностичната стойност на изследването;

6.1.2. и за други необходими за диагнозата параклинични изследвания;

6.1.3. относно достоверността на информацията от изследването;

6.1.4. относно поверителност на информацията от извършените вирусологични изследвания;

6.1.5. за евентуалните усложнения и съществуващите рискове от провеждане на изследването.

6.2. Персоналът на лабораторията носи отговорност както за достоверността на резултатите от изследванията, така и за запазването на конфиденциалността на информацията, получена след извършването им.