

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь

Н.П. Жукова

19.12.2018

Регистрационный № 009-1118

АЛГОРИТМ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО
РАССЛЕДОВАНИЯ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ,
СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д.м.н., профессор Амвросьева Т.В.; Богуш З.Ф.; к.б.н. Поклонская Н.В.;
Шилова Ю.А.; Лозюк С. К.; Казинец О.Н.; к.м.н., доцент Кишкурно Е.П.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм молекулярно-эпидемиологического расследования кишечных вирусных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику кишечной вирусной заболеваемости в условиях госпитальной среды.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-эпидемиологов, врачей-инфекционистов, врачей-вирусологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, врачей-гигиенистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарах и/или амбулаторных условиях, а также в учреждениях, осуществляющих государственный санитарный надзор.

Показания к применению:

клинические симптомы острого гастрита, гастроэнтерита, энтерита и других поражений желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся диареей и симптомами интоксикации, которые развиваются у пациента (ов) спустя 24-48 часов после госпитализации либо посещения лечебного учреждения, а также у медицинского персонала в ходе осуществляемой им деятельности.

Противопоказания отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ И РЕАКТИВОВ

Термоциклер с оптическим модулем для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР);

ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;

термостат твердотельный;

микроцентрифуга (1000-14000 об/мин);

миницентрифуга-вортекс;

центрифуга настольная лабораторная (1000-5000 об/мин);

холодильник (от +2°C до +8°C) с морозильной камерой (от -16°C до -20 °C);

дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл);

пробирки пластиковые стерильные типа «Эппендорф» (1,5 мл);

микропробирки для проведения ПЦР, соответствующие типу используемого термоциклера (0,1 мл, 0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз;

наконечники полимерные для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз;

набор для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды;

набор для концентрирования вирусов из бутилированных вод и экстрактов пищевых продуктов;

набор для экстракции и концентрирования вирусов из пищевых продуктов;

набор для отбора проб и концентрирования вирусов из объектов среды обитания человека;

набор реагентов для выделения РНК/ДНК;

набор реагентов для обратной транскрипции;

набор реагентов для выявления ротавирусов (РВ) на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени;

набор реагентов для выявления норовирусов человека 1 и 2 геногрупп (НоВ) на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени;

набор реагентов для выявления астровирусов (АсВ) на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени;

набор реагентов для выявления аденовирусов (АдВ) на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени;

набор реагентов для выявления энтеровирусов (ЭВ) на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени;

набор реагентов для выявления саповирусов (СаВ) на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени;

набор реагентов для выявления парэховирусов (ПЭВ) на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени;

набор для очистки ДНК из геля;

набор для секвенирования;

вода деионизированная, стерильная, свободная от нуклеаз;

3% перекись водорода;

97,4% хлороформ.

1 ТЕХНОЛОГИЯ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

1.1 Метод, изложенный в настоящей инструкции, включает 5 этапов:

- разработка рабочей программы расследования случая(ев) кишечных вирусных ИСМП;

- установление этиологии кишечной инфекции;

- санитарно-вирусологические исследования объектов госпитальной среды (ОГС), воды, пищи;

- молекулярное типирование кишечных вирусов, обнаруженных у пациентов, а также в смывах с поверхностей и экстрактах ОГС, воде, пище;

- сравнительный биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей вирусов, обнаруженных в клиническом и санитарно-вирусологическом материалах.

Схематично алгоритм расследования заболеваемости кишечными вирусными ИСМП представлен на рисунке.

