

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь

О.В. Арнаут

«13» декабря 2011г.

Регистр. № 020-12 11



**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР
ЗА РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

Инструкция по применению

Учреждение–разработчик:

Государственное учреждение «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»

Авторы:

В.Г. Гудков, Г.Н. Чистенко, Е.Г. Фисенко, И.А. Карабан, А.А. Ключарева,
А.С. Вишинская, К.Ю. Плотникова, В.В. Запольская, Д.В. Малявко, Ю.В.
Новацкая.

Минск 2012

НАЗНАЧЕНИЕ ИНСТРУКЦИИ

1. Настоящая Инструкция «Эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией» (далее - Инструкция) определяет содержание и порядок осуществления мероприятий и лабораторных исследований, направленных на повышение эффективности контроля ротавирусной инфекции (далее – РВИ) в республике.

2. Инструкция предназначена для специалистов организаций и учреждений Министерства здравоохранения Республики Беларусь (далее – Минздрав), осуществляющих эпидемиологический надзор, лабораторную диагностику, молекулярно-эпидемиологический и серологический мониторинг, противоэпидемические и профилактические мероприятия в отношении РВИ.

3. При решении вопросов эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики, противоэпидемических, профилактических и др. мероприятий в отношении РВИ, не получивших отражения в настоящей Инструкции, следует руководствоваться нормативными правовыми актами и техническими нормативными правовыми актами Минздрава в отношении группы острых кишечных инфекций (далее - ОКИ).

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4. Случаи РВИ подлежат учету в организациях здравоохранения согласно перечню подлежащих учету нозологических форм ОКИ в соответствии с Международной классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра: Ротавирусный энтерит - A08.0.

5. Стандартное определение клинического случая заболевания РВИ - острое инфекционное заболевание различной степени тяжести, характеризующееся поражением тонкого кишечника, болями в животе, симптомами интоксикации, диарейным синдромом, в большинстве случаев лихорадкой и рвотой, в части случаев – наличием предшествующего острого респираторного синдрома.

6. Эпидемиологически подтвержденный случай - соответствует стандартному клиническому определению и имеет четкую эпидемиологическую связь с лабораторно подтвержденным случаем заболевания.

7. Окончательная классификация случая РВИ: соответствует стандартному клиническому определению и имеет лабораторное подтверждение диагноза.

8. Стандартное определение случая носительства этиологического агента РВИ (ротавирусов) – лабораторно подтвержденное выделение

(экскреция) ротавирусов при отсутствии клинических признаков заболевания у этого лица (носителя).

9. Этиологический агент (ротавирус человека) относится к семейству Reoviridae, роду Rotavirus. Вирусный геном состоит из 11 сегментов двухцепочечной РНК. В процессе коинфекции сегментированный геном ротавирусов легко образует реассортанты, в том числе межвидовые, что обуславливает высокую генетическую изменчивость вируса.

Молекулярно-биологическая структура ротавирусов является основой их классификации: одна из них учитывает варианты нуклеотидной последовательности всех 11 сегментов генома, другая, более распространенная - биномиальная классификация ротавирусов по Р и G типам. Существуют десятки генетических вариантов структурных белков вириона VP7 (G-тип) и VP4 (Р-тип) и их комбинаций (G-Р-тип), характеризующих антигенную структуру вириона и определяющих адекватную структуру противовирусных иммунобиологических препаратов.

Ротавирусы обладают энтеротропностью и в процессе инфекции интенсивно реплицируются в ворсинках тонкого кишечника, при этом концентрация вирионов в экскретах достигает 10 - 12lg и более в грамме фекалий. Вместе с тем, они плохо культивируются в клеточных культурах.

Ротавирусы отличаются стабильностью во внешней среде (месяцы и годы при низких температурах), устойчивостью к эфиру, хлороформу, детергентам, рН до 9,0, ряду дезинфектантов, однако они чувствительны к фенолу, крезолу, формальдегиду, этиловому спирту, перекиси водорода. Высокая резистентность ротавирусов обуславливает предпочтительность использования в очагах РВИ дезинфектантов с установленной эффективностью в отношении именно этого возбудителя.

10. Эпидемический процесс РВИ с системных позиций рассматривается, как процесс взаимодействия популяций человека и ротавирусов в определенной природной и социально-экономической среде, и в конкретный период времени.

Важным свойством эпидемического процесса, производным дискретности взаимодействующих популяций, является его относительная автономность, обусловленная действием в определенный период времени и на конкретной территории совокупности эпидемиологически значимых факторов. Это проявляется неодинаковыми показателями заболеваемости в регионах, на отдельных территориях, в разных коллективах, а также различающимися уровнями иммунной прослойки населения к вирусу.

Автономность эпидемического процесса обуславливает возможность управления им на ограниченных (локальных) территориях.

11. Эпидемиологический надзор осуществляется в соответствии с территориально-факторной концепцией эпидемиологического надзора, со-

гласно которой эпидемический процесс следует рассматривать в совокупности трех основных взаимосвязанных аспектов - территориального, факторного и временного.

Суть территориального аспекта обусловлена автономным характером эпидемического процесса и заключается в проведении эпидемиологического анализа заболеваемости и осуществлении других функций эпидемиологического надзора на определенных участках территорий различного масштаба, границы которых обуславливаются логикой эпидемического процесса.

Факторный аспект заключается в том, что эпидемиологический анализ и оценка ситуации должны проводиться на основе выявления факторов риска и учета объективных критериев характера эпидемического процесса. Это, например, величина иммунной прослойки в популяции, интенсивность циркуляции вируса и его свойства, уровень санитарно-гигиенического состояния территории и эпидемиологически значимых объектов, санитарно-гигиенических знаний и навыков населения, концентрация эпидемиологически значимых ксенобиотических факторов, социально-экономические факторы и др.

Временной аспект эпидемиологического надзора предполагает адекватную «привязку» его осуществления к реальному времени течения эпидемического процесса и прогнозируемым изменениям.

12. С целью рационального использования сил и средств санитарно-эпидемиологической службы (далее санэпидслужба) и адекватного распределения функций эпидемиологический надзор за РВИ по научно-техническому (технологическому) и кадровому потенциалу разделяется на 3 основных уровня. Первичный – осуществляют, как правило, организации санэпидслужбы районного и зонального звена; квалифицированный - областного; специализированный – республиканские и имеющие соответствующий потенциал областные организации санэпидслужбы.

ГЛАВА 2 ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА РВИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

13. РВИ, как и другие кишечные инфекции, имеет фекально-оральный (основной) механизм передачи инфекции, считается возможным наличие дополнительного, аэрогенного, механизма передачи.

Двойственный механизм передачи определяет многообразие путей и факторов распространения инфекции: контактно-бытовой, водный и пищевой с множеством факторов передачи, а также воздушно-капельный (аэрозольный).

14. Источником инфекции являются инфицированные люди – больные манифестной или субклинической формой инфекции, а также вирусоносители. Считается, что инфицирующая доза возбудителя составляет около 100 вирусных частиц, в то время как в 1 г фекалий источника инфекции может содержаться более 100 миллиардов таких доз.

15. Инкубационный период заболевания длится от 10-12 часов до 7 дней, чаще всего – 1-2 дня. При этом ротавирусы обнаруживались в испражнениях 50% заболевших за одни сутки, у 31% - за двое суток и у 9% - за 3-5 суток до появления первых клинических проявлений заболевания.

16. Факторами повышенного риска заболевания являются: возраст до 6 и особенно 2-3 лет, искусственное вскармливание младенцев, пребывание в педиатрических, особенно инфекционного профиля, стационарах, родильных домах, в очагах инфекции, в условиях с низкими санитарными стандартами, а также недостаток санитарных знаний и навыков.

17. РВИ является среднераспространенным инфекционным заболеванием в Республике Беларусь (менее 100 случаев на 100 тыс. населения во всех регионах страны).

Удельный вес РВИ в структуре ОКИ в республике составляет около 30 – 35%. При этом различия уровней регистрируемой заболеваемости РВИ на отдельных административных территориях в основном обуславливаются соответствующей организацией лабораторной диагностики и регистрации заболевания.

Эпидемический процесс обладает многолетней и сезонной цикличностью. Многолетняя цикличность РВИ в республике характеризуется спадами и подъемами заболеваемости с периодичностью 1-2 года. Годовая динамика характеризуется сезонным подъемом в течение 5-6 месяцев, обычно с декабря по май, в отдельные годы начало сезонного подъема смещается на январь – февраль месяцы.

Пики заболеваемости приходятся на февраль – март, в эпидемиологически неблагоприятные годы они в основном регистрируются в феврале, в более благополучные смещаются на март. Годовая динамика заболеваемости в годы эпидемического неблагополучия характеризуется более ранним началом, большей интенсивностью и продолжительностью сезонного подъема. В годы относительного благополучия сезонными факторами обуславливается, примерно, до 40% заболеваний, а в эпидемиологически неблагоприятные - до 60% и более.

Интенсивность эпидемического процесса может возрастать за счет круглогодично действующих факторов. Круглогодичная заболеваемость и сезонный подъем формируются при участии всех возрастных групп населения. Однако среди детей в возрасте 1-2 лет регистрируются наиболее высокие показатели заболеваемости, сезонный подъем характеризуется

более ранним началом, наибольшей продолжительностью и интенсивностью, что говорит о формировании эпидемического варианта возбудителя и наиболее интенсивном его распространении именно в этой возрастной группе.

