МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра здравоохранения -
Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь
_____ И.В.Гаевский
«_16_» _января_ 2015 г.
Регистрационный № 013-1115

АЛГОРИТМ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОБЪЕКТОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

Авторы: д.м.н., профессор Амвросьева Т.В., н. с. Казинец О. Н., к.б.н., вед. н.с. Поклонская Н.В., к.б.н., вед. н.с. Дедюля К. Л., н.с. Богуш З.Ф., м.н.с. Лозюк С. К., м.н.с. Землянский В. А.

Минск 2015

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
16.12.2015
Регистрационный № 013-1115

АЛГОРИТМ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОБЪЕКТОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т.В. Амвросьева, О.Н. Казинец, канд. биол. наук Н.В. Поклонская, канд. биол. наук К.Л. Дедюля, З.Ф. Богуш, С.К. Лозюк, В.А. Землянский

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм санитарно-вирусологического контроля объектов среды обитания человека (ОСОЧ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на профилактику вирусных инфекций с контактно-бытовым путем передачи.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-гигиенистов, врачей-инфекционистов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Автоклав.
2. Автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5–10; 2–20; 20–200 и 200–1000 мкл.
3. Бифэкстракт (Sigma).
4. Бумага крафт по ГОСТ 8273-75.
5. Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.
6. Вода деионизированная (или дистиллированная вода, стерилизованная автоклавированием при 121°С±1°С 20 мин).
7. Вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз).
8. Глицин по ГОСТ 4209-67.
9. ДНК-маркер 50–1000 пар оснований.
10. Инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, совок для взвешивания.
11. Иономер (pH-121).
12. Источник тока для электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
13. Камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
14. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия).
15. Кислота соляная (HCl), х.ч. по ГОСТ 3118-77.
16. Ламинарный бокс или бокс с УФ-лампой.
17. Наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные (0,5–10; 2–20; 20–200 и 200–1000 мкл).
18. Набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
19. Набор для выделения РНК/ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе.
20. Набор для обратной транскрипции: обратная транскриптаза и буфер для обратной транскрипции.
21. Набор реагентов для амплификации ДНК аденовирусов.
22. Набор реагентов для амплификации комплементарных ДНК (кДНК) астровирусов.

23. Набор реагентов для амплификации кДНК норовирусов человека (НоВ)1 и 2 геногрупп.

24. Набор реагентов для амплификации кДНК ротавирусов.

25. Набор реагентов для амплификации кДНК энтеровирусов (ЭВ).

26. Наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой «RNAse, DNAse free» (0,5–10; 2–20; 20–200 и 200–1000 мкл).

27. Натрий хлористый (NaCl), х.ч. по ГОСТ 4233-77.

28. Натрия гидроокись (NaOH), ч.д.а. по ГОСТ 4328-77.

29. Натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный (Na_2HPO_4х12 H_20) по ГОСТ 4172-76.

30. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл).

31. Перекись водорода, х.ч. по ГОСТ 10929-78.

32. Пипетки стеклянные градуированные на 1, 5, 10 мл по ГОСТ 29227-91.

33. Посуда лабораторная (колбы, пробирки) по ГОСТ 1770-74.

34. Препарат для ДНК-деконтаминации (ДП-2Т или аналоги);

35. Система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).

36. Система для автоматической промывки планшетов.

37. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.

38. Термостат, регулируемый до 37°С±1°С.

39. Термоциклер.

40. Трис-HCl, х.ч. (Sigma).

41. Твердотельный термостат (для пробирок типа «эппендорф»).

42. Трансиллюминатор (в случае применения ПЦР-тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).

43. Хлороформ, х.ч. по ТУ 2631-02-11291058-96.

44. Холодильник-морозильник (-18−-20^{o}С, +4−8°С).

45. Центрифуга рефрижераторная на 1–5000 об./мин.

46. Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «эппендорф»).

47. Центрифуга-вортекс.

48. Этиловый спирт по ГОСТ 5962-67.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- плановые и внеплановые лабораторные исследования в рамках государственного санитарного надзора за субъектами хозяйствования на соответствие требованиям, установленным санитарно-эпидемиологическим законодательством;
- лабораторные исследования по специально разработанным рабочим программам в условиях осложнения эпидемиологической ситуации по инфекциям с контактно-бытовым путем передачи.