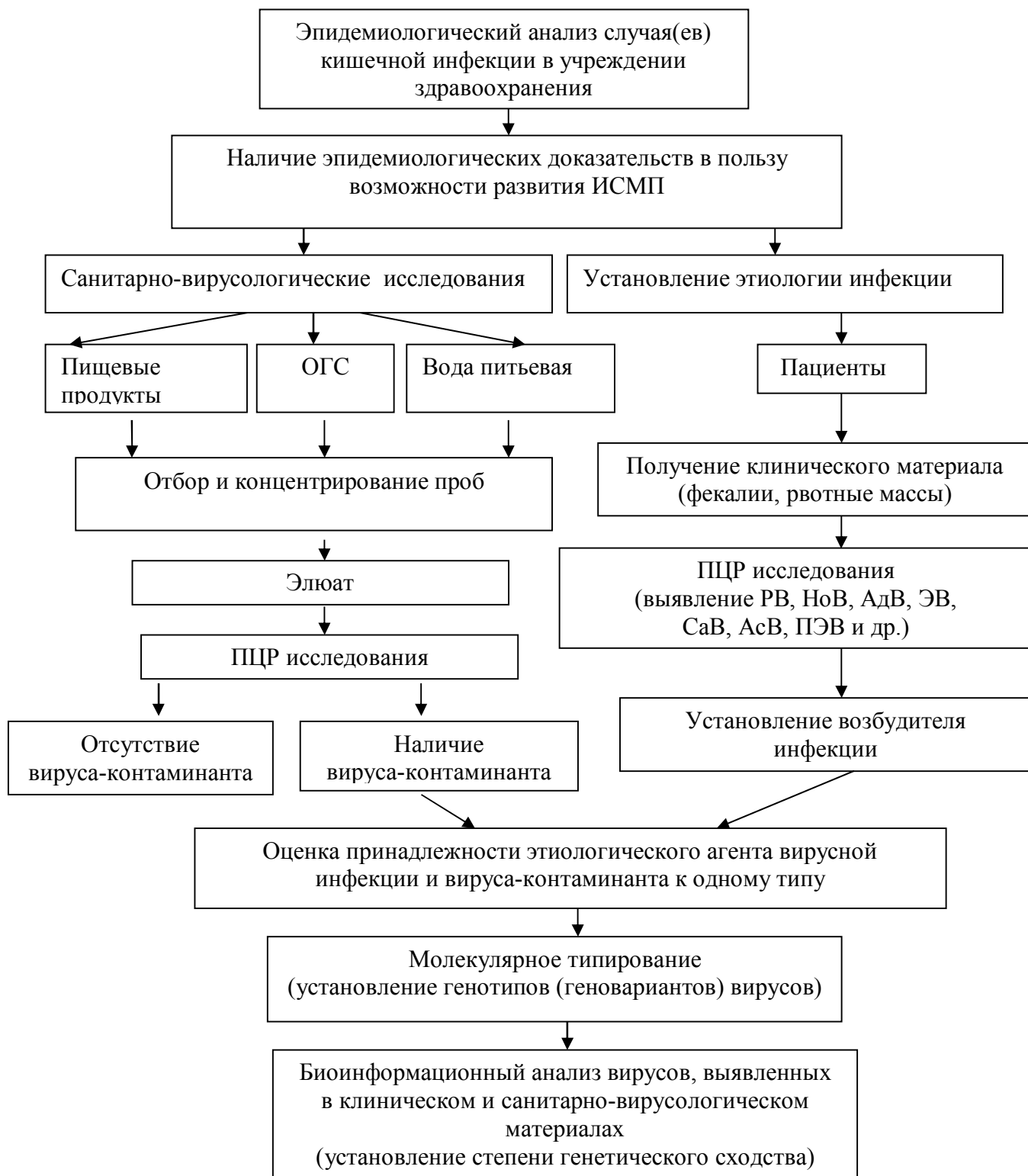


Рисунок - Алгоритм молекулярно-эпидемиологического расследования заболеваемости кишечными вирусными ИСМП

1.2 Рабочая программа расследования случая(ев) кишечных вирусных ИСМП

В каждой конкретной ситуации, указывающей на реальность (риск, возможность) возникновения групповой заболеваемости ИСМП, необходимо разработать рабочую программу, включающую

- перечень лиц, подлежащих лабораторному обследованию:
 - при регистрации единичных случаев заболеваемости кишечной вирусной инфекцией лабораторному обследованию подлежит(ат) пациент(ы), у которого(ых) спустя 24-48 часов после госпитализации, либо посещения лечебного учреждения проявились признаки острой кишечной инфекции, а также медицинский персонал, который в ходе осуществляемой им деятельности находился в контакте с пациентом(ами),
 - в случае регистрации групповой заболеваемости, при наличии эпидемиологических предпосылок о возможности реализации пищевого пути передачи инфекции, обязательному лабораторному обследованию подлежат и работники пищеблока;
- детектируемый возбудитель(ли);
- методы выявления и диагностически значимые маркеры инфекции;
- перечень контролируемых ОГС, включая потребляемую воду и пищу;
- вид и количество исследуемых проб клинического и санитарно-вирусологического материалов;
- кратность исследований;
- критерии анализа и оценки полученных результатов для установления случая(ев) ИСМП.

