



## MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

### ORDIN mun. Chișinău

“28” octombrie 2021

Nr. 999

#### **Cu privire la supravegherea epidemiologică și virusologică a gripei, IACRS și SARI în Republica Moldova și integrarea supravegherii COVID -19 cu prezentarea informației săptămânale/lunare**

În scopul fortificării supravegherii epidemiologice și virusologice a gripei, infecțiilor acute ale căilor respiratorii superioare (IACRS), infecțiilor respiratorii acute severe (SARI), monitorizării circulației virusurilor gripale, non-gripale și SARS CoV-2 în timp real și spațiu geografic, organizarea, efectuarea măsurilor de sănătate publică, și integrării în sistemul european de supraveghere (TESSy) și sistemul global (FluNet) ale Centrului European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (ECDC) și Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) și în temeiul prevederilor Regulamentului privind organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 148/2021,

#### **ORDON:**

1. A aproba:
  - a) Regulamentul de supraveghere epidemiologică a gripei sezoniere, IACRS și SARI și integrarea supravegherii COVID -19 cu monitorizarea circulației virusurilor gripale, non-gripale și SARS-CoV -2 în Republica Moldova, anexa nr.1;
  - b) Formularul de raportare privind supravegherea epidemiologică a gripei, infecțiilor acute ale căilor respiratorii superioare (IACRS) și infecțiilor respiratorii acute severe (SARI) în sistemul de supraveghere de rutină (conform anexei nr.2) și sentinelă (conform anexei nr.3);
  - c) Buletinul de însoțire la produsele biologice pentru diagnosticul de laborator

- al infecțiilor respiratorii virale, conform anexei nr. 4;
- d) Buletin de analiză a probei biologice pentru detecția virusurilor gripale, non-gripale și SARS CoV-2, conform anexei nr.5;
  - e) Regulament privind prelevarea, păstrarea, transportarea, recepționarea, stocarea și investigarea probelor gripale și SARS CoV-2, conform anexei nr.6.
2. A nominaliza Agenția Națională pentru Sănătate Publică ca instituție responsabilă de realizarea supravegherii epidemiologice a gripei sezoniere, COVID-19, infecțiilor acute ale căilor respiratorii superioare (IACRS) și a infecțiilor respiratorii acute severe (SARI) cu monitorizarea circulației virusurilor gripale, non-gripale și SARS CoV-2 în Republica Moldova conform regulamentului (anexa nr.1).
  3. Centrele de Sănătate Publică cu statut de direcție și din teritoriul deservit vor asigura colectarea, analiza și interpretarea datelor notificate conform anexei nr.2, raportarea ANSP la nivel național, organizarea și efectuarea măsurilor de sănătate publică în dependență de situația epidemiologică creată.
  4. Centrele de Sănătate Publică cu statut de direcție din punctele sentinelă nominalizate în anexa nr.1 vor asigura:
    - a) acordarea asistenței metodice și consultative instituțiilor medico – sanitare publice din teritoriul deservit pentru organizarea și realizarea supravegherii sentinelă în conformitate cu metodologia din anexa nr.1;
    - b) supravegherea procesului de colectare în instituțiile desemnate ca puncte sentinelă a prelevatelor biologice pentru investigarea la prezența virusurilor gripale;
    - c) păstrarea temporară și transmiterea prelevatelor biologice cu respectarea cerințelor de biosecuritate;
    - d) organizarea colectării și totalizarea datelor clinico-epidemiologice, conform ”Dării de seamă privind supravegherea epidemiologică a gripei, IACRS și SARI în sistemul sentinelă” (anexa nr. 3) din IMSP desemnate.
  5. Instituțiile Medico-Sanitare Publice din punctele sentinelă vor asigura:
    - a) desemnarea instituțiilor și persoanelor responsabile pentru monitorizarea circulației virusurilor gripale în teritoriul deservit, în conformitate cu metodologia din anexa nr.1;
    - b) colectarea, păstrarea temporară, transportarea prelevatelor biologice, cu respectarea cerințelor de biosecuritate în laboratorul microbiologic al CSP cu statut de direcție sau din teritoriul deservit (IMSP din Chișinău vor transporta probele în Laboratorul virusologic ANSP (mun. Chișinău, str. Alexandru Cosmescu 3) de sine stătător));

- c) furnizarea datelor clinico-epidemiologice, conform ”Dării de seamă privind supravegherea epidemiologică a gripei, IACRS și SARI în sistemul sentinelă” (anexa nr.3) la CSP din teritoriul deservit.
6. Agenția Națională pentru Sănătate Publică va asigura:
- a) recepționarea probelor biologice pentru investigare la prezența virusurilor gripale și SARS CoV-2 în laboratorul virusologic ANSP (mun. Chișinău, str. Alexandru Cosmescu 3) de la IMSP din mun. Chișinău și punctele sentinelă din Orhei (Rezina), Soroca, Edineț, Ungheni, Căușeni și Comrat;
  - b) recepționarea probelor biologice pentru investigare la prezența virusurilor gripale și SARS CoV-2 în laboratorul CSP Bălți de la IMSP din mun. Bălți;
  - c) recepționarea prelevatelor biologice pentru investigare la prezența virusurilor gripale și SARS CoV-2 în laboratorul CSP Cahul de la IMSP din mun. Cahul;
  - d) distribuția regeților de laborator pentru diagnosticul gripei sezoniere și SARS CoV-2 către laboratoarele CSP Bălți și CSP Cahul;
  - e) distribuția seturilor necesare de consumabile (eprubete cu mediu de transport, tampoane pentru lavaje nazo-faringiene) pentru colectarea, păstrarea și transportarea prelevatelor biologice conform metodologiei expuse în anexa 1;
  - f) analiza datelor furnizate în sistemele de supraveghere de rutină și sentinelă, monitorizarea circulației virusurilor gripale și SARS CoV-2 cu elaborarea rapoartelor și transmiterea lor Ministerului Sănătății, Centrelor de Sănătate Publică cu statut de direcție și din teritoriile deservite și introducerea datelor în sistemul european de supraveghere (TESSy) și sistemul global (FluNet) ale ECDC și OMS;
  - g) acordarea asistenței metodice și practice Centrelor de Sănătate Publică cu statut de direcție și instituțiilor medico-sanitare în supravegherea gripei, IACRS, SARI și COVID-19 cu monitorizarea circulației virusurilor gripale, non-gripale și SARS CoV-2, și diagnosticul de laborator.
7. A abroga Ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr.1103 din 02.10.2019 ”Cu privire la supravegherea epidemiologică la gripă, IACRS și SARI în Republica Moldova și prezentarea informației săptămânale/lunare”.
8. Controlul executării prezentului ordin m-il atribui.

**Ministru**



**Ala NEMERENCO**

**Regulamentul de supraveghere epidemiologică a gripei sezoniere, IACRS și SARI cu monitorizarea circulației virusurilor gripale, non-gripale și SARS CoV-2 în Republica Moldova**

**I. Dispoziții generale**

1. Regulamentul de supraveghere epidemiologică a gripei sezoniere, IACRS, SARI și COVID-19 cu monitorizarea circulației virusurilor gripale, non-gripale și SARS CoV-2 în Republica Moldova este elaborat conform recomandărilor OMS și ECDC și are ca scop organizarea și supravegherea epidemiologică de rutină și sentinelă în timp real cu monitorizarea răspândirii geografice, intensității și tendinței procesului epidemic, circulației virusurilor gripale, non-gripale și SARS CoV-2 și elaborarea măsurilor de sănătate publică.
2. Obiectivele:
  - a) Existența unui sistem funcțional de supraveghere și monitorizare a:
    - morbidității și severității cazurilor de boală;
    - nivelului de răspândire a tulpinilor virale și variația sezonieră;
    - circulației virusurilor gripale cu potențial epidemic;
    - rezistenței virusurilor gripale la preparatele antivirale;
  - b) Supravegherea epidemiologică în timp real și spațiu geografic a gripei sezoniere, IACRS, SARI și COVID -19;
  - c) Supravegherea evoluției indicatorilor nespecifici ai activității gripale: consumul de medicamente, absenteism, concedii medicale;
  - d) Integrarea sistemului național de supraveghere în sistemul european de supraveghere (TESSy) și sistemul global (FluNet) ale ECDC și OMS;
  - e) Utilizarea rezultatelor obținute pentru elaborarea și efectuarea măsurilor de sănătate publică în dependență de evoluția procesului epidemic.
3. Raportarea săptămânală în sistemul european de supraveghere (TESSy) și sistemul global (FluNet) ale ECDC și OMS include furnizarea datelor despre gripa/afecțiuni clinic compatibile cu gripa, infecțiilor acute ale căilor respiratorii superioare (IACRS) și infecțiilor respiratorii acute severe (SARI) și COVID-19 precum și datele privind rezultatele de laborator.

## II. Definiții de caz

### 4. Gripa, afecțiuni clinic compatibile cu gripa (ILI - Influenza Like Illness):

#### *Criterii clinice:*

O infecție respiratorie acută cu:

- Febră  $\geq 38^{\circ}\text{C}$

ȘI

- Tuse

ȘI

- Debut în perioada de 10 zile anterioare.

*Nota:* Infecția gripală poate avea un spectru larg de sindroame clinice, de la coriză ușoară (simptome de guturai) până la pneumonie severă. Exista și infecții subclinice.

Boala poate varia în severitate în funcție de tipul, subtipul și varianta de virus și de expunerea anterioară individuală la virusuri similare. Persoanele în etate și foarte tinere pot prezenta manifestări clinice atipice: ex: vârstnicii (persoanele >65 ani) și copiii mai mici de 3 luni pot să nu facă febră, iar copiii până la 3 ani pot prezenta febră înaltă, cu puține semne de afectare respiratorie.

La adulți cu boli cronice (respiratorii, cardiovasculare, etc.) infecția gripală se poate manifesta ca o exacerbare a bolii de bază.

Infecția gripală poate determina infecții bacteriene secundare (de obicei pneumococice și stafilococice). De asemenea, o multitudine de alte microorganisme pot determina simptome asemănătoare, diagnosticele fiind confundate cu gripa.

#### *Criterii de laborator:*

Dectecție genetică de tip și subtip: RT-PCR/ Real Time-PCR.

Izolare și caracterizare de virusuri gripale: tip/subtip.

*Criterii epidemiologice:* orice persoană care îndeplinește criteriile clinice și are legătură epidemiologică cu un caz confirmat.