Контингентом риска по заболеванию РВИ является детское население. Наиболее уязвимой возрастной группой, удельный вес которой достигает 90% и более, являются дети в возрасте от 0 до 6 лет.

Максимальные показатели заболеваемости регистрируются у детей в возрасте от 1 года до 2 лет (их удельный вес составляет около 50%), минимальные – у детей 7-14 лет и взрослых.

Чаще болеют т.н. неорганизованные дети, удельный вес которых составляет более 60%. Пол ребенка не связан с частотой этого заболевания.

Хотя РВИ присуща вспышечная (групповая) форма эпидемического процесса, в республике регистрируются только единичные локальные вспышки инфекции с контактно-бытовым путем передачи возбудителя, в основном в детских дошкольных учреждениях, источником инфекции являлись первые заболевшие дети.

РВИ присуще также вирусоносительство среди персонала детских инфекционных больниц, педиатрических стационаров, родильных домов, беременных женщин и обусловленное этим внутрибольничное инфицирование. По данным, полученным в странах Евросоюза в течение одного календарного года, 26-31% детей, поступающих на стационарное лечение, переносят внутрибольничную РВИ. В период сезонного подъема эта цифра возрастает до 50%. В Республике Беларусь подобные явления не регистрируются.

18. Бремя РВИ. В стационарах республики по поводу РВИ госпитализируется около 90% и более пациентов из всех зарегистрированных случаев этого заболевания. В возрастной структуре этих пациентов примерно 85 – 90% занимают дети в возрасте от 0 до 4 лет.

Бремя РВИ, как доля этой патологии в структуре ОКИ среди всех госпитализированных в течение календарного года детей, определенное по методике ВОЗ, составляло 54,0%, при этом минимальное значение показателя (16,9%) наблюдалось в сентябре, а максимальное (77,2%) - в марте.

Бремя РВИ для возрастных групп 0 - 4 года, 0 – 6 лет и 0 – 14 лет составляло 56,8%, 56,2% и 54,3% соответственно. Эти показатели свидетельствуют о выраженном бремени РВИ и целесообразности ее массовой иммунопрофилактики в республике.

19. Генотипическая характеристика популяции ротавирусов. Типирование изолятов ротавирусов проводится по генам, кодирующим струк-

турные белки вириона VP4 (Р-тип) и VP7 (G-тип), участвующие в реакции нейтрализации возбудителя при взаимодействии с антителами к ним.

Результаты генотипирования изолятов ротавирусов хранятся, систематизируются и анализируются в пополняемом электронном информационном ресурсе «Характеристика изолятов ротавирусов, выделенных в Республике Беларусь» для использования организациями здравоохранения республики.

Циркулирующая в республике популяция ротавирусов генетически многообразна и в 2005 - 2010гг. в основном была представлена 8 вариантами G-Р-типов возбудителя. Чаще всего в этот период выявлялись 4 генетических варианта вируса. Доминирующими являлись возбудители с биноминальной формулой G4P[8] и G2P[4]. Два других (G1P[8] и G3P[8]) встречались реже, остальные G-Р типы (G3P[9], G4P[4], G4P[6] и G9P[8]) обнаруживались значительно реже и не каждый год.

Удельный вес различных генотипов вируса на протяжении этого периода изменялся, выявлялись новые генотипы вируса. В 2011 г. в г. Минске доминировал вариант G3P[8]. Подобные изменения типовой структуры популяции ротавирусов могут являться причиной существенных всплесков уровня заболеваемости населения.

ГЛАВА 3 ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

20. Окончательный диагноз РВИ устанавливается после лабораторной верификации.

21. Лабораторная диагностика РВИ осуществляется в сжатые сроки, обеспечивающие эффективное использование результатов исследования в клинической практике и своевременную регистрацию случая заболевания.

22. Лабораторная диагностика РВИ, как правило, основана на выявлении ротавирусного антигена в фекалиях больных. Экскреция ротавирусов может быть выявлена в течение 5-7 дней от начала заболевания, нередко она продолжается дольше. Наиболее подходящим методом диагностики является иммуноферментный анализ (далее - ИФА), используемый с подтверждающим (конфирматорным) тестом.

В экстренных случаях, а также при отсутствии специализированной лаборатории и небольшом объеме исследований может быть использован иммунохроматографический экспресс-метод исследования (далее - ИХМ) с подтверждающим (конфирматорным) тестом. Однако чувствительность этого метода ниже, чем ИФА.

Раннее выявление ротавирусного антигена может быть осуществлено в мазках и слизи из носоглотки, при наличии острого респираторного

синдрома, нередко предшествующего типичной клинической картине энтерита. Эти исследования выполняются методом полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР) или методом флюоресцирующих антител (далее - МФА) согласно инструкциям по применению соответствующих диагностических наборов.

22.1. Выявление маркеров возбудителя в объектах внешней среды проводится методом ПЦР в соответствии с инструкциями по применению зарегистрированных в республике наборов, допускается проведение аналогичных исследований методом ИФА.

22.2. Порядок организации исследований по выявлению ротавирусов в объектах внешней среды, порядок отбора проб, методы их обработки, доставки, хранения аналогичны для группы кишечных вирусов и проводятся в соответствии с инструкциями по применению: «Инструкция по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов», регистрационный №134-1204, утверждена заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 12 апреля 2005г.; «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов», регистрационный №112-1210, утверждена заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 4 декабря 2010г.; «Инструкция по санитарно-вирусологическому контролю пищевых продуктов», регистрационный №123-1005, утверждена заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 28 декабря 2005г.

23. Типирование изолятов ротавирусов по G-P-типам осуществляется с помощью мультиплексной ПЦР согласно приложению 1 к настоящей Инструкции, молекулярно-биологическое типирование ротавирусов по другим маркерам – методом секвенирования и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей генома.

24. Заболевание РВИ и вакцинация против нее индуцируют образование антител к ротавирусам классов А, М, G. Определение антител к ротавирусам в сыворотке крови или слюне используется для оценки распространенности инфекции в популяции (суммарные антитела или IgG), оценки эффективности вакцинации (антитела классов А, G), в необходимых случаях – для верификации этиологии заболевания (IgM, IgA).

Определение антител (суммарных и классов А и М) к ротавирусам проводится методом ИФА согласно приложению 2 к настоящей Инструкции.

Определение G-P-типоспецифических антител к ротавирусам в сыворотках крови определяется методом нейтрализации тест-штаммов рота-

вируса, адаптированных к культуре клеток согласно приложению 3 к настоящей Инструкции.

25. Диагностические исследования по выявлению антигенов ротавирусов в экскретах методом ИХМ могут выполняться лабораториями любого уровня, проведение тех же исследований методом ИФА предполагает наличие в лаборатории соответствующего комплекта оборудования и квалифицированного персонала.

Иммунологические исследования методом ИФА и в культуре клеток относятся к квалифицированному научно-техническому (технологическому) уровню эпидемиологического надзора за РВИ и могут проводиться в областных центрах гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья и др. организациях санэпидслужбы, имеющих соответствующий потенциал.

Молекулярно-биологические исследования относятся к специализированному научно-техническому (технологическому) уровню эпидемиологического надзора за РВИ и выполняются в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

ГЛАВА 4 ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР

26. Целью эпидемиологического надзора за РВИ является эпидемиологическая диагностика эпидемического процесса и разработка на ее основе рекомендаций по проведению организационных, санитарно-гигиенических, противоэпидемических, лечебно-профилактических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости населения, предотвращение групповых заболеваний.

27. Эпидемиологический надзор за РВИ осуществляется по принципам организации эпидемиологического надзора за группой ОКИ с учетом особенностей РВИ.

28. Особенности РВИ, как объекта эпидемиологического надзора:
повсеместная распространенность заболевания и высокая заболеваемость детей младшего возраста;

двойственный механизм передачи - фекально-оральный (основной) и аэрогенный;

множественность путей и факторов распространения инфекции, адекватные механизмам заражения: контактно-бытовой, водный и пищевой с множеством факторов передачи, а также воздушно-капельный или аэрозольный;

выраженная сезонность, групповая и вспышечная формы эпидемического процесса, внутрибольничное инфицирование;

тяжелое течение заболевания и высокий уровень госпитализации,

повторные случаи заболевания, обусловленные нестойким и, возможно, типоспецифическим иммунитетом;

массивное и продолжительное выделение высоко устойчивого к факторам внешней среды, в т.ч. дезинфектантам, и высоковирулентного вируса переболевшими и вирусоносителями;

высокая изменчивость возбудителя, серологическое (типовое) многообразие, периодическая смена циркулирующих штаммов;

наличие специфической лабораторной диагностики, включая генотипирование возбудителя;

существование средств иммунопрофилактики этой инфекции.

29. Система эпидемиологического надзора за РВИ состоит из двух основных частей (подсистем) – популяционного и дозорного эпидемиологического надзора и включает общие для них подсистемы: информационную, эпидемиолого-диагностическую и управленческую.

30. Задачи подсистемы популяционного эпидемиологического надзора:

регистрация и учет случаев заболевания РВИ среди населения подконтрольной территории;

формирование государственной статистической отчетности об уровне заболеваемости РВИ на подконтрольной территории;

анализ и оценка общих эпидемиологических закономерностей распространения РВИ на подконтрольной территории;

контроль и предупреждение возникновения вспышечной заболеваемости РВИ в детских воспитательно-образовательных учреждениях, организациях здравоохранения, в которых осуществляется лечение и реабилитация детей, родовспомогательных учреждениях.