1.3 УСТАНОВЛЕНИЕ ЭТИОЛОГИИ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ

1.3.1 Объекты исследований

Клиническим материалом при проведении исследований являются образцы фекалий и рвотные массы (с учетом регистрируемых клинических признаков).

1.3.2 Получение образцов клинического материала для исследований

Осуществляют рутинными методами с использованием стерильных одноразовых инструментов в стерильную посуду с завинчивающимися крышками.

1.3.3 Оптимальные сроки получения образцов клинического материала

Получение образцов клинического материала осуществляют в максимально короткие сроки с момента появления клинических симптомов кишечной инфекции.

При регистрации единичных случаев кишечной инфекции клинический материал забирают у всех пациентов. В условиях регистрации групповой заболеваемости клинический материал забирают у всех пациентов, если их количество ≤ 15 , при количестве пациентов от 15 до 30 – не менее чем у 10, при количестве пациентов 30 и более - у 30% от количества заболевших.

1.3.4 Подготовка образцов клинического материала для исследований

Для исследования фекалий готовят их 10% суспензию на изотоническом растворе и осветляют центрифугированием при скорости 7000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отбирают в отдельную пластиковую пробирку.

Нативные рвотные массы не требуют предварительной обработки.

1.3.5 Сортировка образцов

После проведения необходимой пробоподготовки каждый образец 10% суспензии фекалий и нативных рвотных масс делят на 2 аликвоты: одну используют для проведения ПЦР исследований, вторую хранят при температуре минус 16-20°C и при необходимости используют для молекулярного типирования и биоинформационного анализа вирусов.

1.3.6 Перечень детектируемых кишечных вирусов - потенциальных возбудителей кишечных вирусных ИСМП

При регистрации случая(ев) заболеваемости кишечной инфекцией в условиях госпитальной среды в перечень детектируемых кишечных вирусов входят РВ, НоВ, АдВ, ЭВ, АсВ, СаВ, ПЭВ.

ПЦР исследования клинического материала, в зависимости от конкретной ситуации и клинико-эпидемиологических особенностей регистрируемой инфекции, осуществляют в 2 этапа.

1-й этап включает детекцию доминирующих возбудителей кишечных вирусных инфекций: РВ; НоВ; АдВ 40, 41 типов, ЭВ.

2-й этап проводят в случае получения отрицательных результатов на 1-м этапе. Он включает исследования в отношении более широкого спектра возбудителей: АсВ; СаВ; АдВ других типов; ПЭВ.

1.3.7 Детекция кишечных вирусов

Выделение нуклеиновых кислот кишечных вирусов из 10% суспензии фекалий и нативных рвотных масс осуществляют с использованием коммерческих наборов реагентов для выделения РНК/ДНК в соответствии с инструкцией производителя.

Детекцию РНК-содержащих вирусов (РВ, НоВ, ЭВ, АсВ, СаВ, ПЭВ) выполняют методом ПЦР со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР).

Обратную транскрипцию (получение кДНК вирусов) проводят с использованием коммерческих наборов реагентов для обратной

транскрипции в соответствии с прилагаемой инструкцией. Последующую амплификацию полученной вирусной кДНК осуществляют коммерческими наборами реагентов для выявления кишечных вирусов методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени в соответствии с инструкциями производителя.

Выявление ДНК АдВ выполняют методом ПЦР с использованием коммерческих наборов реагентов с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени согласно инструкции по применению.

1.3.8 Интерпретация полученных результатов ОТ-ПЦР/ПЦР исследований клинического материала

В условиях регистрации отдельных случаев кишечной инфекции получение положительного результата является достаточным основанием для признания его (их) этиологическим(и) агентом(ами).

При расследовании групповой заболеваемости кишечной инфекцией критерием установления этиологической роли обнаруженного кишечного вируса является его выявление не менее чем у 30% заболевших.

1.4 САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проводят на основании результатов предварительного эпидемиологического расследования.