### 5. Infecții Acute ale Căilor Respiratorii Superioare (IACRS/ ARI - Acute Respiratory Infection):

#### *Criterii clinice:*

Debut brusc

ȘI

Cel puțin unul din următoarele:

- Tuse

- Laringită
- Faringită
- Dificultăți respiratorii
- Coriză

***Criterii de laborator:***

În funcție de contextul epidemiologie se vor face determinări de laborator (izolări virale, detecții IF/PCR pentru adenovirusuri, virusuri sincițiale respiratorii, virusuri paragripale, etc).

**6. Infecții Respiratorii Acute Severe (SARI – Severe Acute Respiratory Infection):**

***Criterii clinice:***

O infecție respiratorie acută cu:

- Istoric de febră sau febră măsurată de minimum 38°C  
ȘI
- Tuse  
ȘI
- Debut în perioada de 10 zile anterioare  
ȘI
- Necesită spitalizare.

***Criterii de laborator pentru cazul confirmat cu etiologie gripală:***

Cel puțin unul din următoarele:

- Detecție genetică de tip și sub tip: RT-PCR/ Real Time-PCR
- Izolare și caracterizare de virusuri: tip/subtip

**III. Clasificarea cazurilor**

7. Medicii stabilesc diagnosticul în baza definiției de caz.
8. Medicii din punctele sentinelă suplimentar vor preleva probe pentru monitorizarea circulației virusurilor gripale conform algoritmului din pct.16 al prezentului regulament.
9. Cazurile vor fi clasificate ca:
  - a) **Gripa:**
    - **caz posibil:** caz care îndeplinește criteriile clinice (caz clinic compatibil cu gripa);
    - **caz probabil:** caz care îndeplinește criteriile clinice și are legătură epidemiologică cu un caz confirmat de laborator;
    - **caz confirmat:** caz care îndeplinește criteriile clinice și de laborator.

- b) **Infecții Acute ale Căilor Respiratorii Superioare (IACRS):**
  - *caz posibil*: caz care îndeplinește criteriile clinice;
  - *caz probabil*: caz care îndeplinește criteriile clinice și are legătură epidemiologică cu un caz confirmat de laborator;
  - *caz confirmat*: caz care îndeplinește criteriile clinice și de laborator.
- c) **Infecții Respiratorii Acute Severe (SARI):**
  - *caz posibil*: caz care îndeplinește criteriile clinice;
  - *caz probabil*: caz care îndeplinește criteriile clinice și are legătură epidemiologică cu un caz confirmat de laborator;
  - *caz confirmat*: caz care îndeplinește criteriile clinice și de laborator.

#### IV. Sistemul de supraveghere de rutină

10. Centrele de Sănătate Publică cu statut de direcție și din teritoriul deservit:
  - a) Vor monitoriza și evalua zilnic situația epidemiologică prin gripă sezonieră, IACRS, SARI în fiecare teritoriu administrativ deservit (municipiu, raion) cu organizarea și efectuarea măsurilor de sănătate publică ce se impun;
  - b) Vor informa nominal, timp de 12 ore despre fiecare caz de deces prin gripă, IACRS și SARI, Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Direcția management al urgențelor de sănătate publică, tel./fax 0-22-574-557, e-mail: [smasp@ansp.gov.md](mailto:smasp@ansp.gov.md) și Secția supravegherea epidemiologică a gripei și infecțiilor respiratorii virale acute, tel.0-22-73-73-22, e-mail: [gripa@ansp.gov.md](mailto:gripa@ansp.gov.md).
  - c) Vor totaliza datele săptămânal, pentru fiecare teritoriu administrativ deservit (municipiu, raion), în perioada de monitorizare (săptămânile 40 – 20), pentru săptămâna precedentă, conform dării de seamă, anexa nr.2 a prezentului ordin și vor informa (în format EXCEL) în ziua de Luni (orele 09<sup>00</sup> – 14<sup>00</sup>) Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Secția supravegherea epidemiologică a gripei și infecțiilor respiratorii virale acute, tel.022-73-73-22, e-mail: [gripa@ansp.gov.md](mailto:gripa@ansp.gov.md):
    - 1) nr. de consultații (vizite la medicul de familie) și vizite la domiciliu indiferent de cauză, pe grupe de vârstă;
    - 2) nr. de cazuri înregistrate cu gripă și IACRS, pe grupe de vârstă și gen;
    - 3) nr. de cazuri spitalizate cu gripă, IACRS și SARI, pe grupe de vârstă și gen;
    - 4) nr. total de internări în IMSP teritoriale, indiferent de cauză, pe grupe de vârstă și gen;
    - 5) nr. de decese din cauza gripei, IACRS și SARI pe grupe de vârstă și gen.
  - d) În cazul deceselor prin gripă, IACRS și SARI se vor colecta probe de material cadaveric și se vor transporta probele în Laboratorul virusologic,

ANSP, pentru investigații la prezența virusurilor gripale: tel. 0-22-72-96-11, e-mail: [gripa@ansp.gov.md](mailto:gripa@ansp.gov.md).

e) Vor totaliza datele lunar, pentru fiecare teritoriu administrativ deservit (municipiu, raion), în afara sezonului gripal (săptămânile 21 – 39), conform formularului din anexa nr.2 a prezentului ordin și vor informa (în format excel) în prima zi de Luni din lună pentru luna precedentă (orele 09<sup>00</sup> – 14<sup>00</sup>) Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Secția supravegherea epidemiologică a gripei și infecțiilor respiratorii virale acute, tel.022-73-73-22, e-mail: [gripa@ansp.gov.md](mailto:gripa@ansp.gov.md):

- 1) nr. de consultații (vizite la medicul de familie) și vizite la domiciliu indiferent de cauză, pe grupe de vârstă;
- 2) nr. de cazuri înregistrate cu gripă și IACRS, pe grupe de vârstă și gen;
- 3) nr. de cazuri spitalizate cu gripă, IACRS și SARI, pe grupe de vârstă și gen;
- 4) nr. total de internări în IMSP teritoriale, indiferent de cauză, pe grupe de vârstă și gen;
- 5) nr. de decese din cauza gripei, IACRS și SARI pe grupe de vârstă și gen.

11. Conducătorii instituțiilor medico-sanitare publice, private și departamentale:

- a) Vor totaliza datele săptămânal (săptămânile 40 – 20) privind morbiditatea prin gripă, IACRS și SARI pentru săptămâna precedentă, conform anexei nr.2 a prezentului ordin și vor informa în ziua de Luni (orele 09<sup>00</sup> – 11<sup>00</sup>) CSP teritorial;
- b) Vor totaliza datele lunar (săptămânile 21 – 39) privind morbiditatea prin gripă, IACRS și SARI, conform anexei nr.2 a prezentului ordin și vor informa în prima zi de Luni din lună pentru luna precedentă (orele 09<sup>00</sup> – 11<sup>00</sup>) CSP teritorial;
- c) Vor informa nominal, timp de 12 ore despre fiecare caz de deces prin gripă, IACRS și SARI, Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Direcția management al urgențelor de sănătate publică, tel./fax 0-22-574-557, e-mail: [smasp@ansp.gov.md](mailto:smasp@ansp.gov.md) și Secția supravegherea epidemiologică a gripei și infecțiilor respiratorii virale acute, tel.0-22-73-73-22, e-mail: [gripa@ansp.gov.md](mailto:gripa@ansp.gov.md) (conform ordinului MSMPS nr.368 din 13.12.2004).

12. Indicatorii de evaluare a performanței sistemului de supraveghere includ:

- a) 100% cazuri nominale de boală raportate în sistemul informațional;
- b) Coincidența absolută a informației despre caz de boală raportat;
- c) 100% rapoarte complete;
- d) 100% rapoarte veridice.

## V. Sistemul de supraveghere sentinelă

13. Sistemul de Supraveghere epidemiologică sentinelă se realizează continuu în 9 teritorii administrative - puncte sentinelă (în baza CSP cu statut de direcție: Chișinău (mun.Chișinău), Bălți (mun. Bălți), Căușeni (r. Căușeni), Cahul (r. Cahul), Comrat (r. Comrat), Edineț (r. Edineț), Orhei (r. Rezina), Soroca (r. Soroca) și Ungheni (r. Ungheni)).
14. La nivelul fiecărui punct sentinelă sunt selectate de către CSP cu statut de direcție și din teritoriul deservit:
- a câte 2 medici de familie din Centrele de Sănătate (CS) raionale și a câte 2 medici de familie din toate Asociațiile Medical Teritoriale (AMT) din mun. Chișinău, inclusiv câte 1 medic de familie din mediul rural;
  - 1 spital/secție de boli infecțioase;
  - 1 stație de asistență medicală urgentă prespitalicească;
  - 6 farmacii;
  - 2 grădinițe;
  - 2 instituții de învățământ preuniversitar, inclusiv 1 liceu;
  - 1 întreprindere industrială cu minimum 50 angajați;
15. Punctele sentinelă, CSP cu statut de direcție: Chișinău (mun.Chișinău), Bălți (mun. Bălți), Căușeni (r. Căușeni), Cahul (r. Cahul), Comrat (r. Comrat), Edineț (r. Edineț), Orhei (r. Rezina), Soroca (r. Soroca) și Ungheni (r. Ungheni):
- a) Vor recepționa săptămânal datele conform anexei nr. 3 de la centrele de sănătate, spitale, farmacii, grădinițe, creșe, gimnazii/școli, licee, unități industriale și serviciul de asistență medicală urgentă prespitalicească (determinate de Centrele de Sănătate Publică cu statut de direcție);
- b) Vor totaliza datele săptămânal pentru săptămâna precedentă conform anexei nr.3 a prezentului ordin și vor informa (în format EXCEL) în ziua de Luni (orele 09<sup>00</sup> – 14<sup>00</sup>) Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Secția supravegherea epidemiologică a gripei și infecțiilor respiratorii virale acute, tel.022-73-73-22, e-mail: [gripa@ansp.gov.md](mailto:gripa@ansp.gov.md):
- 1) nr. de consultații (vizite la medicul de familie) și vizite la domiciliu indiferent de cauză, pe grupe de vârstă;
  - 2) nr. de cazuri înregistrate cu gripă și IACRS, pe grupe de vârstă și gen ;
  - 3) nr. de cazuri spitalizate cu gripă, IACRS și SARI, pe grupe de vârstă și gen;
  - 4) nr. de medici de familie care au raportat;
  - 5) nr. populației la evidență (din listele medicilor de familie care participă la raportare), pe grupe de vârstă;
  - 6) nr. de farmacii;
  - 7) consumul de medicamente simptomatice și specifice tratării gripei și complicațiilor ei;
  - 8) nr. de absențe din grădinițe, școli, licee și unități industriale;