31. Дозорный эпидемиологический надзор (далее - ДЭН) – целевое, контрольно-выборочное, конкретизированное по параметрам наблюдения (контингенту, территориям, объектам, объему, задачам, методам) слежение за динамикой эпидемического процесса с последующим анализом полученной информации и выработкой на этой основе прогноза и рекомендаций по управлению эпидемическим процессом.

32. ДЭН за РВИ осуществляется среди детей в возрасте до 7 лет включительно, госпитализированных для лечения этого заболевания в областных центрах Республики Беларусь и г. Минске. Клинической базой для проведения ДЭН является инфекционная больница (отделение), обслуживающая весь поднадзорный контингент населения на подконтрольной территории. Допускается использование двух или более клинических баз, обслуживающих весь поднадзорный контингент населения на подконтрольной территории.

33. Задачи подсистемы дозорного эпидемиологического надзора:

формирование специализированной информационной базы эпидемиологически значимых данных о случаях заболеваний РВИ;

формирование банка изолятов ротавирусов, выделенных на территории республики и информационной базы данных об их молекулярно-биологических свойствах;

проведение специализированных выборочных эпидемиологических, молекулярно-эпидемиологических, иммунологических и др. исследований с целью выявления особенностей эпидемического процесса РВИ и разработки эффективных противоэпидемических и профилактических мероприятий;

выявление закономерных причин и условий распространения инфекции на подконтрольной территории, определение конкретных путей и факторов передачи возбудителя с помощью факторного анализа;

разработка противоэпидемических и профилактических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости РВИ и предотвращение групповой и вспышечной форм эпидемического процесса;

оценка эффективности противоэпидемических и профилактических мероприятий на подконтрольной территории.

34. Порядок сбора информации в подсистеме дозорного надзора:

34.1. Сбор информации по случаям заболевания РВИ осуществляется выборочно в соответствии с персонифицированной картой пациента с РВИ (приложение 4). Отобранный случай РВИ должен соответствовать двум или более приведенным ниже критериям:

Средняя или тяжелая степень клинического течения заболевания;

Возраст больного до 2 лет включительно; пребывание за пределами территории Республики Беларусь в течение 7 дней до начала заболевания.

34.2. Региональная база данных формируется в областных ЦГЭ и ОЗ, Минском городском ЦГЭ.

35. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии:

проводит специализированные молекулярно-биологические (генотипирование ротавирусов) и иммунологические исследования в области РВИ;

формирует банк изолятов ротавирусов, выделенных на территории республики и ведет информационную базу данных «Характеристика изолятов ротавирусов, выделенных в республике» (регистрационное свидетельство № 1761000917 от 15.07.2010г. в государственном регистре информационных ресурсов);

вносит в персонифицированные региональные базы или направляет в областные ЦГЭ и ОЗ сведения о результатах молекулярно-

биологических (генотипирование ротавирусов) и иммунологических исследований.

36. Национальная база данных формируется и ведется в РЦГЭ и ОЗ, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

37. Отбор проб биологических образцов для молекулярно-биологических и иммунологических исследований проводится в детских инфекционных стационарах (отделениях) от пациентов, включенных в систему ДЭН.

Количество необходимых для исследования проб и сроки доставки определяются по согласованию с РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Отбор, хранение и доставка проб осуществляется в соответствии с приложением 5 к настоящей Инструкции.

38. Эпидемиолого-диагностическая подсистема обеспечивает анализ и оценку эпидситуации (ретроспективный и оперативный эпидемиологический анализ) на подконтрольной административной территории на основе получаемой информации.

39. Территориальные (районные, зональные) ЦГЭ проводят эпидемиологический анализ по следующим направлениям:

39.1. Оперативный эпидемиологический анализ:

ежедневный анализ поступающих экстренных извещений с первичным диагнозом РВИ, ОКИ в целях выявления возможных очагов групповой заболеваемости в детских организованных коллективах;

анализ вероятных путей и факторов распространения инфекции в очагах групповой заболеваемости РВИ, ОКИ (2 и более случаев) и при других локальных эпидосложнениях по типу «случай-контроль».

39.2. Ретроспективный эпидемиологический анализ:

ежемесячная, ежегодная оценка уровня заболеваемости относительно среднемноголетних данных с учетом фазы эпидемического цикла для подконтрольной территории;

ежемесячная, ежегодная оценка годовой динамики, возрастной структуры и очаговости заболеваемости.

40. Региональные (областные ЦГЭ и ОЗ и Минский городской ЦГЭ) осуществляют эпидемиологическую диагностику на основе информации подсистем популяционного и дозорного надзора, включая оценку:

уровня, территориального распределения и динамики заболеваемости в разрезе возрастных и социальных групп;

сезонного распределения заболеваемости;

действующих путей распространения и факторов передачи инфекции (на основе выборочных исследований по типу «случай-контроль» в соответствии с приложением 6 к настоящей Инструкции);

бремени РВИ, эпидемиологической эффективности профилактических мероприятий, в том числе применения иммунобиологических препаратов.

41. Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья:

проводит эпидемиологическую диагностику эпидемического процесса РВИ в масштабах республики на основе информации областных ЦГЭ и ОЗ и Минского городского ЦГЭ;

определяет необходимость проведения специальных эпидемиологических исследований в масштабах республики и (или) отдельных регионов;

оценивает бремя РВИ, эпидемиологическую эффективность профилактических мероприятий в масштабах республики.

42. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии:

анализирует результаты молекулярно-эпидемиологических исследований по генотипированию ротавирусов, определяет типовую структуру циркулирующих штаммов ротавирусов и их доминантные генотипы;

определяет степень соответствия иммунобиологических препаратов антигенной структуре популяции ротавирусов в республике;

анализирует напряженность и структуру иммунитета населения к возбудителю.

43. Управленческая подсистема. Управленческие решения принимаются на основе эпидемиологической диагностики и направлены на выбор и реализацию эффективного комплекса мероприятий по предотвращению массового распространения инфекции на подконтрольной административной территории.

ГЛАВА 5 ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ

44. Противоэпидемические мероприятия при ротавирусной инфекции - общие для группы ОКИ и основаны на принципах своевременного выявления и изоляции источников инфекции, определения факторов передачи, прерывании путей ее распространения.

Учитывая эпидемиологические особенности РВИ, особое внимание уделяется организации противоэпидемических мероприятий в детских инфекционных стационарах, педиатрических стационарах другого профиля, домах ребенка, родильных домах, детских организованных коллективах, многодетных семьях.

45. Порядок выявления и изоляции больных.

45.1. Выявление больных РВИ проводится медицинскими работниками организаций здравоохранения, воспитательно-образовательных, оз-

доровительных и других организаций независимо от форм собственности и ведомственной принадлежности при оказании медицинской помощи во время амбулаторных приемов, посещений больных на дому, при обследовании пациентов, находящихся на стационарном лечении, проведении периодических и профилактических медицинских осмотров, наблюдении за лицами, общавшимися с источником инфекции.

45.1.1. Первичный диагноз РВИ может быть установлен по клиническим и эпидемиологическим критериям, окончательный диагноз РВИ устанавливается после лабораторной верификации. Лабораторное обследование проводится в первые двое суток со дня госпитализации или установления первичного диагноза острой кишечной инфекции.

45.2. Выявленные больные изолируются в инфекционные стационары или на дому. Госпитализация больных в инфекционные стационары проводится по клиническим и эпидемиологическим показаниям.

45.2.1. Клинические показания:

возраст больного до 1 года включительно;

тяжелые формы инфекции, наличие осложнений независимо от возраста больного;

среднетяжелые формы у детей в возрасте до 2 лет и у лиц старше 60 лет с отягощенным преморбидным фоном.

45.2.2. Эпидемиологические показания:

угроза распространения инфекции по месту жительства больного;

заболевание у работников пищевых предприятий, лиц к ним приравненных, при подозрении в качестве источника инфекции (в обязательном порядке для полного клинического обследования, в т.ч. выявления случаев смешанных инфекций).

46. Выписка из стационара производится после полного клинического выздоровления. Необходимость лабораторного обследования перед выпиской определяется лечащим врачом.

47. Диспансерное наблюдение за реконвалесцентами после РВИ может устанавливаться по клиническим показаниям, исходя из возможности возникновения осложнений и других нежелательных последствий для здоровья переболевшего. Целесообразность назначения диспансерного наблюдения за переболевшими РВИ и его продолжительность определяется лечащим врачом.

48. Эпидемиологическое обследование очагов.

48.1. Необходимость эпидемиологического обследования очагов РВИ определяется врачом-эпидемиологом с учетом эпидемиологической ситуации на данной территории.

48.2. Обязательному эпидемиологическому обследованию подлежат очаги РВИ с 2 и более случаями заболеваний в дошкольных учреждениях

воспитания, детских домах, домах ребенка, организациях здравоохранения для стационарного лечения больных, детских оздоровительных учреждениях.

48.2.1. Лицам из числа эпидемиологически значимых контингентов, контактировавшим с больным РВИ в домашних очагах, лечащим врачом или врачом-эпидемиологом назначается лабораторное обследование на выявление антигенов ротавирусов в фекалиях методом ИФА. При обнаружении ротавирусного антигена они подлежат углубленному клиническому осмотру врачом-инфекционистом.

48.3. Необходимость и объем лабораторных исследований внешней среды в очагах РВИ определяет врач-эпидемиолог.

48.4. Отбор, обработка, хранение и доставка проб внешней среды по эпидемиологическим показаниям проводится в соответствии с п. 22.2. настоящей Инструкции.