Виды санитарно-вирусологического контроля ОСОЧ

1. *Плановый* — осуществляется планово (в течение года) в рамках государственного санитарного надзора за субъектами хозяйствования в соответствии с установленным санитарно-эпидемиологическим законодательством и действующими инструктивно-методическими документами. В качестве санитарно-показательных вирусных патогенов используются ЭВ и НоВ.

2. *Контроль по санитарно-эпидемиологическим показаниям* — осуществляется в случае подъема заболеваемости населения кишечными или другими вирусными инфекциями с контактно-бытовым путем передачи, уровень которой превышает средние сезонные показатели, а также при вспышке или эпидемии в соответствии со специально разработанной рабочей программой (далее — программа).

Программа должна содержать:

- перечень контролируемых объектов и показателей;
- периодичность исследований;
- перечень применяемых для исследований методов;
- план пунктов (точек) отбора проб ОСОЧ;
- количество контролируемых проб ОСОЧ и периодичность отбора;
- календарные графики отбора проб ОСОЧ и проведения их исследований;
- другие разделы (при необходимости).

Контроль по санитарно-эпидемиологическим показаниям осуществляется по согласованию с территориальным учреждением госсаннадзора с участием заинтересованных специалистов (врача-вирусолога, врача-эпидемиолога, врача-гигиениста, врача-инфекциониста) и предусматривает более частые исследования по сравнению с установленными в программе планового контроля.

Объекты исследований

Объектами исследований являются ОСОЧ — многочисленные объекты (предметы) обихода (например, стены, полы, мебель и ее обивка, двери и их ручки, перила, бытовая техника, выключатели, посуда, одежда, постельные принадлежности, детские игрушки и т. д.), а также объекты (предметы) производственной среды, включая госпитальную (например, оборудование, разные технические приспособления, компьютерная техника, телефонные аппараты, спецодежда и т. д.), окружающие человека в связи с той или иной его профессиональной деятельностью.

Алгоритм осуществления санитарно-вирусологических исследований ОСОЧ для установления контактно-бытового пути передачи вирусных инфекций

Для получения лабораторных доказательств в пользу контактно-бытового пути передачи вирусной инфекции необходимо выполнение комплекса мероприятий, включающих санитарно-вирусологические, клинико-диагностические и молекулярно-эпидемиологические исследования, проводимые согласно Инструкции по применению «Лабораторный контроль за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи» (рег. № 002-0213 от 13.06.2013) с целью:

- установить этиологию данной инфекции, что предполагает серо- и генотипическую идентификацию ее возбудителя;
- установить факт контаминации ОСОЧ данным возбудителем;
- установить генетическую идентичность этиологического агента вирусной инфекции - вируса, выделенного из клинического материала пациента, и вируса-контаминанта ОСОЧ.

Общая схема алгоритма санитарно-вирусологических исследований представлена на рисунке 1.