1.4.1 Объекты и материал для исследований

При выборе объектов исследований учитывают данные предварительно проведенного эпидемиологического обследования госпитального очага. Смывы с ОГС и экстракты ОГС (мебель, дверные ручки, посуда, одежда, постельные принадлежности, игрушки, телефонные аппараты, компьютерная техника, стены, полы, руки персонала и пациентов, специальное медицинское оборудование или аппараты, разные медицинские приспособления, медицинская спецодежда

и др.) исследуют при регистрации отдельных случаев инфекции, объединенных общим этиологическим агентом, но различающихся по времени возникновения и локализации, что указывает на ассоциацию фактора передачи возбудителя с поверхностями ОГС. Воду и пищевые продукты исследуют при одновременном возникновении случаев кишечной инфекции в разных отделениях лечебно-профилактических учреждений, при массовости регистрируемых заболеваний (групповой характер заболеваемости) с одинаковой клинической картиной и инкубационным периодом, что указывает на наличие централизованного фактора передачи.

Конкретный перечень контролируемых ОГС, воды, пищевых продуктов и кратность их отбора определяют рабочей программой расследования случая(ев) кишечных вирусных ИСМП.

1.4.2 Отбор образцов

Отбор образцов санитарно-вирусологического материала проводят в соответствии с действующими ТНПА:

- смывов с поверхностей и экстрактов ОГС – в соответствии с Инструкцией по применению «Методы отбора и концентрирования проб из объектов среды обитания человека для проведения санитарно-вирусологических исследований» (25.03.2014 № 016-1213) с использованием коммерческих наборов для отбора проб и концентрирования вирусов из объектов среды обитания человека в соответствии с инструкцией производителя;

- воды водопроводной - в соответствии с Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов (12.04.2005 № 134-1204) с использованием коммерческих наборов для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды в соответствии с прилагаемой инструкцией;

• воды питьевой, расфасованной в емкости, и пищевых продуктов – в соответствии с Инструкцией по применению «Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям» (11.06.2009 № 166-1208), ГОСТ 31904-2012 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний, ГОСТ ISO707-2013 Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб» с использованием коммерческих наборов для сбора и концентрирования вирусов из бутилированных вод и пищевых продуктов в соответствии с инструкциями по применению.

1.4.3 Оптимальные сроки отбора образцов санитарно-вирусологического материала

Отбор осуществляют в максимально короткие сроки после получения данных эпидемиологического расследования о возможности возникновения кишечной вирусной ИСМП.

1.4.4 Подготовка образцов для исследований и их сортировка

Элюаты воды, пищи, смывов и экстрактов ОГС, полученные с помощью коммерческих наборов, не требуют дополнительной пробоподготовки.

Полученные элюаты санитарно-вирусологического материала делят на 2 аликвоты: одну используют для проведения ПЦР исследований, вторую хранят при температуре минус 16-20°C и при необходимости используют для молекулярного типирования и биоинформационного анализа вирусов.

1.4.5 Перечень детектируемых кишечных вирусов - потенциальных вирусов-контаминантов госпитальной среды

В случае наличия данных об этиологии регистрируемой заболеваемости кишечной вирусной инфекцией исследования проводят в

отношении установленного(ых) возбудителя(ей). В случае отсутствия таких данных исследования выполняют в соответствии с п.1.3.6.

1.4.6 Детекция кишечных вирусов

Выделение РНК/ДНК кишечных вирусов из элюатов санитарно-вирусологического материала и их детекцию методами ОТ-ПЦР и ПЦР осуществляют в соответствии с п. 1.3.7.

1.4.7 Интерпретация полученных результатов ПЦР исследований

Получение положительного результата ПЦР анализа, указывающего на наличие генетического материала кишечного вируса (РНК/ДНК) в образцах ОГС, воды, пищевых продуктов является достаточным доказательством их вирусной контаминации.

1.5 МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ И БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВИРУСОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ В КЛИНИЧЕСКОМ И САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛАХ

Молекулярное типирование осуществляют в референс-лаборатории. Оно является первым этапом биоинформационного анализа и направлено на установление генотипа/геноварианта кишечных вирусов, выявленных в клиническом материале пациентов и ОГС. Объектами исследований являются аликвоты образцов клинического и санитарно-вирусологического материалов, положительных на наличие РНК/ДНК кишечного(ых) вируса(ов), хранившиеся после сортировки при температуре минус 16-20°C. Транспортирование образцов в референс лабораторию осуществляют при плюс 4-8°C в течение 6-12 ч. В сопроводительных документах для клинических образцов указывают ФИО пациента, возраст, клинический диагноз, дату заболевания, вид

клинического материала, дату его получения, вид пробоподготовки, тип(ы) идентифицированного(ых) вируса(ов); для санитарно-вирусологических образцов – вид санитарно-вирусологического материала, место отбора, дату отбора, вид пробоподготовки, тип(ы) идентифицированного(ых) вируса(ов).