49. Медицинскому наблюдению в очагах РВИ подлежат лица, общавшиеся с источником инфекции:

в детских дошкольных учреждениях образования, школах-интернатах, санаторно-оздоровительных учреждениях для детей – дети и персонал, находившиеся в непосредственном контакте с больным РВИ;

по месту жительства больного РВИ – дети в возрасте до 6 лет и лица из числа эпидемиологически значимых контингентов;

на предприятиях пищевой промышленности и к ним приравненных, объектах водообеспечения – лица, связанные по роду деятельности с технологическим процессом производства пищевых продуктов и водоподготовки, находившиеся в непосредственном контакте с больным РВИ.

50. Медицинское наблюдение осуществляют врачи или средние медицинские работники перечисленных выше объектов или территориальных лечебно-профилактических организаций.

51. Длительность медицинского наблюдения составляет 7 дней со дня изоляции последнего заболевшего (по первичному диагнозу) РВИ.

52. Медицинское наблюдение включает опрос в т.ч. о характере стула, осмотр и термометрию.

53. Результаты медицинского наблюдения контактных в домашних очагах фиксируются в амбулаторных картах.

54. Текущая дезинфекция в очагах РВИ в детских дошкольных учреждениях образования, детских домах, домах ребенка, школах-интернатах, санаторно-оздоровительных учреждениях для детей, в организациях здравоохранения стационарного типа, на предприятиях пищевой промышленности и к ним приравненных, объектах водообеспечения проводится ежедневно в течение 7 суток со дня изоляции источника инфекции силами персонала под контролем медицинского работника.

55. Необходимость проведения заключительной дезинфекции с привлечением специализированных учреждений (отделов) санэпидслужбы определяет врач-эпидемиолог.

56. Дезинфекционные мероприятия в очагах проводятся с применением дезинфицирующих средств, разрешенных к применению в Республике Беларусь в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Предпочтительно использовать дезинфектанты, для которых установлено и отражено в нормативно-технической документации (инструкции по применению) наличие вирулицидной активности непосредственно в отношении ротавирусов.

ГЛАВА 6 ПРОФИЛАКТИКА

57. Профилактика РВИ основана на типичных для группы ОКИ мерах предупреждения заболевания с учетом эпидемиологических особенностей этой инфекции. К ним относятся: обучение населения санитарно-гигиенической культуре и навыкам, соблюдение санитарно-гигиенических норм и правил на эпидемиологически значимых объектах, использование не контаминированной вирусом воды и пищи, иммунопрофилактика и др.

58. Профилактика внутрибольничной РВИ состоит в поддержании в лечебных учреждениях, родильных домах и др. учреждениях здравоохранения противоэпидемического режима в отношении кишечных инфекций, обучении санитарно-гигиеническим правилам и навыкам персонала, пациентов, госпитализированных с пациентами младших возрастных групп родителей.

59. Профилактика РВИ в организованных детских коллективах и семьях направлена на предотвращение случаев заболевания, как среди детей, так и взрослых лиц. При попадании в эти коллективы источников инфекции следует активизировать санитарно-просветительскую работу по недопущению повторных случаев заболевания.

60. Действенной профилактической мерой в отношении РВИ у детей раннего возраста является грудное вскармливание.

61. Комплекс профилактических мероприятий при РВИ включает:
тщательное соблюдение всех санитарно-гигиенических правил и норм;
продолжительное грудное вскармливание детей;
использование коровьего молока и молочных продуктов, в которых содержатся антитела, оказывающие протективное действие в отношении ротавирусов;

предъявление к качеству пищевых продуктов, предназначенных для детей, особо высоких требований (при малейшем подозрении на ухудшение качества их следует исключать из питания);

использование для детей фасованной в емкости негазированной питьевой воды промышленного производства или кипяченой питьевой воды;

строгое соблюдение санитарных правил и норм работы дошкольных учреждений;

предупреждение внутрибольничных заражений РВИ (рациональная обработка рук, использование индивидуальных предметов ухода за пациентами, соблюдение дезинфекционного режима).

62. Иммунопрофилактика РВИ основана на применении двух типов иммунобиологических препаратов: вакцин, создающих активный иммунитет, и иммуноглобулиновых препаратов, обеспечивающих пассивный иммунитет.

63. Экстренная профилактика. Может быть рекомендовано пероральное применение зарегистрированных в установленном порядке противоротавирусных иммунобиологических препаратов в соответствии с инструкциями по их применению.

64. Санитарное просвещение населения на подконтрольной административной территории заключается в доведении до него всеми доступными средствами: с помощью средств массовой информации, санитарных бюллетеней, лекций, бесед и др. актуальной информации о профилактике РВИ и других кишечных инфекций.

Приложение 1
к Инструкции по применению
«Эпидемиологический надзор
за ротавирусной инфекцией»

МЕТОДИКА ТИПИРОВАНИЯ РОТАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА
ПО G, P- ТИПАМ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Требования к организации работы.

Исследования по выделению РНК ротавирусов из вируссодержащего материала должны проводиться в лаборатории, имеющей разрешение на работу с патогенными биологическими агентами (ПБА) IV группы патогенности, сотрудниками, имеющими допуск к работе с ПБА IV группы патогенности в соответствии с нормативными правовыми актами и техническими нормативными правовыми актами Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Медицинские отходы, образующиеся в процессе исследований, относятся к группе Б-2 и должны утилизироваться в соответствии с нормативными правовыми актами и техническими нормативными правовыми актами Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Лаборатория, выполняющая настоящие исследования должна иметь площади, оборудование, реагенты, подготовленный персонал и быть сертифицированной для проведения исследований методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

С целью исключения ложных результатов исследований следует соблюдать следующие дополнительные меры предосторожности:

все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы, должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое;

при каждой операции используют и меняют одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером, работают в одноразовых перчатках. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер с дезинфицирующим раствором на 1 час;

поверхности рабочих столов, а также оборудования, должны ежедневно обрабатываться хлорсодержащим дезинфицирующим раствором.

Центрифугирование проводится при 14 000 об./мин.

Праймеры. Для типирования по гену VP4 используют следующие праймеры:

1. con 3 5' – TGGCTTCGCCATTTTATAGACA – 3',
2. 1T 5' – TCTACTGGATCGACGTGC – 3',
3. 2T-1 5' – STATTGTTAGAGGTTAGAGTC – 3',
4. 3T-1 5' – TGTTGATTAGTTGGATTCAA – 3',
5. 4T-1 5' – TGAGACATGCAATTGGAC – 3',

Для типирования по гену VP7 используют следующие праймеры:

1. End9b 5' – GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG – 3',
2. aAT8 5' – GTCACACCATTTGTAAATTCG – 3',
3. aBT1 5' – CAAGTACTCAAATCAATGATGG – 3',
4. aCT2 5' – CAATGATATTAACACATTTTCTGTG – 3',
5. aDT4 5' – CGTTTCTGGTGAGGAGTTG – 3',
6. aET3 5' – CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG – 3',
7. aFT9 5' – CTAGATGTAACТАСААСТАС – 3'.

ХОД ИССЛЕДОВАНИЯ.

Подготовка исследуемых фекальных проб.

Пробы массой 5-10г забирают в первые 3-4 дня заболевания, во время диареи. Готовят 10%-20%-ную суспензию фекалий в рабочем растворе ФСТБ из расчета 1-2г фекалий на 10 мл указанного раствора. Допускается также суспендирование фекалий в таком же объеме раствора Хэнкса или физиологического раствора натрия хлорида (8,5г NaCl на 1л дистиллированной воды). Суспензию осветляют центрифугированием при 3 тыс. об/мин в течение 30 мин. Водную фазу используют для исследования.

Выделение РНК из вируссодержащих образцов.

Выделение РНК провести с помощью гуанидинтиоцианатной методики. Приготовить лизирующий раствор: растворить 13,33 г гуанидинтиоцианата в 10,7 мл воды, добавить 0,5 мл раствора цитрата натрия (516 мг в 1,31 мл воды) и 1 мл раствора N-лаурилсаркозина натрия (200 мг в 1,35 мл воды). Внести в пробирки 300 мкл лизирующего раствора, отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавить 100 мкл пробы. Тщательно перемешать и осадить капли на вортексе. Выдержать смесь при 65°C в течение 15 мин. Центрифугировать пробирки 10-15 сек для сбора конденсата. Добавить 400 мкл изопропанола, тщательно перемешать. Центрифугировать 15 мин. Осторожно, не задевая осадок, удалить супернатант, используя вакуумный насос. Добавить к осадку 500 мкл 70 % этанола. Промыть осадок, аккуратно покачивая пробирку. Центрифугировать 5 мин, отобрать надосадок, используя вакуумный насос. Процедуру отмывки повторить с 300 мкл ацетона.

Пробирки с открытой крышкой термостатировать при 65°C в течение 3-5 мин для высушивания осадка. Внести 20 мкл воды MilliQ и термо-

статировать при 65°C до полного растворения осадка (5-10 мин), периодически помешивая. Центрифугировать пробирки 10-15 сек для сбора конденсата. Добавить в каждую пробирку 2,8 мкл DMSO. Прогреть смесь в течение 5 мин при 97°C и быстро охладить на льду. Центрифугировать пробирки 10-15 сек для сбора конденсата.

Обратная транскрипция. Приготовить два раствора для обратной транскрипции для типирования по гену VP4 и VP7 соответственно таблице 1 настоящего приложения.

Таблица 1 – Состав реакционных смесей для обратной транскрипции.