- 9) nr. de concedii medicale de scurtă durată (< 10 zile)/nr. de zile acordate, indiferent de cauză;
  - 10) numărul total de solicitări la serviciile medicale urgente, inclusiv pentru gripă, IACRS, SARI pe grupe de vârstă;
  - 11) nr. total de internări în IMSP teritoriale, indiferent de cauză, pe grupe de vârstă și gen;
  - 12) nr. de decese din cauza gripei, IACRS și SARI pe grupe de vârstă și gen.
  - 13) nr. de exsudate recoltate și trimise la laborator pentru testare la gripă.
- c) Vor participa la monitorizarea circulației virusurilor gripale și non-gripale prin colectarea probelor de laborator, păstrarea și pregătirea pentru transportare în Laboratoarele ANSP.
16. Punctele sentinelă vor colecta probele în zilele de luni (Lu), marți (Ma) și miercuri (Mi) câte un tampon nazo-faringian de la **primul pacient** cu semne clinice compatibile cu gripa, IACRS sau SARI, care s-a adresat după asistență medicală, după cum urmează:
- a) CSP Chișinău cu statut de direcție (mun. Chișinău):
    - IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase pentru Copii Chișinău a 4 probe/săptămână (Lu, Ma, Mi) de la pacienți cu gripă, IACRS și SARI;
    - IMSP Spitalul Clinic Municipal pentru Copii Chișinău nr.1 a 4 probe/săptămână (Lu, Ma, Mi) de la pacienți cu gripă, IACRS și SARI;
    - IMSP Spitalul Clinic Municipal „Sfânta Treime” și IMSP Spitalul clinic municipal ”Arhanghel Mihail” a câte 4 probe /săptămână (Lu, Ma, Mi) de la pacienți cu gripă, IACRS și SARI;
    - IMSP Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Toma Ciorbă” a 4 probe/săptămână (Lu, Ma, Mi) de la pacienți cu gripă, IACRS și SARI;
    - 2 AMT (determinate de CSP Chișinău cu statut de direcție de comun cu Direcția Generală Asistență Socială și Sănătate) a câte 3 probe/săptămână (Ma, Mi) de la pacienți cu gripă și IACRS.

Probele sunt transportate în Laboratorul virusologic, ANSP (mun. Chișinău, str. Alexandru Cosmescu 3) de către instituțiile enumerate.
  - b) CSP cu statut de direcție: Căușeni (r. Căușeni), Comrat (r. Comrat), Edineț (r. Edineț), Orhei (r. Rezina) și Soroca (r. Soroca) - (Lu, Ma); Ungheni (r. Ungheni) - (Ma, Mi) cu colectarea a câte 3 probe/săptămână:
    - 1 CS (desemnat de CSP) – 1-2 probe/săptămână de la pacienți cu gripă sau IACRS;
    - 1 SR – 1-2 probă/săptămână colectată de la pacienți cu gripă sau SARI.
  - c) CSP Bălți cu statut de direcție efectuează investigațiile de laborator în laboratorul microbiologic a câte 3 probe/săptămână (Lu, Ma, Mi) colectate

- în punctele sentinelă din Bălți (1 CS (desemnat de CSP) – 1-2 probe/săptămână de la pacienți cu gripă sau IACRS și SCM Bălți – 1-2 probe/săptămână colectată de la pacienți cu gripă sau SARI). Vor remite anexa nr.4 completată în format EXCEL la e-mail: [gripa@ansp.gov.md](mailto:gripa@ansp.gov.md) în fiecare zi de Luni până la ora 10<sup>00</sup> pentru săptămâna precedentă.
- d) CSP Cahul cu statut de direcție efectuează investigațiile de laborator în laboratorul microbiologic a câte 3 probe/săptămână (Lu, Ma, Mi) colectate în punctele sentinelă din Cahul (1 CS (desemnat de CSP) – 1-2 probe/săptămână de la pacienți cu gripă sau IACRS și SR Cahul – 1-2 probe/săptămână colectată de la pacienți cu gripă sau SARI). Vor remite anexa nr.4 completată în format EXCEL la e-mail: [gripa@ansp.gov.md](mailto:gripa@ansp.gov.md) în fiecare zi de Luni până la ora 10<sup>00</sup> pentru săptămâna precedentă.
17. Perioada de monitorizare a circulației virusurilor gripale, non-gripale și SARS CoV-2 se efectuează pe parcursul anului întreg.
18. Instituțiile medico-sanitare publice și departamentale – puncte sentinelă vor prezenta informația săptămânal privind morbiditatea prin gripă, IACRS și SARI pentru săptămâna precedentă, conform anexei nr.3 a prezentului ordin și vor informa în ziua de Luni (orele 09<sup>00</sup> – 11<sup>00</sup>) CSP teritorial.
19. Agenția Națională pentru Sănătate Publică (Secția supravegherea epidemiologică a gripei și infecțiilor respiratorii virale acute și Laboratoarele):
- Va evalua permanent situația epidemiologică prin gripă, infecții acute ale căilor respiratorii superioare și infecții respiratorii acute severe în Republica Moldova cu elaborarea recomandărilor pentru organizarea măsurilor de sănătate publică;
  - Va analiza datele parvenite din CSP cu statut de direcție și din teritoriile deservite pentru săptămâna precedentă și va elabora raport săptămânal/lunar pe sistemul de rutină și raport săptămânal pe sistemul sentinelă;
  - Va oferi informația inversă „feed-back” IMSP și CSP teritoriale prin e-mail,
  - Va introduce datele în sistemul european de supraveghere (TESSy) și sistemul global (FluNet) ale ECDC și OMS nu mai târziu de ziua de Joi, până la orele 12<sup>00</sup> și va plasa comunicate de presă pe site-ul [www.ansp.md](http://www.ansp.md);
  - Va informa în termen de până la 12 ore Punctul Focal al OMS pentru Regulamentul Sanitar Internațional (2005) la depistarea unui nou subtip de virus gripal.
20. Activitatea gripală va fi monitorizată continuu, prin evaluarea următorilor indicatori:
- 1) Răspândirea geografică:**
- lipsa activității gripale*** - morbiditatea prin gripă aflată în intervalul așteptat cu lipsa cazurilor de gripă confirmate de laborator;

- b. **localizată** - creșterea morbidității peste nivelul așteptat la nivel local (raion) cu confirmări de laborator;
  - c. **activitate regională** - creșterea morbidității peste nivelul maxim așteptat în două sau mai multe raioane din teritoriul de supraveghere (dar mai puțin de 50%) cu confirmări de laborator;
  - d. **situație epidemică extinsă** - creșterea morbidității peste nivelul maxim așteptat în mai multe raioane, cu o populație care cuprinde mai mult de 50% din populația totală a țării, cu confirmări de laborator în toate raioanele în care se înregistrează creșteri ale îmbolnăvirilor;
  - e. **săptămâna epidemică** - creșterea de minim 20% a numărului de îmbolnăviri față de nivelul așteptat (media aritmetică a numărului de cazuri raportate în trei săptămâni anterioare) și/sau cel puțin 10% virusuri gripale aparținând aceluiași subtip izolat din totalul prelevatelor biologice testate;
  - f. **perioada epidemică** - succesiunea a cel puțin 3 săptămâni care îndeplinesc condițiile de mai sus.
- 2) **Tendința bolii** se referă la modificările nivelului de activitate a procesului epidemic, comparativ cu săptămâna precedentă:
- a. **De creștere** - dovadă că numărul cazurilor de boli respiratorii este în creștere, comparativ cu săptămâna precedentă.
  - b. **Neschimbată** - dovadă că numărul cazurilor de boli respiratorii este similar în comparație cu săptămâna precedentă.
  - c. **De descreștere** - dovadă că numărul cazurilor de boli respiratorii este în scădere în comparație cu săptămâna precedentă.
- 3) **Intensitatea** reprezintă un indicator care estimează proporția populației cu boli respiratorii acute, ce includ spectrul maladiilor de la cele similare gripei până la pneumonie:
- a. **Scăzută sau moderată** - creșterea nesemnificativă a proporției populației afectate de boli respiratorii în perioada evaluată.
  - b. **Înaltă** - o mare parte din populație este afectată de boli respiratorii în perioada evaluată.
  - c. **Foarte înaltă** - majoritatea populației este în prezent afectată de boli respiratorii.
- 4) **Impactul** se referă la nivelul de solicitare a serviciilor de sănătate, ca urmare a gripei, IACRS și SARI.
- a. **Minim** - cererile privind solicitarea serviciilor medicale nu sunt mai înalte decât de obicei.
  - b. **Moderat** - cererile privind solicitarea serviciilor medicale sunt mai înalte ca de obicei, dar mai joase de capacitatea maximă a acestor servicii.

- c. *Sever* - cererile privind solicitarea serviciilor medicale depășesc capacitățile acestor servicii.