Дальнейшие этапы биоинформационного анализа также осуществляют в референс-лаборатории. Их проводят только в том случае, если по результатам молекулярного типирования установлена принадлежность вирусов, выявленных в клиническом и санитарно-вирусологическом материалах, к одному генотипу/геноварианту. Биоинформационный анализ направлен на получение информации о степени генетического сходства и близкородственности кишечных вирусов, идентифицированных в исследуемых образцах клинического и санитарно-вирусологического материалов, путем проведения дальнейшего их сравнения между собой и с референсными штаммами.

Данные исследования выполняют в соответствии с инструкциями по применению «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции» (11.06.2009 г. № 165-1208), «Лабораторный контроль за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи» (13.06.2013 № 002-0213), «Алгоритм лабораторной диагностики норовирусной инфекции» (25.03.2014 № 014-1213).

1.5.1 Интерпретация результатов

Получение результата, подтверждающего наличие степени генетического сходства нуклеотидных последовательностей (не менее 99,0%) кишечного вируса, обнаруженного в клиническом материале, и кишечного вируса, обнаруженного в санитарно-вирусологическом материале, указывает на наличие молекулярно-эпидемиологической связи

между случаем(ями) кишечной вирусной инфекции и контаминацией ОГС, воды, пищи ее возбудителем.

2 ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

2.1 Возможные проблемы при выявлении кишечных вирусов методом ПЦР

Наличие ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов (в соответствии с критериями, изложенными в инструкции на соответствующую тест-систему) свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Пути устранения ложноотрицательных результатов: при проведении всех этапов исследований необходимо использование одноразовых стерильных пластиковых пробирок и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции; для разведения выделенной НК во избежание загрязнения препарата нуклеазами применяется только стерильная, свободная от нуклеаз вода или соответствующий РНК/ДНК-элюент, входящий в состав набора.

Пути устранения ложноположительных результатов: соблюдение пространственного разделения рабочих зон, использование отдельных наборов посуды, пипеток и отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон; строгий запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую.

2.2 Возможные проблемы при использовании биоинформационных методов анализа

Низкое содержание нуклеиновых кислот в пробах воды, пищи, смывов с поверхностей ОГС, не позволяющее накопить достаточное количество ДНК-мишени для секвенирования.

Пути устранения: проведение ПЦР для накопления секвенируемых фрагментов генома в одной пробирке; использование гнездовой или полугнездовой модификации ПЦР для накопления секвенируемых фрагментов генома; использование реамплификации для накопления секвенируемых фрагментов генома.

3 АНАЛИЗ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В ХОДЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РАССЛЕДОВАНИЯ СЛУЧАЯ(ЕВ) КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИСМП

Для доказательства факта инфицирования пациента(ов) кишечной вирусной инфекцией в условиях госпитальной среды анализируется вся совокупность результатов, полученных в ходе эпидемиологического обследования очага инфекции и выполненных молекулярно-эпидемиологических исследований.

Для отнесения расследуемой кишечной заболеваемости к ИСПМ необходимо наличие следующих данных:

- эпидемиологические доказательства, свидетельствующие о возможности развития ИСМП, полученные в ходе классического эпидемиологического расследования;

- регистрация у пациента(ов) клинических симптомов кишечной вирусной инфекции в виде острого гастрита, гастроэнтерита, энтерита и других поражений желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся диареей и симптомами интоксикации, которые появились спустя 24-48 часов и более после их госпитализации, а также у медицинского персонала в процессе осуществляемой им деятельности;

- лабораторное подтверждение вирусной этиологии кишечной инфекции и установление ее возбудителя(ей);

- лабораторное подтверждение контаминации объектов госпитальной среды возбудителем(ями) регистрируемой заболеваемости кишечной вирусной инфекцией;

- молекулярно-эпидемиологическое подтверждение высокой степени генетического сходства (не менее 99,0%) кишечных вирусов, выявленных в клиническом и санитарно-вирусологическом материалах.