Компонент	Объем на одну реакцию, мкл
Буфер для обратной транскрипции (Fermentas)	4
dNTP mix (Fermentas)	2
Праймер con3 (для типирования по гену VP4) или праймер End9b (для типирования по гену VP7)	15 pmol
Рибонуклеазный ингибитор («Fermentas»)	20 ед.
Обратная транскриптаза («Fermentas»)	200 ед.
Вода	до 10 мкл

Раскапать оба раствора по 10 мкл в чистые пробирки. Внести по 10 мкл раствора РНК каждой пробы в пробирку с раствором для обратной транскрипции для типирования по гену VP4 и в пробирку с раствором для обратной транскрипции для типирования по гену VP7. Перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирки. Термостатировать смесь при 42°C в течение 1 ч, а затем при 70°C в течение 10 мин.

Амплификация.

Буфер для внесения (готовится заранее, хранится при (4-8)°C). Для 1 мл необходимо: растворить 0,6 г сахарозы в 600 мкл воды для инъекций, добавить 5 мкл раствора Cresol red (Na) (50мМ).

Приготовить заранее два варианта нижней смеси для ПЦР для типирования по гену VP4 и VP7 соответственно таблице 2 настоящего приложения.

Приготовленную смесь раскапать по 20 мкл в пробирки на 0,2 мл. Осадить капли центрифугированием на вортексе, убедиться, что раствор не содержит пузырьков. Растопить воск при 90°C. Внести в каждую пробирку по 2 капли воска из наконечника на 200 мкл, стараясь попасть в центр пробирки. Прогреть пробирки при 90°C до частичного расплавления.

ния воска (несколько секунд). Охладить пробирки в штативе при комнатной температуре.

Приготовить верхнюю смесь для амплификации, смешав буфер для внесения с Taq-полимеразой из расчета 10мкл буфера и 1,25 ед. фермента на 1 реакцию. Внести верхнюю смесь для амплификации по 10 мкл в про-

Таблица 2 – Состав нижней реакционной смеси для амплификации.

Компонент	Объем на одну реакцию, мкл
ПЦР-буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas)	1
dNTP mix (Fermentas)	0,7
MgCl_2 (Fermentas)	4,2
Праймеры con3, 1T, 2T-1, 3T-1, 4T-1 (для типирования по гену VP4) или праймеры End9b, aAT8, aBT1, aCT2, aDT4, aET3, aFT9 (для типирования по гену VP7)	по 15 pmol каждого
Вода	до 20 мкл

бирки с воском. Добавить 5 мкл раствора кДНК, используя наконечник с аэрозольным барьером. Осадить капли на вортексе.

Перенести пробирки в программируемый амплификатор с термостабируемой крышкой и провести амплификацию в автоматическом режиме по заданной программе с активным регулированием температуры. Режим амплификации для типирования по гену VP4: 1 мин 30 сек при 94°C – 1 цикл; 20 сек при 94°C, 30 сек при 50°C, 30 сек при 72°C – 5 циклов; 5 сек при 94°C, 30 сек при 52°C, 30 сек при 72°C – 30 циклов. Режим амплификации для типирования по гену VP7: 1 мин 30 сек при 94°C – 1 цикл; 20 сек при 94°C, 30 сек при 42°C, 30 сек при 72°C – 5 циклов; 5 сек при 94°C, 30 сек при 42°C, 30 сек при 72°C – 30 циклов. Заключительный шаг элонгации длился в течение 7 мин при 72°C.

Учет результатов.

Анализ полученных продуктов проводят методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Буфер для электрофореза. ТAE (пятидесятикратный): 24,22 г Трис и 1,86 г ЭДТА растворить в 70 мл воды, довести pH однократного раствора до 7,6 ледяной уксусной кислотой, довести объем до 100 мл водой. Для проведения электрофореза буфер развести в 50 раз на дистиллированной воде, добавить раствор бромистого этидия (10мг/мл) из расчета 50 мкл на 200 мл ТAE. Допускается пятикратное использование буфера для электрофореза.

Агарозный гель готовят путем добавления 2 г агарозы на 100 мл однократного ТАЕ буфера, не содержащего бромистый этидий. Агарозу расплавляют на водяной бане или в микроволновой печи до полного расплавления. Бромистый этидий (10 мг/мл) вносят в расплавленную агарозу, остывшую до 55-60°C, в конечной концентрации 5 мкг/мл.

Поместить готовый гель в камеру для электрофореза. Добавить ТАЕ в электрофоретическую камеру так, чтобы буфер покрывал агарозный гель слоем приблизительно 2 мм.

Отобрать 10 мкл продукта амплификации из-под воска и аккуратно внести в соответствующую лунку геля. Допускается использование одного наконечника для всех проб при условии его многократной промывки буфером для электрофореза. Внести в соответствующую лунку геля маркер молекулярных масс.

Установить крышку на камеру, подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и установить на источнике питания напряжение около 10 В/см (стабилизация по напряжению).

Проводить электрофорез до полного разгона маркера молекулярных масс (около 2 ч) или до достижения фрагментом маркера размером 200 нуклеотидов края геля.

Вынуть гель из камеры и осторожно перенести на трансиллюминатор.

Установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать результаты.

Принадлежность к тому или иному типу определяют по длинам полученных фрагментов согласно таблицам 3 и 4 настоящего приложения.

Таблица 3 – Длины фрагментов, получаемых для различных типов ротавируса при типировании по гену VP4 (Р-тип).

Размер фрагмента	Тип
483	[P4]
267	[P6]
345	[P8]
391	[P9]

Таблица 4 – Длины фрагментов, получаемых для различных типов ротавируса при типировании по гену VP7 (G-тип):

Размер фрагмента	Тип
749	1
652	2
374	3
583	4
885	8
306	9

Приложение 2
к Инструкции по применению
«Эпидемиологический надзор
за ротавирусной инфекцией»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ (СУММАРНЫХ И КЛАССОВ А, М)
К РОТАВИРУСАМ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

1. Требования к организации работы.

Исследования по определению антител к ротавирусам в сыворотке крови должны проводиться в лаборатории, имеющей разрешение на работу с патогенными биологическими агентами (ПБА) IV группы патогенности, сотрудниками, имеющими допуск к работе с ПБА IV группы патогенности, в соответствии с нормативными правовыми актами и техническими нормативными правовыми актами Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Медицинские отходы, образующиеся в процессе исследований, относятся к группе Б-2 и должны утилизироваться в соответствии с нормативными правовыми актами и техническими нормативными правовыми актами Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Лаборатория, выполняющая настоящие исследования, должна иметь площади, оборудование, реагенты, подготовленный персонал и быть сертифицированной для проведения исследований методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Определение суммарных (без разделения на классы) и антител классов А и М к ротавирусам может быть выполнено с использованием предназначенных для этого и зарегистрированных в установленном порядке в Республике Беларусь диагностических препаратов. В связи с отсутствием таких препаратов в настоящих методиках изложен способ определения суммарных, классов А и М антител к ротавирусам с использованием компонентов тест-системы иммуноферментной для выявления антигенов ротавирусов «РОТА-АГ» (Республика Беларусь) и тест-набора конфирматорного для подтверждения специфичности выявления антигенов ротавирусов «КОНПРОТА-АГ» (Республика Беларусь).

2. Определение суммарных антител к ротавирусам.

2.1. Необходимые материалы.

Тест-система иммуноферментная для выявления антигенов ротавирусов «РОТА-АГ».

Тест-набор конфирматорный для подтверждения специфичности вы-

явления антигенов ротавирусов «КОНПРОТА-АГ».

2.2. Подготовка исследуемых проб. Сыворотка крови. Кровь от обследуемых людей забирают в стеклянную или пластмассовую посуду в объеме 0,5-1,0 мл. Выдерживают в термостате при плюс 37⁰С, затем центрифугируют при 1000-1500 об/мин в течение 30 мин. Сыворотку отсасывают и хранят при минус 20⁰С до исследования.

Все работы с сыворотками крови выполняют с соблюдением необходимых мер предосторожности, как с инфекционным материалом.

2.3. Ход исследования. Сенсибилизация твердой фазы. Иммуноглобулин противоротавирусный (№1) растворяют в 3,0 мл дистиллированной воды, осторожно перемешивают пипетированием и вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, кроме лунки А1. Лунку А1 оставляют пустой вплоть до внесения субстрат-индикаторного раствора (СИР). Заполненные лунки плотно заклеивают липкой лентой и инкубируют 30 мин во влажной камере при 37⁰С. Содержимое отсасывают и лунки отмывают 2 раза, как указано ниже.

Отмывка. Концентрат ФСТБ (№7) разводят в 25 раз дистиллированной водой (к 10 мл ФСТБ добавляют 240 мл дистиллированной или деионизированной воды) и тщательно перемешивают. При выпадении солей во флаконе с ФСТБ, флакон помещают в термостат при плюс 37⁰С до полного растворения солей. В каждую лунку вносят по 350 мкл полученного отмывающего раствора, выдерживают 1 мин, отсасывают содержимое и повторяют эту процедуру указанное количество раз

Антиген ротавирусный (№3) растворяют в 25 мл отмывающего раствора и вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют 2 ч во влажной камере при 37⁰С. Отмывают 4 раза. Оставшийся антиген хранят при минус 20⁰ С.

Контрольный реагент и конфирматорный реагенты из тест-набора «КОНПРОТА-АГ» растворяют в 0,5 мл отмывающего раствора. В следующие за А1 3 лунки ряда вносят по 50 мкл раствора контрольного реагента, в следующие 2 - по 50 мкл раствора конфирматорного реагента. Контрольный реагент используют в качестве отрицательного контроля (ОК), а конфирматорный – в качестве положительного контроля (ПК).