## VI. Monitorizarea circulației virusurilor gripale și non-gripale

21. Algoritmul de recoltare și investigare a probelor biologice pentru gripă/afecțiunile clinic compatibile cu gripa, IACRS și SARI în punctele sentinelă:
- 1) Laboratoarele ANSP (virusologic, CSP Bălți și CSP Cahul) vor asigura punctele sentinelă cu sisteme universale de transport viral;
  - 2) Personalul medical din IMSP responsabil pentru monitorizarea circulației virusurilor gripale și non-gripale, din punctele sentinelă va asigura colectarea, păstrarea temporară și transportarea prelevatelor biologice la laboratorul bacteriologic al CSP cu statut de direcție, iar pentru Rezina, în punctul de colectare a probelor din r. Rezina;
  - 3) Lucrătorii medicali din punctele sentinelă vor recolta, de la pacienții care întrunesc criteriile definiției de caz pentru gripă, IACRS sau SARI, exsudate nazofaringiene, folosind tampoane standardizate cu mediu viral de transport montate după colectare în eprubete etanșate ermetic (1 tub/1 pacient);
  - 4) Probele vor fi recoltate în primele 4 zile de boală - în caz de gripă, IACRS și până la 10 zile – în caz de SARI;
  - 5) Probele de material cadaveric în cazurile de deces prin SARI se vor colecta în primele ore după deces la autopsie, se vor preleva fragmente de organe (trahee, bronhii, pulmoni, creier - scoarța emisferelor mari) – 1 cm<sup>3</sup>, care se vor amplasa aparte în tuburi sterile cu 2-3 ml mediu de transport viral;
  - 6) Pentru fiecare probă/pacient se va completa buletinul de însoțire (anexa nr.4, a prezentului ordin);
  - 7) Păstrarea temporară a probelor se efectuează la temperatura +2 - +8<sup>0</sup>C până la 3 zile, de la colectare până la transportarea la ANSP (**Nu se permite congelarea!**);
  - 8) Probele colectate se transportă zilnic, cu respectarea cerințelor de biosecuritate (în ambalaj triplu, cu elemente refrigeratoare și cu buletinele de însoțire completate), în laboratorul bacteriologic al CSP cu statut de direcție din punctele sentinelă respective, iar pentru Rezina, în punctul de colectare a probelor în CSP Rezina;
  - 9) CSP Chișinău cu statut de direcție și IMSP nominalizate, vor asigura păstrarea temporară a probelor la temperatura +2 - +8<sup>0</sup>C și săptămânal – joi, până la orele 11<sup>00</sup> – transportarea lor la ANSP, Laboratorul virusologic, mun. Chișinău, str. Alexandru Cosmescu 3, tel: 0-22-72-96-11;

- 10) Punctele sentinelă vor asigura păstrarea temporară a probelor la temperatura +2 - +8°C până la recepționarea lor de către ANSP (persoana numită prin ordinul directorului ANSP), pentru transportarea lor la ANSP, Laboratorul virusologic, mun. Chișinău, str. Alexandru Cosmescu 3, tel: 0-22-72-96-11, conform orarului:
1. Căușeni, Comrat – Marți, orele 08<sup>00</sup>– 15<sup>00</sup>;
  2. Rezina, Soroca și Edineț – Miercuri, orele 08<sup>00</sup>– 17<sup>00</sup>;
  3. Ungheni – Joi, orele 08<sup>00</sup>– 11<sup>00</sup>.
- 11) Personalul laboratoarelor ANSP (virusologic, CSP Bălți și CSP Cahul) vor recepționa probele biologice, vor verifica prezența marcajului respectiv, corectitudinea completării Buletinului de însoțire a probelor, complianța volumului mediului viral de transport.
- 12) Probele biologice vor fi testate în conformitate cu protocolul standard prin tehnici de biologie moleculară (conform anexei nr.5) precum și de izolare a virusurilor gripale și SARS-CoV-2 pe culturi celulare cu expedierea ulterioară a probelor/izolatelor în Laboratorul de Referință la gripă al OMS.
22. Indicatorii de evaluare a performanței sistemului de supraveghere a circulației virusurilor gripale și non-gripale sunt:
- a) Complianța absolută a informației despre caz de boală raportat;
  - b) Respectarea cerințelor la prelevarea, păstrarea și transportarea materialului biologic;
  - c) 100% buletine de însoțire completate corect.

**FORMULAR DE RAPORTARE**  
**privind cazurile de gripă, IACRS și SARI**

Raionul \_\_\_\_\_

Săptămâna \_\_\_\_\_

Periodicitatea prezentării rapoartelor: săptămânal (spt. 40-20), lunar (spt. 21-39), Luni până la orele 11<sup>00</sup>

Nr. de consultații (vizite la medicul de familie) și vizite la domiciliu indiferent de cauză, pe grupe de vârstă:

Total	0-4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani

Denumirea indicatorului	GRIPA							
	Total	Inclusiv		Grupe de vârstă				
		M	F	0 - 4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani
Numărul de cazuri înregistrate								
Numărul bolnavilor spitalizați								
Numărul deceselor								

Denumirea indicatorului	IACRS							
	Total	Inclusiv		Grupe de vârstă				
		M	F	0 - 4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani
Numărul de cazuri înregistrate								
Numărul bolnavilor spitalizați								
Numărul deceselor								

**Supravegherea clinico-epidemiologică la SARI în IMSP teritoriale**

Denumirea indicatorului	Total	Inclusiv		Grupe de vârstă				
		M	F	0 - 4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani
Numărul de internări indiferent de cauză								
Numărul de cazuri SARI (conform definiției de caz)								
Numărul deceselor prin SARI								

Conducătorul instituției \_\_\_\_\_

N.P. (semnătura)

## FORMULAR DE RAPORTARE privind cazurile de gripă, IACRS și SARI în sistemul sentinelă

Raionul \_\_\_\_\_

Săptămâna \_\_\_\_\_

**1) IMSP sentinelă:**

a) Nr. de consultații (vizite la medicul de familie) și vizite la domiciliu indiferent de cauză, pe grupe de vârstă:

Total	0-4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani

b) Numărul de cazuri cu semne clinice compatibile pentru:

Denumirea indicatorului	GRIPA							
	Total	Inclusiv		Grupe de vârstă				
		M	F	0 - 4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani
Numărul de cazuri înregistrate								
Numărul bolnavilor spitalizați								
Numărul deceselor								

Denumirea indicatorului	IACRS							
	Total	Inclusiv		Grupe de vârstă				
		M	F	0 - 4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani
Numărul de cazuri înregistrate								
Numărul bolnavilor spitalizați								
Numărul deceselor								

c) Nr. de medici de familie care au raportat \_\_\_\_\_

d) Nr. populației la evidență (din listele medicilor de familie care participă la raportare), pe grupe de vârstă:

Total	0-4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani

**2) Farmacii \_\_\_\_\_**

*a. Consumul de medicamente uzuale (simptomatice)*

- nr. total unități antibiotice\* orale (capsule, tablete, suspensii) \_\_\_\_\_
- nr. total unități antipiretice\*\* (tablete, supozitoare, suspensii) \_\_\_\_\_
- nr. total unități decongestionante nazo-faringiene\*\*\* (flacoane) \_\_\_\_\_
- nr. total unități antitusive (tablete, flacoane-sirop) \_\_\_\_\_

\*antibiotice + chimioterapice – distribuite (vândute, compensate, gratuite): ampicilina, amoxicilina, augmentin, cotrimoxazol, cephalixin, doxycilina și altele); \*\*antitermice: paracetamol, aspirina, ibuprofen, (inclusiv cele de import);  
\*\*\*decongestionante nazale: bixtonin, picnaz, naftizin, etc).

**b. Consumul de medicamente specifice**

- amantadina -- nr. tratamente \_\_\_\_\_
- rimantadina -- nr. tratamente \_\_\_\_\_
- oseltamivir -- nr. tratamente \_\_\_\_\_
- zanamivir -- nr. tratamente \_\_\_\_\_

**3) Absenteism:**

**a. unități școlare și preșcolare**

- creșe, grădinițe efectiv \_\_\_\_\_, nr. absențe (persoană/zi) \_\_\_\_\_
- scoli efectiv \_\_\_\_\_, nr. absențe (persoană/zi) \_\_\_\_\_
- licee efectiv \_\_\_\_\_, nr. absențe (persoană/zi) \_\_\_\_\_

**b. unitate industrială**

- efectiv \_\_\_\_\_, nr. absențe (persoană/zi) \_\_\_\_\_

**4) Concedii medicale de scurtă durată (<10 zile) acordate de medicii sentinelă, indiferent de cauză**

- număr concedii \_\_\_\_\_ total zile \_\_\_\_\_

**5) Serviciul ambulanță - nr. total solicitări \_\_\_\_\_ din care:**

	Total	0-4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani
Gripa						
IACRS						
SARI						

**Supravegherea clinico-epidemiologică la SARI în IMSP sentinelă**

Denumirea indicatorului	Total	Inclusiv		Grupe de vârstă				
		M	F	0 - 4 ani	5-14 ani	15-29 ani	30-64 ani	>65 ani
Numărul de internări indiferent de cauză								
Numărul de cazuri SARI (conform definiției de caz)								
Numărul deceselor prin SARI								

Conducătorul instituției \_\_\_\_\_

N.P. (semnătura)

### BULETIN DE ÎNSOȚIRE

la produsele biologice pentru diagnosticul de laborator al infecției cu virusurile gripale și SARS-CoV-2  
НАПРАВЛЕНИЕ биологического материала для лабораторной диагностики гриппа и SARS-CoV-2

Instituația medicală (мед. учрежд.) \_\_\_\_\_

Secția (отделение) \_\_\_\_\_

Tel/fax \_\_\_\_\_

Nume, Prenume pacient (Фамилия Имя пациента) \_\_\_\_\_

Vârsta, ani (возраст, лет) \_\_\_\_\_

Sex (пол):  masculin (муж.)  feminin (жен.)

Raionul (район) \_\_\_\_\_

Localitatea (населенный пункт) \_\_\_\_\_

Vaccinat antigripal (вакцинирован)

Nevaccinat (не вакцинирован)

Context:  caz sporadic (спорадический случай)

focar familie (семейный очаг)  organizat (организованный)

neorganizat (неорганизованный)

Debutul bolii, data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
(начало заболевания, дата)

Starea pacientului \_\_\_\_\_  
(состояние пациента)

Necesită terapie intensivă  DA  NU  
Нуждающихся в интенсивной терапии

Intubat (Интубирован):  DA  NU

Se completează de către laborator ANSP

A  Bălți  Cahul Nr. de intrare în lab. \_\_\_\_\_

Data/ora recepționării în Laboratorul virusologic  
(Дата / час поступления в вирусологическая лаборатория)

Data/ora efectuării investigației de laborator  
(Дата / час лабораторного исследования)

Data/ora informării rezultatului la inst. med.  
(Дата / час информирования результата в мед. учрежд.)