Исследуемые сыворотки разводят отмывающим раствором 1:10 и вносят по 50 мкл в остальные лунки планшета, осторожно перемешивают.

Конъюгат (№ 2) растворяют в 1,5 мл отмывающего раствора. Вносят по 50 мкл в каждую лунку планшета, осторожно перемешивают, заклеивают и инкубируют во влажной камере 1,5 часа при плюс 37⁰С. Отмывают 4 раза.

Субстрат - индикаторный раствор (СИР) готовят непосредственно перед использованием. К раствору ТМБ (№ 6) добавляют 1,8 мл СБ (№8). Тщательно перемешивают и вносят в каждую лунку по 100 мкл приготовленного СИР, выдерживают 30 мин в темном месте при комнатной температуре, после чего вносят в лунки по 50 мкл стоп-реагента (№9) и учитывают.

2.4. Учет результатов. Фотометрию проб проводят при следующих условиях: не позднее 10 мин после внесения стоп-реагента, длина волны измерения - 450 нм, фоновой волны – 620 нм. Значение показателя оптической плотности (ПОП) в лунке А1 принимается за нулевое значение (программа Blank) или вычитается из величины ПОП всех остальных лунок, если программа Blank отсутствует. В лунках с ОК среднее арифметическое значение показателя оптической плотности (ПОП) должно быть не ниже 0,6 оптической единицы (о.е.) и не менее, чем в 3 раза превышать среднюю величину ПОП для лунок с ПК. При этом величина ПОП для ПК не должна быть более 0,2о.е. Положительными считаются пробы, у которых ПОП в 2 раза ниже среднего значения ПОП для лунок с ОК.

Визуальный учет. Лунки с ОК должны иметь выраженную желтовато-коричневатую окраску, а с ПК - быть слегка желтоватыми или без окрашивания. Положительными являются пробы, интенсивность окраски которых приближается к окраске ПК и без сомнения ниже интенсивности окраски ОК.

3. Определение антител класса А (IgA) к ротавирусам.

3.1. Необходимые материалы.

Тест-система иммуноферментная для выявления антигенов ротавирусов «РОТА-АГ».

иммуноглобулин против тяжелых цепей IgA человека (анти- IgA),
0,05 М КББ, рН 9,5,

нормальная сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса А к ротавирусам в разведении 1:10 (ОК),

сыворотка крови человека, содержащая антитела класса А к ротавирусам в разведении 1:10 (ПК).

3.2. Подготовка исследуемых проб. Сыворотка крови. Кровь от обследуемых людей забирают в стеклянную или пластмассовую посуду в объеме 0,5-1,0 мл. Выдерживают в термостате при плюс 37⁰С, затем центрифугируют при 1000-1500 об/мин в течение 30 мин. Сыворотку отсасывают и хранят при минус 20⁰С до исследования.

Все работы с сыворотками крови выполняют с соблюдением необходимых мер предосторожности, как с инфекционным материалом.

3.3. **Ход исследования. Сенсибилизация твердой фазы.** Анти- IgA человека в концентрации 3 мкг/мл на 0,05 М КББ вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, кроме лунки А1. Лунку А1 оставляют пустой вплоть до внесения субстрат-индикаторного раствора (СИР). Заполненные лунки плотно заклеивают липкой лентой и инкубируют 30 мин во влажной камере при 37⁰С. Содержимое отсасывают и лунки отмывают 2 раза, как указано ниже.

Отмывка. Концентрат ФСТБ разводят в 25 раз дистиллированной водой (к 10 мл ФСТБ добавляют 240 мл дистиллированной или деионизированной воды) и тщательно перемешивают. При выпадении солей во флаконе с ФСТБ, флакон помещают в термостат при плюс 37⁰С до полного растворения солей. В каждую лунку вносят по 350 мкл полученного отмывающего раствора, выдерживают 1 мин, отсасывают содержимое и повторяют эту процедуру указанное количество раз.

В следующие за А1 4 лунки ряда вносят по 100 мкл раствора ОК, в следующие 2 - по 100 мкл раствора ПК. Исследуемые сыворотки в разведении 1:10 вносят по 100 мкл в остальные лунки планшета, плотно заклеивают заполненные лунки липкой лентой и инкубируют во влажной камере 2 часа при 37⁰С. Отмывают 3 раза.

Антиген ротавирусный (№3) растворяют в 10,0 мл отмывающего раствора и вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют во влажной камере при плюс 18-20⁰С в течение 18-20 часов. Отмывают 3 раза.

Конъюгат противоротавирусный (№2) растворяют в 2,5 мл отмывающего раствора и вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют во влажной камере 1,5 часа при плюс 37⁰С. Отмывают 4 раза.

Субстрат - индикаторный раствор (СИР) готовят непосредственно перед использованием. К раствору ТМБ добавляют 1,8 мл СБ. Тщательно перемешивают и вносят в каждую лунку по 100 мкл приготовленного СИР, выдерживают 30 мин в темном месте при комнатной температуре, после чего вносят в лунки по 50 мкл стоп-реагента и учитывают.

3.4. **Учет результатов.** Результаты исследования учитывают в течение 10 мин. после внесения стоп-реагента. Фотометрию проб проводят при следующих условиях: длина волны измерения - 450 нм, фоновой волны – 620 нм. Значение показателя оптической плотности (ПОП) в лунке А1 принимается за нулевое значение (программа Blank) или вычитается из величины ПОП всех остальных лунок, если программа Blank отсутствует. В лунках с ПК значения ПОП должны быть не ниже 0,6 оптической единицы (о.е.) и не менее, чем в 3 раза превышать среднюю величину ПОП для лунок с ОК. При этом величина ПОП для ОК не должна быть более

0,100 о.е. Положительными считаются пробы, у которых ПОП не ниже 0,2 о.е. и превышает среднее значение ПОП для ОК в 3 раза и более.

Визуальный учет. Лунки с ОК должны быть бесцветными или слегка окрашенными. Лунки с ПК должны иметь выраженную желтую окраску. Положительными считают пробы, интенсивность окраски которых без сомнения выше интенсивности окраски ОК.

4. Определение антител класса М (IgM) к ротавирусам.

4.1. Необходимые материалы.

Тест-система иммуноферментная для выявления антигенов ротавирусов «РОТА-АГ».

иммуноглобулин против тяжелых цепей IgM человека (анти- IgM),
0,05 М КББ, pH 9,5,

нормальная сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса М к ротавирусам в разведении 1:1000 (ОК),

сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к ротавирусам в разведении 1:1000 (ПК).

4.2. Подготовка исследуемых проб. Сыворотка крови. Кровь от обследуемых людей забирают в стеклянную или пластмассовую посуду в объеме 0,5-1,0 мл. Выдерживают в термостате при плюс 37⁰С, затем центрифугируют при 1000-1500 об/мин в течение 30 мин. Сыворотку отсасывают и хранят при минус 20⁰С до исследования.

Все работы с сыворотками крови выполняют с соблюдением необходимых мер предосторожности, как с инфекционным материалом.

4.3. Ход исследования. Сенсибилизация твердой фазы. Анти- IgM человека в концентрации 3 мкг/мл на 0,05 М КББ вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, кроме лунки А1. Лунку А1 оставляют пустой вплоть до внесения субстрат-индикаторного раствора (СИР). Заполненные лунки плотно заклеивают липкой лентой и инкубируют 30 мин во влажной камере при 37⁰С. Содержимое отсасывают и лунки отмывают 2 раза, как указано ниже.

Отмывка. Концентрат ФСТБ разводят в 25 раз дистиллированной водой (к 10 мл ФСТБ добавляют 240 мл дистиллированной или деионизированной воды) и тщательно перемешивают. При выпадении солей во флаконе с ФСТБ, флакон помещают в термостат при плюс 37⁰С до полного растворения солей. В каждую лунку вносят по 350 мкл полученного отмывающего раствора, выдерживают 1 мин, отсасывают содержимое и повторяют эту процедуру указанное количество раз.

В следующие за А1 4 лунки ряда вносят по 100 мкл раствора ОК, в следующие 2 - по 100 мкл раствора ПК. Исследуемые сыворотки в разведении 1:1000 вносят по 100 мкл в остальные лунки планшета, плотно заклеивают заполненные лунки липкой лентой и инкубируют во влажной

камере 2 часа при 37⁰С. Отмывают 3 раза.

Антиген ротавирусный (№3) растворяют в 10,0 мл отмывающего раствора и вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют во влажной камере при плюс 18-20⁰С в течение 18-20 часов. Отмывают 3 раза.

Конъюгат противоротавирусный (№2) растворяют в 2,5 мл отмывающего раствора и вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют во влажной камере 1,5 часа при плюс 37⁰С. Отмывают 4 раза.

Субстрат - индикаторный раствор (СИР) готовят непосредственно перед использованием. К раствору ТМБ добавляют 1,8 мл СБ. Тщательно перемешивают и вносят в каждую лунку по 100 мкл приготовленного СИР, выдерживают 30 мин в темном месте при комнатной температуре, после чего вносят в лунки по 50 мкл стоп-реагента и учитывают.