Persoana care a recepționat (numele, prenumele)  
(Лицо получившее результат (фамилия, имя))

Exsudat:  nazo-faringian;  nazal;  faringian;  aspirat nazo-faringian;  lavaj traheo-bronșic;  fragm. de organ (deces)

Data prelevării probei (дата забора материала): \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### Notați semnele și simptomele prezente

(симптомы заболевания на данный момент):

Febră (temperatură)	
Debut acut (острое начало)	
Astenie (slăbiciune)	
Mialgii (миалгия)	
Cefalee (головная боль)	
Tuse (кашель)	
Expectorație (с мокротой)	
Dispnee (отдышка)	

T°C max	
Rinită, coriză (ринит)	
Faringită (фарингит)	
Otită (отит)	
Tulburări digestive (расстройства ЖКТ)	_____
alte tulburări, care? (др. расстройства, какие?)	_____

#### DIAGNOSTIC CLINIC (КЛИНИЧЕСКИЙ ДИАГНОЗ):

Gripa (Грипп)

IACRS (ОРВИ)

SARI (ТОРИ)

TRATAMENT ANTIVIRAL  DA  NU  
(ПРОТИВОВИРУСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ):

- oseltamivir

- remantadina

- zanamivir

Data administrării \_\_\_\_\_  
(Дата получения)

Durata administrării \_\_\_\_\_  
(Продолжительность лечения)

Rezultatul de laborator: Tip  A  B

A(H1N1)pdm09  A(H3N2)

B Yamagata  B Victoria

SARS-CoV-2

Negativ

Călătorie în străinătate în ultimele 7 zile  Da  Nu  
(Путешествия за границу за последние 7 дней)

Țările vizitate / Data sosirii în Moldova \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
(Посещенные страны / Дата прибытия в Молдову)

#### Boli cronice asociate (сопутствующие хронические заболевания):

Cardiovasculare (Enumerăți) (Сердечно-сосудистые, перечислить) \_\_\_\_\_

Bronhopulmonare (Enumerăți) (Бронхо-легочные, перечислить) \_\_\_\_\_

Diabet zaharat (tip I/II) (Enumerăți) (Сахарный Диабет (тип I/II, перечислить) \_\_\_\_\_

Alte (Enumerăți) (Другие, перечислить) \_\_\_\_\_

Sarcina (Termenul) (Беременность (срок)) \_\_\_\_\_

Semnătura și parafa medicului (Подпись и печать врача)

**Buletin de analiză a probei biologice pentru detecția virusurilor  
Gripale, Non-gripale și SARS-Cov-2**

Nr. \_\_\_\_\_ din \_\_\_\_\_

<b>IMSP</b>	Trimis de .....			Secția.....	
Nume ..... Prenume ..... Sex ..... Vârsta ..... Tel.....					
Adresa ..... IDNP.....					
Nr. de înregistrare .....					
<b>Tip</b>	<input type="checkbox"/> Tampon nazo-faringian și oro-faringian <input type="checkbox"/> Lavaj bronho - alveolar <input type="checkbox"/> Aspiratul endotraheal <input type="checkbox"/> Aspirat nazofaringian <input type="checkbox"/> Exsudat nazal <input type="checkbox"/> Spută <input type="checkbox"/> Țesut pulmonar <input type="checkbox"/> Ser <input type="checkbox"/> Sânge integrală <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> Scaun				
Recoltat: data..... ora.....      Primit: data..... ora.....					
Conformitate la recepție:    DA <input type="checkbox"/> NU <input type="checkbox"/>					
Detalii.....					

Investigație	Agentul patogen (tip/subtip)	METODA	Data efectuării investigațiilor	REZULTAT	
Detectarea virusurilor gripale de tip și/sau subtip	Inf. A	RT-PCR		<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	A/H1			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	A/H3			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	Inf. B			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	Inf. B/Yamagata			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	Inf. B/Victoria			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
Detectarea virusurilor non-gripale	Parainfluenza	RT-PCR		<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	RSV			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	Adenovirus			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	Coronavirus			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	Metapneumo virus			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
	Bocavirus			<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
Detectarea virusului SARS-Cov-2 (COVID-19)	Rhinovirus	RT-PCR		<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv
				<input type="checkbox"/> Negativ	<input type="checkbox"/> Pozitiv

Concluzie

---



---



---

Medic executor

(Nume prenume, Semnătura)

Validat șef laborator:

(Nume prenume, Semnătura)

## **Regulament privind prelevarea, păstrarea, transportarea, recepționarea, stocarea și investigarea virusurilor gripale și SARS-CoV-2**

### **1. Introducere**

Procedura dată se aplică în Laboratoarele ANSP implicate și responsabile de investigarea virusurilor gripale, SARS-CoV-2 și stabilește modul de prelevare, păstrare, transportare, recepționare, procesare, stocare și decontaminare a probelor biologice de la persoanele suspecte la gripă și alte infecții respiratorii virale acute, inclusiv cele severe în scopul asigurării calității lor pentru diagnosticul de laborator al gripei și/sau SARS-CoV-2 inclusiv altor infecții respiratorii virale.

Procedura este destinată pentru instruirea personalului IMSP, echipelor mobile (tratamentul la domiciliu), implicat în colectarea probelor de la pacienți și expedierea lor în laborator. Probele biologice se vor recolta de la pacienții care întrunesc criteriile definiției de caz suspect.

Prelevarea probelor se efectuează numai de către personalul instruit. Algoritmul de diagnosticare pentru depistarea infecției acute SARS-CoV-2 în rândul persoanelor cu suspiciune clinică – epidemiologică pentru COVID – 19 este stabilit conform Protocolului clinic național (ediția V) PCN-371.

Procedura de recoltare a probelor biologice atât pentru investigarea virusurilor gripale cât și pentru SARS-CoV-2 (COVID-19) se efectuează cu precauție întru respectarea măsurilor de biosecuritate și protecție individuală, stabilite în Instrucțiunea privind măsurile de prevenire și control a COVID-19 în instituțiile medico-sanitare și rezidențiale cu îngrijiri pe termen lung, aprobată prin Ordinul MSMPS nr.388/2020, inclusiv și a Ghidului de biosiguranță de laborator privind infecția coronavirusului de tip nou (COVID-19).

Personalul medical responsabil de prelevarea, păstrarea și transportul probelor biologice va respecta prevederile Ghidului național de reglementare pentru transportul substanțelor infecțioase, aprobat prin ordinul MSMPS nr.389 din 26 martie 2019. Toate probele biologice prelevate vor fi considerate potențial infecțioase. Colectarea corectă a probelor este cel mai important pas în diagnosticul de laborator al bolilor infecțioase.

În stabilirea unui diagnostic rapid și corect depinde foarte mult de calitatea produsului patologic, care poate fi asigurată prin respectarea regulilor de prelevare corectă, condițiilor de păstrare și transportare a biosubstratelor spre laborator.

Ca urmare din momentul recepționării probei biologice – laboratorul verifică corectitudinea buletinului de trimitere cu proba biologică, respectiv înregistrarea și

procesarea primară, post testare proba pozitivă este stocată și la termen limită este decontaminată prin autoclavare.

## **2. Principiul procedurii**

Virusurile gripale și non gripale, inclusiv SARS-CoV-2, afectează în special celulele epiteliale ale tractusului respirator. Calea principală de transmitere o constituie secrețiile tractului respirator. Probele cu material patologic colectat din căile respiratorii au o încărcătură maximă cu celule infectate virologic. Diagnosticul de laborator al gripei și a infecțiilor respiratorii virale acute și severe, inclusiv SARS-CoV-2 (COVID -19) depinde de calitatea probelor biologice, care la rândul său este direct proporțională cu corectitudinea proceselor de colectare, păstrare, transportare și stocare a lor. Prelevarea probelor se efectuează de către personalul medical bine instruit (din cadrul IMSP) de la persoanele cu suspexii la prezența virusurilor menționate. De asemenea, prelevarea probelor se face și de la persoanele cu evoluție severă a infecțiilor respiratorii virale, în special a celor din grupul de risc, dar de la cazurile de deces (material cadaveric).

### **Echipamente**

- Frigider/păstrare probe +4+8 ° C
- Centrifugă refrigeratoare
- Hotă de biosecuritate HBS 2+
- Termometre pentru verificarea condițiilor de mediu și de păstrare a materialelor și probelor
- congelator

Nota: Verificarea metrologică a mijloacelor de măsurare/auxiliare se efectuează o dată pe an de către laboratorul de verificare metrologica desemnat.

### **Consumabile**

- sistem de transport cu mediu de transport pentru virusuri;
- tampoane nazo-faringiene sterile, ambalate individual
- eprubete tip Eppendorf de 1,5 ml
- criotuburi, 5ml, 2,5ml
- stative pentru 96 de tuburi/eprubete de 1,5 ml
- pipete sterile de transfer

### **Reagenți și materiale**

- mediu de transport viral
- alcool 70°;
- soluție - dezinfectant

### **Echipament de protecție**

- Halat de unică folosință
- mască/respirator de unică folosință
- mănuși de unică folosință, nepudrate
- ochelari de protecție

### **Alte materiale**

- suport pentru eprubete;
- foarfece;
- pensetă;
- container cu capac pentru materialul potențial infectat
- coș pentru deșeuri menajere
- creion (cariocă specială) pentru marcarea eprubetelor
- buletinul de însoțire a probei
- registre
- ambalajul secundar pentru probe
- geantă frigorifică cu elemente frigorifice

### **3. Tehnica securității și igiena personală**

Prelevarea probelor se efectuează de către personalul medical bine instruit din cadrul instituțiilor medicale implicate și responsabile de investigarea virusurilor gripale, SARS-CoV-2(COVID-19) care participă la realizarea supravegherea epidemiologică la gripă, infecțiile acute a căilor respiratorii superioare (IACRS), infecțiilor respiratorii acute severe (SARI) și SARS-CoV-2(COVID-19).

Pentru personalul care colectează probe de la pacienți suspecți la gripă și/sau SARS-CoV-2(COVID-19), mențineți un control adecvat al infecției și utilizați echipamentul de protecție personală recomandat (PPE), care include un respirator N95 sau masca dacă un respirator nu este disponibil, neapărat ochelari de protecție pentru ochi, mănuși și costum individual de protecție.

Pentru personalul care nu este implicat direct în colectare, dar manipulează cu materialul biologic (eprubeta cu mediu de transport viral), se vor respecta măsurile standard de precauție. Personalul va purta echipament personal de protecție de unică folosință, ce include halat, mască/respirator, la necesitate ochelari protectivi, mănuși de unică folosință nepudrate.

Notă: pentru a extrage din ambalaj tampon nazo – faringian se utilizează numai mănuși de unică folosință sterile.

### **4. Condițiile de efectuare a procedurii**

Temperatura aerului încăperii –  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$

Umiditatea relativă – nu mai mare de 80%

Temperatura păstrării reagenților/consumabilelor ( $2+8^{\circ}\text{C}$ ), ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) sunt păstrate conform datelor indicat pe ambalaj

Condițiile și termenii de păstrare a probei până la testare – sunt păstrate la frigider ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ) și să nu depășească 72 ore

Temperatura și condiții de păstrare a probelor după testare - congelator ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) timp îndelungat

## 5. ETAPELE PROCEDURII

Înainte de a recolta probele este obligator:

- De a informa pacientul despre modalitatea de prelevare și ordinea în care se vor recolta probele.
- Personalul medical va purta echipament personal de protecție de unică folosință (halat, mască, ochelari de protecție, mănuși).