4.4. Учет результатов. Результаты исследования учитывают в течение 10 мин. после внесения стоп-реагента. Фотометрию проб проводят при следующих условиях: длина волны измерения - 450 нм, фоновой волны – 620 нм. Значение показателя оптической плотности (ПОП) в лунке А1 принимается за нулевое значение (программа Blank) или вычитается из величины ПОП всех остальных лунок, если программа Blank отсутствует. В лунках с ПК значения ПОП должны быть не ниже 0,6 оптической единицы (о.е.) и не менее, чем в 3 раза превышать среднюю величину ПОП для лунок с ОК. При этом величина ПОП для ОК не должна быть более 0,100 о.е. Положительными считаются пробы, у которых ПОП не ниже 0,2 о.е. и превышает среднее значение ПОП для ОК в 3 раза и более.

Визуальный учет. Лунки с ОК должны быть бесцветными или слегка окрашенными. Лунки с ПК должны иметь выраженную желтую окраску. Положительными считают пробы, интенсивность окраски которых без сомнения выше интенсивности окраски ОК.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ G-P-ТИПОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К РОТАВИРУСАМ В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ТЕСТ-ШТАММОВ РОТАВИРУСОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

1. Требования к организации работы.

Исследования по определению антител к ротавирусам в сыворотке крови должны проводиться в лаборатории, имеющей разрешение на работу с патогенными биологическими агентами (ПБА) IV группы патогенности, сотрудниками, имеющими допуск к работе с ПБА IV группы патогенности, в соответствии с нормативными правовыми актами и техническими нормативными правовыми актами Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Медицинские отходы, образующиеся в процессе исследований, относятся к группе Б-2 и должны утилизироваться в соответствии с нормативными правовыми актами и техническими нормативными правовыми актами Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Лаборатория, выполняющая настоящие исследования, должна иметь площади, оборудование, реагенты, подготовленный персонал и быть сертифицированной для проведения исследований с использованием культур клеток.

2. Оборудование и реактивы.

2.1. Оборудование:

ламинарный бокс,
СО₂ - термостат,
центрифуга ОПН-8,
инвертированный микроскоп,
стерильные одноразовые 96-луночные планшеты для культур клеток производства компании («SARSTEDT», США),

камера Горяева,

8- канальные и одноканальные микропипетки объемами 20-300мкл,
стерильные наконечники с фильтрами объемом 300мкл,
миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,02мк.

2.2. Необходимые реактивы и материалы:

перевиваемые клетки почки эмбриона макаки резус (МА-104),
среда Игла МЕМ с однократным набором аминокислот и витаминов,
среда 199, сыворотка эмбрионов коров,
гентамицин, трипсин, раствор Хенкса, краситель трипановый синий,

перекись водорода, этиловый спирт.

3. Ход исследования.

3.1. Готовят планшеты для микротитрования. С этой целью суспензию клеток МА-104 на ростовой среде MEM с 10% СЭК, с добавлением гентамицина в конечной концентрации 50 мкг/мл (в дозе 100 тыс. клеток/мл) разливают в объеме 100 мкл на лунку 96-луночной планшеты и оставляют на инкубацию в течение 48 часов в термостате при 37° С в условиях 5% CO₂. Для каждого типа вируса используется 1 планшет.

3.2. Клетки трижды промывают раствором Хенкса.

3.3. Необходимые объемы сывороток, приготовленные для исследования, инактивируют в течение 30 минут при 56° С и готовят на среде Игла MEM 2-х кратные последовательные разведения, начиная с 1:4 в лунках планшета в объеме 50 мкл с 4 ряда. Ряд 1 оставляют для контролей: контроля качества клеток со средой, контроля репродукции вируса. Ряды 2-3 оставляют для контроля проверки токсичности сыворотки.

3.4. Готовят суспензию нейтрализуемого ротавируса каждого типа с известным заранее титром в поддерживающей среде в количестве, достаточном для исследования. Разводят каждый тип вируса так, чтобы в 50 мкл вирусосодержащей жидкости содержалось 100 ТЦД₅₀. Вирус обрабатывают трипсином в конечной концентрации 5 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре и вносят по 50 мкл во все лунки планшета, начиная с 4 ряда и в 4 лунки 1 ряда – для контроля репродукции вируса. В ряды, предназначенные для контролей, дополнительно вносят по 50 мкл среды MEM. Планшеты заклеивают и инкубируют в термостате при 37° С в течение 1 ч. Затем содержимое сливают и во все лунки планшета вносят по 100 мкл поддерживающей среды: равные объемы среды 199 и MEM, содержащей 2,5 мкг/мл трипсина, 50 мкг/мл гентамицина. Планшеты инкубируют в течение 2-3 суток.

3.5. Учет результатов. При учете результатов обращают внимание на состояние контролей культуры, токсичность сыворотки, результаты контрольного титрования рабочих разведений вирусов. Титром сыворотки считают наибольшее разведение, защищающее 50% зараженных культур от действия 100 ТЦД/50 вируса. Титр сыворотки можно рассчитать по формуле Кербера:

$\lg \text{ТЦД}_{50} = L - d(S - 0,5)$, где:

L = lg наименьшего разведения сыворотки в опыте;

d = разница между lg последовательных разведений;

S = сумма пропорций тест-объектов (лунок с культурой клеток), давших положительный результат (ЦПЭ) в каждом разведении.

Приложение 4
к Инструкции по применению
«Эпидемиологический надзор
за ротавирусной инфекцией»

ПЕРСОНИФИЦИРОВАННАЯ КАРТА ПАЦИЕНТА С РВИ

* обязательные поля

Номер сообщения:	Дата и время поступления сообщения в ГЦГДиС:
Регистрационный номер сообщения в территориальном ЦГЭ: *	Дата получения заключительного диагноза в территориальном ЦГЭ:
Это экстренное извещение:	Название ЛПО, поставившего диагноз:
ФИО врача, поставившего диагноз:	Лечебное учреждение по месту регистрации очага:
ФИО лица, передавшего сообщение:	

Личный код:	Фамилия:*
Пол:*	Имя:*
Дата рождения:*	Отчество:
Возраст:*	Социально-возрастная группа:
Место жительства:*	Адрес:
Город:	
Район:	
Тип дома:	Телефон:
Профессия:	Образование:
Место работы/учебы:	Должность/специальность:
№ микроучастка	Группа риска:

Дата:	
Обращения в ЛПО: *	Начала болезни: *
Ориентировочные сроки заражения:	Последнее посещение работы / детского учреждения:
Установления первичного диагноза:	Передачи информации в ЛПО по месту жительства:
Выздоровления:	Продолжительность в состоянии болезни (в годах):
Госпитализации:	Месяц и год учёта в статистической форме:
Место госпитализации:	Причины поздней госпитализации:
Первичный диагноз: *	Шифр первичного диагноза: *
Окончательный диагноз:	Шифр окончательного диагноза:

Диагноз установлен на:	Случай установлен:
Название лаборатории:	Биоматериал, забранный от больного: Дата исследования:
Лабораторные исследования:	Методы исследования:
Результаты исследования:	Возбудитель заболевания: Тип, субтип, серогруппа:
Течение инфекции:	Степень тяжести заболевания:

Определе- ние болезни отвечает стандарт- ному опре- делению случая:	Исход болез- ни:
Дата начала эпидемиол. расследова- ния:	Заболевание в домашнем очаге:
Сведения о контактных лицах в оча- гах:	Количество в очагах лиц из группы повы- шенного риска распростране- ния инфекции:
Обстоятель- ства предше- ствующие заболеванию в ориентири- ровочные сроки заражения:	Источник за- ражения:
Заболевание по месту ра- боты, учебы, воспитания:	Способ зара- жения:
Место пред- полагаемого заражения: Название уч- реждения (места):	Факторы пере- дачи инфек- ции: Название про- дукта:
Способ при- готовления продукта:	Мероприятия по ликвидации инфекции в очаге по месту жительства больного:
Проведенные противоэпи- демические и организа- ционные меро-	Нарушения требований санэпидрежи- ма на эпидзна- чимом объекте

приятия на
эпидзначи-
мом объекте:

(месте пред-
полагаемого
инфицирова-
ния больного):

Лабораторные исследования в очаге:

Исследовано:

Дата исследо-
вания:

Название ла-
боратории:

Методы иссле-
дования:

Результаты
исследования:
Сведения о
подтвержден-
ных факторах
и источниках
инфекции:

Другая эпиде-
миологически
важная инфор-
мация:

Территори-
альный ЦГЭ:

Врач-
эпидемиолог:

Должность:

Телефон:

Дата завер-
шения эпид.
расследова-
ния:

Выводы

ПОРЯДОК ОТБОРА, ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ ПРОБ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В СИСТЕМЕ ДОЗОРНОГО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА РВИ

1. Биологическим материалом для молекулярно-биологических исследований при РВИ являются ротавируссодержащие экстракты фекалий, ротавируссодержащая взвесь, полученная из объектов внешней среды (вода, пищевые продукты, сточные воды и др.).

Объектом иммунологических исследований является сыворотка крови, при невозможности ее получения - слюна и, иногда, экстракты фекалий.

2. Забор биологических образцов для исследования производится по назначению лечащего врача или врача-эпидемиолога компетентными медицинскими работниками в соответствии с установленными для этих процедур требованиями.

3. Подготовка образцов для исследования.

3.1. Подготовка фекальных проб.

Пробы массой 5-10г забирают в первые 3-4 дня заболевания, во время диареи. Готовят 10%-20%-ную суспензию фекалий в рабочем растворе ФСТБ, содержащемся в тест-системе «РОТА-АГ» (РБ) из расчета 1-2г фекалий на 10 мл указанного раствора. Допускается также суспендирование фекалий в таком же объеме раствора Хэнкса или физиологического раствора NaCl (8,5г NaCl на 1л дистиллированной воды). Суспензию освещают центрифугированием при 3 тыс. об/мин в течение 30 мин. Водную фазу используют для исследования. При исследовании антигена ротавирусов методом ИФА с помощью тест-системы «РОТА-АГ» (РБ) показатель оптической плотности должен составлять не менее 2,5 о.е. Объем пробы образца – не менее 5 мл.