Prelevarea probelor pentru diagnostic de laborator a infecțiilor virale respiratorii, atât pentru investigarea virusurilor gripale cât și pentru SARS-CoV-2(COVID-19), efectuată de către IMSP:

Colectarea probelor pentru detecția virusurilor gripale se efectuează de la persoanele cu diagnosticul prezumtiv de gripă, IACRS și SARI – stabilite în baza definițiilor de caz.

Recoltarea probelor se va face în sala de proceduri a instituțiilor medicale sau la capul bolnavului în cazuri severe de boală.

Materialul biologic se va recolta în afara meselor, în lipsa aplicațiilor de preparate decongestionante și cu eliberarea cavității nazale și bucale de mucozitate.

**Materialul biologic:** include exsudat nazofaringian combinat (un tampon nazal și un tampon faringian).

**Tampon nazofaringian:** se introduce un tampon cu tija flexibilă prin nara în nazo-faringe (în profunzime cu 3– 4 cm, la adult). Capul pacientului este ușor flexat spre spate. Se lasă câteva secunde, apoi se extrage lent printr-o mișcare de rotație, (pentru al încărcă și a obține celule epiteliale) după care se descarcă în eprubeta cu mediul de transport viral.

**Tampon faringian:** se presează limba cu un fixator/spatulă. Se trece cu atenție în spatele palatului moale pentru a șterge peretele posterior al faringelui, suprafața amigdalelor (prin o rotire ușoară pentru a încărcă cu celule epiteliale). Se evita tamponarea palatului moale și a limbii. Se descarcă tamponul în eprubeta cu mediul de transport viral.

- notați tubul și obligator completați buletinul de însoțire a probei
- probele se înregistrează în Registru de recepție a probelor

Pe buletinul de însoțire a probei biologice se vor menționa datele complete de identificare, data și ora prelevării, tipul probei, analizele solicitate, simptomele clinice, și date relevante (vaccinări, antibiotico-terapie, informații epidemiologice, factori de risc ș.a.). De asemenea, se va indica denumirea instituției medico-sanitare primare; numele, prenumele persoanei care a prelevat proba; e-mail sau număr de telefon. Se indică, de asemenea, dacă proba este colectată, de la persoana încadrat în tratament la domiciliu. Concomitent se va elabora și lista persoanelor pentru care a fost efectuată prelevarea probei cu includerea datelor menționate

Ambele tamponane (nazal și faringian) se vor plasa într-o singură eprubetă sterilă cu mediu de transport viral, se vor rupe capetele externe în punctul de rupere astfel, încât să se închidă eprubeta cu capac.

**În alte cazuri** – Lavaj nazal, lavaj bronhoalveolar, aspirat bronșic

**Aspirat nazofaringeal** - Se aplică pentru cazurile grave de boală

- secrețiile nazofaringeale se aspiră printr-un cateter conectat la un colector de spută/mucus și montat la o sursă vid
- cateterul trebuie să fie inserat într-o nară paralel cu planșeul nazal, secrețiile fiind aspirate prin vacuum, după care cateterul este tras încet înapoi prin mișcări rotative.
- procedura se repetă pentru nara cealaltă în aceeași manieră cu același cateter
- după colectarea mucusului din ambele nări, cateterul se spală cu 3 ml mediu de transport viral

**Lavaj nazal**

- pacientul trebuie să șadă într-o poziție confortabilă cu capul puțin plecat pe spate și i se sfătuia să țină faringele închis pronunțând litera K, atunci când se aplică soluția salină de spălare (de obicei soluție fiziologică)
- folosind o pipetă de transfer, într-un moment dat se aplică câte 1,0-1,5 ml de soluție fiziologică într-o nară
- pacientul apleacă capul înainte și lasă lichidul să se scurgă în ceașcă Petri sau în alt pahar de laborator
- procesul se repetă alternând fiecare nară până se va folosi volumul necesar de 10-15 ml de soluție fiziologică
- lichidul obținut după spălare trebuie divizat în alicote a câte 3 ml și fiecare alicotă trebuie diluată cu mediu de transport în proporție de 1:2

**Material cadaveric**

**În caz de deces**, la necropsie – în primele ore de la deces, în condiții sterile, se vor diseca fragmente de până la 1 cm<sup>3</sup> de trahee, bronhii, plămâni, creier (scoarța emisferelor mari). Fiecare din aceste fragmente se aplică în eprubete separate cu 3 ml mediu de transport

**Păstrarea și transportarea probelor biologice**

Probele cu material patologic trebuie să fie colectate, păstrate și transportate folosind un mediu de transport viral adecvat.

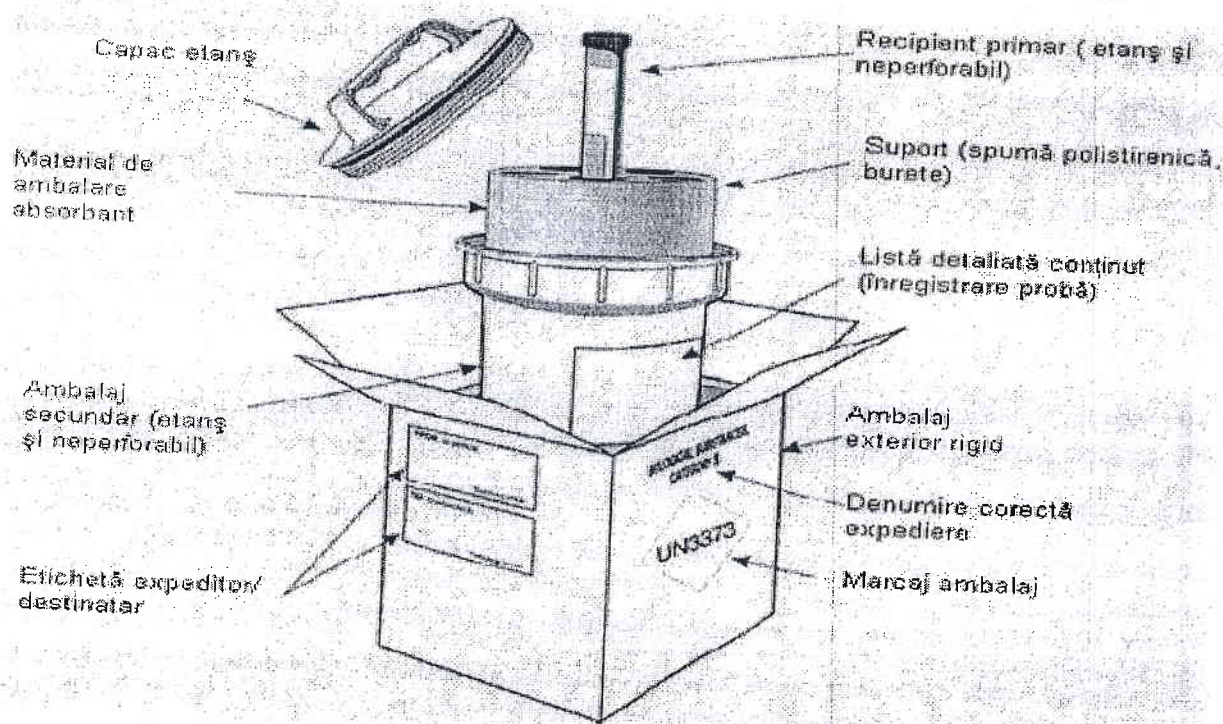
Probele biologice predestinate izolării virusurilor trebuie să fie plasate la frigider la  $+2$  -  $+8^{\circ}\text{C}$  imediat după colectare și transportate operativ (max. 24 ore) spre laborator. Dacă probele nu pot fi procesate în decurs de 48 ore, ele trebuie să fie stocate la  $-70^{\circ}\text{C}$  sau în azot lichid. Nu se permite congelarea/decongelarea repetată a probelor cu scop de a preveni pierderea infectivității.

În general pentru diagnosticul infecțiilor respiratorii virale gripale cât și pentru SARS-CoV-2(COVID-19) păstrarea probelor sunt admisibile următoarele condiții de păstrare a eșantioanelor cu material clinic:

- temperatura – ( $+2$  -  $+8^{\circ}\text{C}$ ) – timp de 24 – 48 ore și plus 24 ore testarea în laborator astfel fiind max. 3 zile (72 ore).
- la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  – nu se admite!
- temperatura – ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) sau azot lichid – termen îndelungat
- este necesar de a evita congelarea/decongelarea repetată a probelor

### Transportarea probelor cu material biologic

- Probele biologice, colectate de IMSP cu material patologic vor fi împachetate în ambalaj triplu (vezi fig. 1) și transportate în geți frigorifice cu elemente refrigeratoare



Ladă frigorifică cu elemente refrigeratoare pentru transportarea probelor biologice împachetate.

- este necesar să se asigure transportarea probelor biologice la temperatura de  $+2$  -  $+8^{\circ}\text{C}$  cât mai rapid după colectare (monitorizarea temperaturii - termometru de control al temperaturii în timpul transportării). La recepționarea probelor în laborator, specialistul responsabil verifică termenii și condiții de transportare.

- buletinele de însoțire a materialului prelevat se vor pune în folie și respectiv în buzunarul exterior al lăzii frigorifice, la prezența acestuia, în alte cazuri buletinele de însoțire trebuie să fie separat de probe
- după transportarea probelor containerele vor fi supuse dezinfectării cu scopul de a preveni o eventuală contaminare.

### **Criterii de rebutare a probelor biologice**

1. Lipsa mediului de transport – tamponate uscate
2. Lipsa tamponatelor și/sau materialului biologic
3. Eprubete din sticlă cu baghete bacteriologice
4. Nerespectarea condițiilor de păstrare, transportare
5. Eprubete deteriorate
6. Eprubete umede –vărsate
7. Probele nu sunt marcate nume prenume, numerotate
8. Necorespunderea datelor de pe eprubete cu cele din buletinele de însoțire
9. Buletine de însoțire necompletate corespunzător/informația insuficientă
10. Probe, colectate de la pacienți care nu întrunesc criteriile definiției de caz suspect

Toate probele, materialul pentru investigații rebutate și cauzele rebutării vor fi înregistrate în registrul rebutării probelor, materialului pentru investigații –  
Forma 388/e

### **Înregistrarea, procesarea, stocarea, transportarea în cadrul laboratorului și decontaminarea probelor**

#### **Înregistrarea probelor, materialului pentru investigații**

Toate probele care corespund cerințelor de prelevare, păstrare, transportare și buletinele de însoțire ale cărora sunt completate corespunzător și corect se înregistrează conform numărului de ordine în Registrul de recepție a probelor și eliberarea rezultatelor investigațiilor virusologice, molecular-biologice (PCR).  
Forma 304/e.

Nota: manipularea probelor primare prezintă risc sporit de infectare a personalului de laborator. Recepționarea probelor se efectuează de către personal instruit pentru manipularea materialului infecțios (proces verbal de instruire). Se respectă regulile de protecție generale.

Înregistrarea probelor în Registrul 304/e în laborator (format pe hârtie) pentru supravegherea epidemiologică la gripă, IACRS, SARI și SARS-CoV-2 (COVID-19) și concomitent datele din buletinul de însoțire se introduc în baza de date a persoanelor investigate la COVID-19 (format electronic EXCEL), utilizat ulterior pentru analiza epidemiologică.

## **Procesarea primară a probelor destinate investigațiilor virusologice**

Procesarea primară a probelor pentru izolarea virusurilor și identificarea tipului/subtipului de virus prin metoda molecular-biologică în timp real (rRT-PCR) se va efectua în hota cu nivel de biosecuritate 2+ (HBS2+) respectând toate regulile de precauție în conformitate cu instrucțiunea de securitate și sănătate în muncă

Probele biologice colectate în eprubete cu mediu de transport viral standardizat (sisteme comerciale de transport viral) procesate cu următorii pași:

1. în stativ se aplică numărul de eprubete Eppendorf de 1,5 ml corespunzător numărului de probe destinate investigării
2. fiecare eprubetă Eppendorf se marchează corespunzător numărului probei respective
3. fiecare eprubetă cu material biologic prelevat se agită minuțios așa, încât materialul colectat să se elibereze de pe tampoane în mediul de transport
4. cu pipetă sterilă Pasteur se vor colecta cca 1-1,5 ml de mediu și se vor transfera în eprubeta Eppendorf (1,5 ml) marcată corespunzător după care se închide capacul eprubetei și a tubului primar.
5. după transferarea probelor în eprubetele Eppendorf stativul cu probele inițiale se pune la frigider
6. stativul cu probele transferate se scoate din HBS 2+ și eprubetele se supun centrifugării la 1500 rpm timp de 10 min
7. stativul se prelucrează și se plasează înapoi în HBS 2+, care, de asemenea se prelucrează cu soluții dezinfectante necorozive, se închide și se include lampa UV pentru 30 min
8. după centrifugare probele din stativ se amplasează la frigider până se fac pregătirile pentru efectuarea extracției
9. după obținerea rezultatelor amplificării se selectează probele pozitive conform criteriilor de selectare a lor pentru expediere și confirmarea rezultatelor
10. în cazul prezenței unui număr adecvat de probe care au trecut criteriile de selectare pentru izolarea confirmarea virusurilor astfel de probe vor fi alicotate și stocate la congelator la -70°C.

### **Materialul cadaveric**

1. fragmentele de trahee, bronhii, pulmon și creier (scoarța emisferelor mari) se omogenizează în eprubetele cu mediu de transport sau soluție fiziologică (NaCl 0,9%) (în cazul fragmentelor de trahee, bronhii și pulmonii se vor aplica presiuni cu un tampon pentru asigurarea eliminării maxime a sucului celular din aceste țesuturi)
2. eprubetele se închid cu capac etanș și se agită minuțios
3. se centrifughează timp de 10 min. la 3000 rpm
4. după centrifugare probele se instalează în stativ și se amplasează în HBS 2+

5. supernatantul se transferă cu vârfuri cu barieră de aerosoli în eprubete Eppendorf de 1,5 ml (la necesitate se alicotează) care se marchează corespunzător numărului probei respective din registru pentru înregistrarea probelor
6. după centrifugare probele din stativ se amplasează la frigider până se fac pregătirile necesare pentru efectuarea extracției
7. alicotele se pun în stativ special și sunt păstrate la congelator la  $t -70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Transportarea probelor în cadrul laboratorului**

Probele care necesită a fi transportate în cadrul laboratorului vor fi instalate în stativ, care se va amplasa în interiorul unui container special marcat destinat acestei acțiuni.

#### **Decontaminarea**

Eprubetele cu tampoane, după selectarea numărului necesar de probe pentru examenul virusologic, dopurile de la eprubete, tampoanele nazofaringiene sunt decontaminate prin scufundarea lor într-un vas cu dezinfectant (concentrația dezinfectantului, timpul de expoziție se stabilește conform instrucțiunii de aplicare a dezinfectantului utilizat). În alt caz, tuburile cu tampoane cu rămășițele de material biologic pot fi amplasate în saci pentru autoclavare și transportate în containere cu pictograma „Pericol biologic” la autoclavare (regimul de decontaminare prin autoclavare:  $121^{\circ}\text{C}$  timp de 20 min – în baza instrucțiunii autoclavului existent în laborator) Alte consumabile folosite la procesarea probelor vor fi colectate într-un ambalaj special și supus, ulterior, procedurii de decontaminare prin autoclavare.

#### **Păstrarea probelor post testare**

**Probele pozitive** se păstrează în crioeprobete plasate într-un stativ special la temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  în congelator închis cu cheia până la confirmarea rezultatelor de laborator național și regional de referința. Iar după obținerea rezultatelor pot fi distruse prin autoclavare.

Nota: acces către congelator pentru păstrarea probelor pozitive este limitat (responsabil pentru păstrare, persoana desemnată de șef de laborator).

Probele sunt păstrate cu numărul de identificare la recepționare probei nr.304/e. Responsabil pentru managementul probelor păstrate sunt înregistrate în Registru de evidența probelor post testare (probe pozitive, probe care prezintă interes științific, care se expediază pentru confirmare (pozitive, negative), se documentează în registru.

### **6. Detectia ARN virusurilor gripale și SARS-CoV-2 (COVID-19) în materialul biologic prin metoda molecular-biologică (PCR)**

Procedura dată se aplică în laboratoarele nominalizate și stabilește funcțiile și obligațiunile de organizare și desfășurare a investigațiilor pentru detectarea ARN virusurilor gripale și SARS CoV-2 (COVID-19) din materialul biologic. Aplicarea metodei se efectuează prin tehnici de biologie moleculară PCR conform cerințelor și recomandărilor OMS.

### **Termeni și definiții**

- Acidul ribonucleic- este purtător specific de informație genetică la ARN-virusuri.
- Reacția de polimerizare în lanț (PCR – Polymerase Chain Reaction) – metoda de amplificare a segmentului specific de ADN cu ajutorul ADN-polimerazei termostabile.

### **Simboluri și denumiri**

ARN – acidul ribonucleic.

HBS - hote de biosiguranță, clasa 2+.

**Principiul metodei:** este destinat detectării ARN virusurilor gripale și SARS CoV-2 (COVID-19) în materialul biologic. Desfășurarea reacției de amplificare se efectuează prin tehnici de biologie moleculară RT-PCR în timp real.

Pentru detecția și caracterizarea ARN virusurilor gripale și SARS-CoV-2 (COVID-19) este optimizată și aplicată metoda prin tehnici de biologie moleculară RT-PCR calitativă. Master Mix-ul reacției pentru fiecare set de primeri este asigurat de la producător cu un certificat de control al calității în care sunt incluse valorile de referință. Pentru efectuarea investigației se utilizează numai consumabile din plastic de unică folosință sterile, marcate „RNase-free, DNase-free”. Tot utilajul de laborator, inclusiv dozatoarele, stativele, vesela de laborator, precum și soluțiile de lucru trebuie să fie strict staționare. Este interzisă deplasarea lor dintr-o încăpere în alta. A lucra numai în mănuși de unică folosință, nepudrate, a folosi și a schimba la fiecare etapă vârfurile de unică folosință cu barieră de aerosoli.

Specificitatea și sensibilitatea: setul pentru detecția ARN virusurilor gripale și SARS-CoV-2 (COVID-19) RT-PCR reprezintă o specificitate și sensibilitate nu mai mică de 98%.

### **Echippinge**

- Amplificator Real Time PCR Systems
- Hotă de biosecuritate HBS 2+
- Vortex
- Termobloc la +70 °C
- Frigider (+4 - +8°C) cu congelator congelator (-20°C)

- Congelator la minus 70 °C
- Stative reci (isorack) pentru microeprubete volumul de 0,2 ml;
- Pipete reglabile cu volume alternative
- Termometre pentru verificarea condițiilor de mediu și de păstrare a materialelor și probelor

Nota: Verificarea metrologică a mijloacelor de măsurare/auxiliare se efectuează o dată pe an de către laboratorul de verificare metrologica desemnat.

### **Reagenți și materiale/consumabile**

Kit pentru amplificare/dectecție (enzimă, primer)

Apă distilată sterilă la nivel molecular liberă de ARN-aze și ADN-aze (RNase și DNase free)

Controlul pozitiv

- Mănuși de protecție de unică folosință, nepudrate;
- Vas pentru deșeurile biologice
- Soluții - dezinfectant;
- Halate de uz unic;

### **Vesela de laborator**

Vârfuri de unică folosință, pentru dozatoare, cu barieră aerolică 10-20-100-200 $\mu$ l și 1000 $\mu$ l;

Eprubete sterile pentru crioconservare de 2 ml

Pipete sterile Pasteur 3,5 ml

Microeprubete de unică folosință din polipropilenă, care se închid ermetic cu volum de 0,2ml pentru PCR (capac plat și transparent, separate)

Marcher de laborator

Container pentru reziduurile biologice

Vas pentru deșeurile biologice cu soluție de dezinfectant

Pentru efectuarea investigației se utilizează numai consumabile din plastic de unică folosință sterile, marcate „RNase-free, DNase-free”. Tot utilajul de laborator, inclusiv dozatoarele, stativele, vesela de laborator, precum și soluțiile de lucru trebuie să fie strict staționare. Este interzisă deplasarea lor dintr-o încăpere în alta. A lucra numai în mănuși de unică folosință, nepudrate, a folosi și a schimba la fiecare etapă vârfurile de unică folosință cu barieră de aerosoli.