3.2. Подготовка проб сыворотки крови.

Пробы взятой от пациента крови для получения сыворотки инкубируют в течение 30 мин при температуре 37°C, затем центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 минут, после чего сыворотку отбирают в стерильную пластиковую пробирку с герметизирующей крышкой. Объем сыворотки крови для исследования должен составлять не менее 2,0 мл.

3.3. Подготовка проб слюны.

Пробы слюны для иммунологических исследований забираются в случае невозможности забора крови, например у детей раннего возраста. У маленьких детей слюна забирается перед приемом пищи с помощью атравматических индивидуальных стерильных инструментов с надетой на наконечник мягкой трубкой. Взятая слюна перемешивается с равным объемом рабочего раствора ФСТБ содержащемся в тест-системе «РОТА-АГ» (РБ) в таком же объеме раствора Хэнкса или физиологического раствора NaCl (8,5г NaCl на 1л дистиллированной воды). Суспензию центрифугируют при 3 тыс. об/мин в течение 30 мин. Объем пробы – не менее 2,0 мл.

3.4. Пробы образцов из объектов внешней среды готовят по методикам, изложенным в инструкциях по применению: «Инструкция по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов», регистрационный №134-1204, утвержденная заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 12 апреля 2005г.; «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов», регистрационный №112-1210, утвержденная заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 4 декабря 2010г.; «Инструкция по санитарно-вирусологическому контролю пищевых продуктов», регистрационный № 123-1005, утвержденная заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 28 декабря 2005г.

3.5. Подготовленные для исследования индивидуальные пробы образцов клинического материала (10%-ные экстракты фекалий, сыворотка крови) с помощью стерильных одноразовых инструментов переносятся в стерильные пластиковые пробирки с герметизирующими крышками и передаются для транспортировки или хранения.

4. Хранение и транспортировка проб биологических образцов.

Все подготовленные для исследования пробы хранят при температуре не выше минус 20°C в соответствии с установленными правилами хранения инфекционного материала 3-4 групп патогенности.

Транспортирование проб осуществляется в целой маркированной таре (пластиковых пробирках) в замороженном виде в специальном термоконтейнере, снабженном охлаждающим агентом. Каждый образец должен иметь регистрационный номер и сопровождаться направлением.

5. Направление на исследование содержит следующую информацию:

Направление на исследование

Общая информация	
Город (областной центр)	
Учреждение, направившее ма-	

териал		
Контактное лицо (ФИО)		
Телефон		
Сведения о больном		
Фамилия		
Имя		
Отчество		
Пол		
Дата рождения (ДД.ММ.ГГГГ)		
Адрес		
Диагноз		
Дата госпитализации ДД.ММ.ГГГГ		
Сведения о материале		
Дата поступления материала (ДД.ММ.ГГГГ)		
Дата забора материала (ДД.ММ.ГГГГ)		
Вид материала		
Объем, мл		
Лабораторная диагностика РВИ		
Результат детекции антигена (положительный, отрицатель- ный)	☐	

Направление заполнено: «_____» _____ 201..г.

Должность _____

ФИО _____ Подпись _____

6. Информация о пациенте, у которого взята направленная на исследование проба, помещается в персонифицированную базу данных УЛИС - эпидемиология согласно главе 4 настоящей Инструкции.

7. Проба для исследования доставляется по адресу: г. Минск, ул. Филимонова, 23. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, лаборатория эпидемиологии энтеровирусных инфекций, комната 509. Контактный телефон: +375-17-237-69-92.

Приложение 6
к Инструкции по применению
«Эпидемиологический надзор
за ротавирусной инфекцией»

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ФАКТОРОВ РИСКА ИНФИЦИРОВАНИЯ

1. Необходимость эпидемиологических исследований по выявлению действующих факторов риска определяет и организует проведение таких исследований врач-эпидемиолог территориального (районного, зонального, городского, областного) центра гигиены и эпидемиологии.

2. Критериями необходимости эпидемиологических исследований по выявлению действующих факторов риска служат неблагоприятные признаки, свидетельствующие о возможном ухудшении эпидемической ситуации на подконтрольной территории:

статистически достоверный рост (в 2 и более раза) общего уровня заболеваемости РВИ относительно среднескользящих данных (за 5-10 лет) для оцениваемой административной территории;

статистически достоверный рост (в 2 и более раза) показателя заболеваемости РВИ в отдельных возрастных группах населения, относительно среднескользящих данных (за 5-10 лет) для оцениваемой административной территории;

локальные вспышки РВИ (5 и более случаев заболеваний) в детских воспитательно-образовательных учреждениях.

3. Основными методическими приемами оценки вероятных факторов риска являются аналитические исследования по типу «случай-контроль» и расчет тетракорического коэффициента корреляции с оценкой достоверности по χ^2 . Выбор применяемой методики осуществляется с учетом складывающейся ситуации, поставленных целей исследования и уровня подготовки специалистов.

4. Основой эпидемиологических исследований является формирование опытной и контрольной групп населения. В опытную группу включаются все больные с диагнозом РВИ, зарегистрированные с момента возникновения признаков ухудшения эпидемической ситуации. В контрольную группу включаются здоровые лица из числа родственников, соседей, лиц, воспитывающихся, обучающихся или работающих совместно с заболевшим. При этом необходимо учитывать, что для каждого больного (случай) подбирается двое здоровых лиц (контроли), соответствующих больному по возрасту, полу, роду занятий и т.д.

5. При возникновении локальной вспышки РВИ (5 и более случаев) в детском воспитательно-образовательном учреждении в контрольную

группу включаются лица, посещающие данный организованный коллектив, без клинических признаков заболевания острой кишечной инфекцией и отобранные случайным образом (каждый 2-й, 3-й и т.д.).

6. С учетом особенностей складывающейся ситуации определяются вероятные факторы риска. В качестве факторов риска могут выступать: употребление в пищу отдельных продуктов и (или) готовых блюд из меню учреждения, вода (водопроводная, колодезная и т.д.), события (контакт с больным ОКИ, посещение бассейна, отдых за пределами населенного пункта и т.д.) и др. факты. Формируется форма опросного листа с учетом выбранных предполагаемых факторов риска.

7. Проводится опрос больных (опытная группа) и здоровых лиц (контрольная группа) на предмет воздействия выбранных факторов риска (подвергался воздействию фактора риска / не подвергался воздействию фактора риска). Результаты опроса фиксируются в форме опросного листа.

Опросный лист по выявлению роли наименование изучаемого фактора, как фактора риска инфицирования РВИ

№ п/п	Ф.И.О. опрашиваемого	Статус опрашиваемого:		Отношение к фактору риска:	
		Больной	Здоровый	Воздействовал	Не воздействовал
	Всего				

8. По результатам опроса для каждого вероятного фактора риска формируется таблица:

Отношение к изучаемому фактору риска инфицирования	Больные	Здоровые	Всего
Подвергались воздействию фактора риска	A	b	a + b
Не подвергались воздействию фактора риска	C	d	c + d
	a + c	b + d	Итого

9. При исследованиях по типу «случай-контроль» для каждого вероятного фактора риска рассчитывается отношение шансов (odds ratio - OR) развития заболевания среди больных и здоровых в связи с воздействием данного фактора:

$$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

10. Результаты исследований заносятся в оценочную таблицу:

Фактор риска	Отношение шансов (OR)	95% доверительный интервал OR

Если $OR = 1$, то шансы заболеть у подвергавшихся и не подвергавшихся воздействию фактора риска равны, т.е. заболевание не связано с данным фактором риска. Чем больше OR превышает 1, тем больше значимость данного фактора в развитии заболевания.

В случае, когда для нескольких выбранных факторов получены значения OR больше 1, проводится оценка достоверности влияния факторов. Для каждого значения OR рассчитывается 95% доверительный интервал (расчеты проводятся при значениях a, b, c, d не менее 10 для каждого).

Границы интервала:

$$\text{Верхняя граница} = \frac{OR}{2,718^{1,96 \cdot \sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}}}$$

$$\text{Нижняя граница} = OR \times 2,718^{1,96 \cdot \sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}}$$

Наиболее вероятными факторами риска будут те, для которых в диапазон доверительного интервала OR не будет входить 1.

11. Расчет тетракорического коэффициента корреляции целесообразно проводить с помощью компьютерной программы ESTAT, разработанной на кафедре эпидемиологии и микробиологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

12. В случае отсутствия возможности применения компьютерной программы, тетракорический коэффициент корреляции для каждого фактора риска рассчитывается по формуле:

$$r = \frac{a \cdot d - b \cdot c}{\sqrt{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}}$$

Достоверность полученного коэффициента оценивается по χ^2 . Для этого для каждого значения r рассчитывается критерий χ^2 :

$$\chi^2 = n \cdot r^2,$$

где n – общее количество опрошенных лиц.

13. Результаты исследований заносятся в оценочную таблицу:

Фактор риска	Коэффициент корреляции r	χ^2

В тех случаях, когда расчетный χ^2 больше критического $\chi^2_{0,05}=3,841$, полученный коэффициент корреляции признается достоверным ($P<0,05$).

14. Результаты проведенных эпидемиологических исследований используются для формирования эпидемиологического диагноза, организации дополнительных исследований, планирования противоэпидемических мероприятий.