**Cerințe față de competența operatorului:** Procedurile pot fi efectuate de către personalul medical instruit în diagnosticul de laborator PCR.

**Tehnica securității și igiena personală:** La efectuarea reacției PCR conform procedurii date este obligatoriu de a respecta cerințele tehnicii securității,

regimului antiepidemic și igiena personală, precum și instrucțiunii de lucru a echipamentului utilizat.

### **Condițiile de efectuare a procedurii:**

Temperatura aerului -  $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$

Presiunea atmosferică - 84-106,7 kPa (630-800 mm. col. Hg)

Umiditatea relativă - nu mai mare de 80%

Intensitatea curentului în rețea -  $220 \pm 22$  V

Frecvența curentului -  $50 \pm 1$  H

- A lucra numai în mănuși de unică folosință – nepudrate, curate – care vor fi schimbate sau cel puțin prelucrate cu soluție dezinfectantă cât mai des în timpul lucrului;
- Suprafețele meselor, precum și încăperile, în care se efectuează manipulațiile necesare pentru reacția PCR, înainte și după lucru trebuie să fie iradiate cu raze ultraviolete timp de 30 de min.
- Suprafețele de lucru, pipetele și centrifugele trebuie să fie curățate și decontaminate cu produse dezinfectante ca Hipoclorit de Na 5%, DNAzap™ sau RNase AWAY® pentru a minimiza riscul contaminării acizilor nucleici;
- Este necesar de a menține reagenții, precum și tuburile de reacție cu capacul închis
- Nu se utilizează reagenți cu termenul de valabilitate expirat;
- Reagenții concentrați se diluează cu grijă pentru a evita orice contaminare;
- Este necesar de a folosi și a schimba după fiecare manipulare vârfulurile cu barieră de aerosoli, de unică folosință din plastic
- (eprubetele, tipsuri) – folosite – vor fi aruncate în containere speciale cu dezinfectant.

### **Efectuarea procedurii pe etape**

Protocolul Real-Time RT-PCR (RT-PCR) pentru detecția și caracterizarea ARN virusurilor gripale și SARS CoV-2 (COVID-19) include kituri de amplificare pentru pregătirea mixului de reacție prin urmare cu montarea probe biologice procesate obținută prin procedura de extragerea a acizilor nucleici pentru a fi utilizată în analiza RT-PCR în timp real întru detecția in vitro calitativă. Ulterior rezultatul obținut din proba biologică expusă testării este citit și evaluat cu eliberare de rezultat.

Pregătirea Boxei – HBS 2+ se prelucrează și se conectează la rețea conform instrucțiunii de exploatare aprobată în modul stabilit. Pregătirea reagenților pentru lucru - în timpul procedurii toți reactivii se țin în stativul rece – IsoFreeze Cold rack. Master Mix-ul: pentru pregătirea mixului per probă se calculează cantitatea fiecărui component din conținutul setului descris.

Calculul se efectuează în modul următor:

**Totul se lucrează pe stativ special rece sau pe gheață! N probe =**

Nr. d/o	Reagenți /per probă	Nr. de teste =
1	<b>Master mix (Exemplu)</b>	
	CoVIR Mix	x = 14 $\mu$ l
	Enzimă Mix*	x = 1 $\mu$ l
	Volum total master mix (mix per proba)	x = 15 $\mu$ l
	RNA sample or controale (PC,NC)	x = 5,0 $\mu$ l
	Volumul total pentru reacție	x = 20,0 $\mu$ l

### Testarea pentru realizarea reacțiilor RT-PCR în timp real

În stativul rece de 96 de godeuri se plasează eprubetele de 200  $\mu$ l conform protocolului de lucru.

- Fiecare mostră de extract ARN este testată/montată cu master mixul pregătit: (ARN virusurilor gripale, SARS CoV-2 (COVID-19))
- Este necesar ca în fiecare reacție să fie inclus Controlul Negativ (NTC – No template control) și Controlul Pozitiv (PTC – Positive template control)
- Controlul probelor (mostrelor) umane (C.I. – controlul intern) asigură un control negativ secundar ce validează procedura de extracție a acizilor nucleici și integritatea reactivilor
- Se determină numărul de probe/mostre, inclusiv controalele pentru realizarea reacției RT-PCR în timp real. Este necesar de a lua în considerație erorile de pipetare, care influențează volumul total al reacției.

### Configurarea reacției

Mixurile se pregătesc în boxa predestinată – Pregătirea mixului de reacție

Mix-urile Reacției de testare reprezintă un cocktail care este distribuit în micro tuburi de 0,2 ml sau în stripuri care se aplică pe placă de reacție cu 96 de godeuri. Se distribuie master mix pregătit conform Instrucțiuni de utilizare a kiturilor.

După distribuirea mixului – placa este transferată în boxa de montarea reacției.

Imediat după centrifugarea probelor (extracție) se distribuie probă ARN conform protocolului descris.

După adăugarea probelor ARN fiecare micro eprubetă sau strip se închide cu capac. Aceasta va preveni cross - contaminarea probelor și va permite de a urmări mersul pe placă. Pozitive template control și Negative template control sunt adăugate în godeurile stabilite conform protocolului de lucru.

Important: NU SE FACE MARCAJ PE CAPACELE MICROEPRUBETELOR!

## Condițiile de amplificare RT-PCR

Volumul total al reacției este în conformitate cu instrucțiunea kitului de utilizare. Amplificatorul se va programa după cum urmează:

<b>EXEMPLU</b>		<b>Durata 1 oră: 31 min</b>
<b>Cicluri</b>	<b>Temperatura / Durata ciclului</b>	
Holding stage	55°C pentru 15 min	
Denaturarea ARN-ului	95°C pentru 2 min	
Amplificarea PCR (45 cicluri)	95°C pentru 5 sec 55°C pentru 25 sec* 67°C pentru 25 sec	

\*Se configurează măsurarea fluorescenței pentru canalele Fam, VIC/Hex, Rox, și Cy5. Rezultatele fluorescenței (**FAM (SARS-CoV-2), VIC/HEX – (IC), ROX – RSV și Cy5– Influenza A/B**) trebuie să fie citite după fiecare etapă de 55°C/25 sec\* a ciclurilor.

\*\*Pentru *QuantStudio5* timpul de extensie se setează – 25 sec; pentru *ABI 7500* – 30 sec.

\*\*\* În setările de corecție a colorațiilor ROX se selectează “none”.

## 7. Interpretarea rezultatelor

Rezultatele sunt citite, interpretate și validate conform instrucțiunii de lucru după cum urmează:

<b>Kit de amplificare</b>	<b>Validarea rezultatelor</b>	<b>Interpretarea rezultatelor</b>
<b>EXEMPLU</b>	Ct. VIC/HEX – control intern CI până la 32 – valid  Ct. FAM ORF1-ab (SARS-CoV-2)  ROX - RSV  Cy5 Influenza A/B	VIC – prezența controlului intern depinde de concentrația rezultatului pozitiv este valid și în lipsa CI – atunci când Ct. concentrație înaltă FAM–Ct.< 40 rez. SARS– CoV-2 –Pozitiv FAM–Ct >40 rez. SARS– CoV-2 – Negativ ROX – Ct.< 40 rez. RSV – Pozitiv ROX –Ct >40 rez. RSV – Negativ

	Citirea rezultatelor până la Ct.40 – pozitiv	Cy5 – Ct.< 40 rez. Influenza A/B Pozitiv Cy5 – Ct>40 rez. Influenza A/B Negativ
--	--	--

Controlul intern al calității este asigurat prin utilizarea marilor inactivi cu conținutul reagenților inclus în setul de amplificare control pozitiv ARN virusurilor gripale, SARS CoV-2 (COVID-19), care conțin genele virusurilor respective, calibrat și standardizat.

Iar în calitate de martor negativ se utilizează apă liberă de DNaze/RNaze.

### **Eliberarea rezultatelor**

Rezultatele investigației sunt interpretate și analizate conform instrucțiunii de utilizare a kitului; prin urmare sunt înregistrate în Registru de evidență și eliberarea rezultatelor investigațiilor virusologice metoda molecular biologică (PCR).

Rezultatele investigațiilor se eliberează prin completarea Buletin de analiză a probei biologice pentru detecția virusurilor gripale, SARS CoV-2 (COVID-19) pe numele solicitantului – conform anexei 5 a prezentului ordin.

Rezultatele eliberate se validează prin semnătura executantului și semnătura șefului de laborator.

### **Controlul extern**

În scopul asigurării calității diagnosticului și monitorizării circulației virusurilor gripale, SARS CoV2 (COVID-19) laboratoarele CSP Cahul și Bălți vor:

- Expedia primele 3 probe pozitive și 5 negative la virusurile gripale și SARS CoV-2 pentru confirmare în laboratorul virusologic ANSP.
- Stoca toate prelevatele biologice pozitive la gripă pentru selectarea și expedierea în laboratorul virusologic ANSP (str. A. Cosmecu 3) pentru confirmarea și subtiparea tulpinilor circulante, care vor fi expediere în laboratorul de referință la gripă al Organizației Mondiale a Sănătății din Londra, Marea Britanie și alte laboratoare de referință prin tehnici de secvențiere.
- La disponibilitatea laboratorului de referință prin tehnici de secvențiere din cadrul ANSP, probele pozitive la virusurile gripale și SARS CoV-2 din laboratorul virusologic ANSP, laboratoarele CSP Bălți și Cahul vor fi procesate și investigate după un algoritm stabilit.

Probele biologice destinate expedierii (2 aliquote/criotuburi pentru fiecare probă, în volum a câte 600-800 mkl fiecare) vor fi însoțite de copia buletinului de însoțire și lista persoanelor investigate cu indicarea datelor conform tabelului.

Nr. d/o	Nume, Prenume pacient	Data, luna, anul nașterii	Instituția care a efectuat testarea	Nr. întregi strare	Nr. epidemiologi c	Data investigat	Ct (pentru fiecare genă/tintă) pu RT-PCR	Denumirea kitului de detecție și producător pentru PCR
---------	-----------------------	---------------------------	-------------------------------------	--------------------	--------------------	-----------------	--	--

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Expedierea probelor în Laboratorul virusologic a ANSP va fi efectuată în decurs de nu mai târziu de 48 ore de la data recolectării probelor, fiind păstrate la temperatura între +2 - +8 °C, sau vor fi stocate probele primare înghețate la temperatura - 70°C.