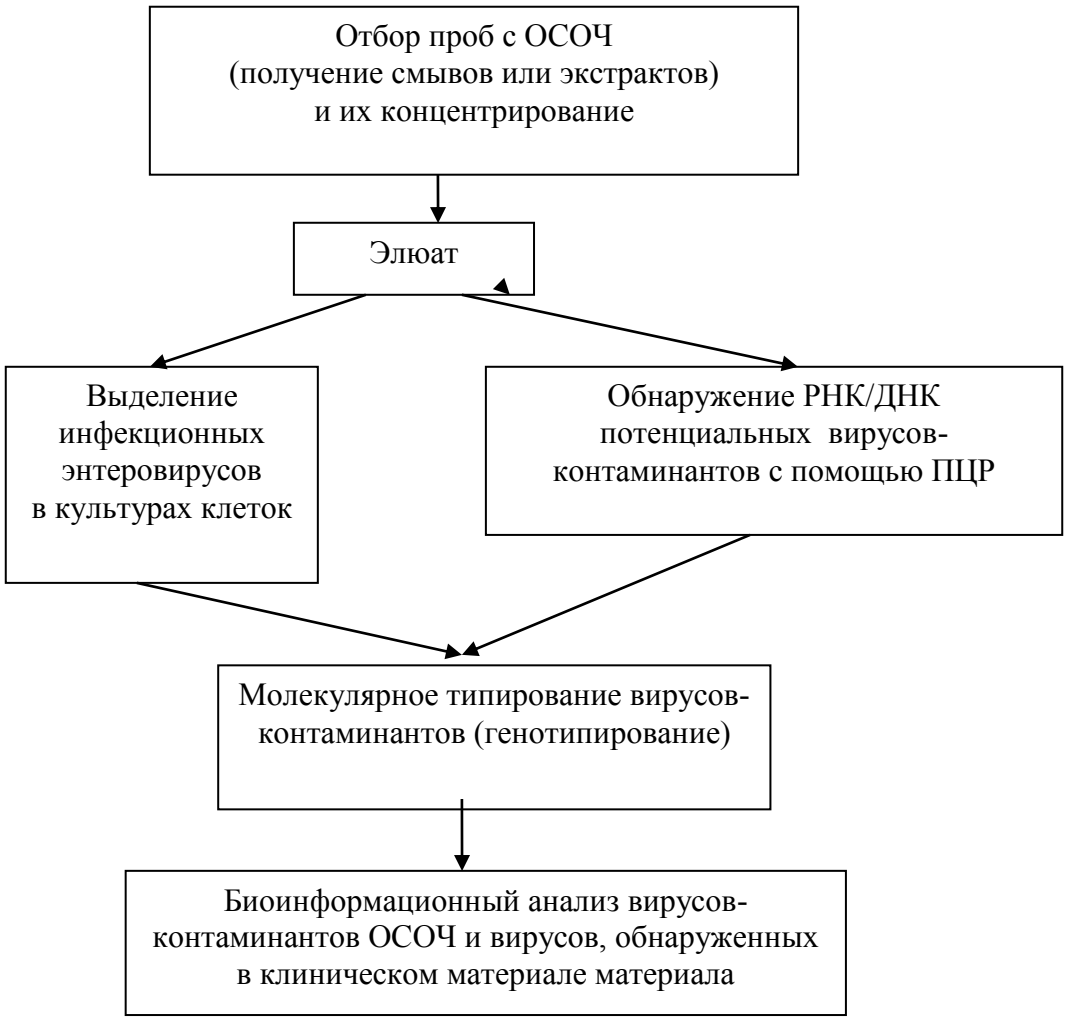

Рисунок 1. — Общая схема санитарно-вирусологических исследований ОСОЧ

Методы и схемы отбора и концентрирования проб из разных видов ОСОЧ для проведения их санитарно-вирусологических исследований

Метод отбора и концентрирования проб зависит от качества ОСОЧ. Для ОСОЧ, имеющих твердую поверхность (например, оборудование, мебель, стены, посуда и т. д.), применяют технологию отбора проб путем получения смывов. Для мягких, пористых и поглощающих биологический вируссодержащий материал ОСОЧ (например, постельные принадлежности, одежда, мягкие игрушки, обивка мебели и др.) используют технологию получения экстрактов.

Подробное описание этапов получения смывов и экстрактов с ОСОЧ представлено в инструкции по применению «Методы отбора и концентрирования

проб из объектов среды обитания человека для проведения санитарно-вирусологических исследований» (рег. № 016-1213 от 25.03.2014, раздел 3).

Общая схема получения смывов и экстрактов ОСОЧ и их концентрирования представлена на рисунке 2.

Транспортирование и хранение проб

Проводят согласно инструкции по применению «Методы отбора и концентрирования проб из объектов среды обитания человека для проведения санитарно-вирусологических исследований» (рег. № 016-1213 от 25.03.2014, раздел 4).

Сортировка проб

После проведения пробоподготовки каждый образец сконцентрированных смывов и экстрактов делят на 2 равные аликвоты, одну из которых используют для идентификации содержащегося в нем вирусного агента, а другую хранят при -20°С для использования на этапе получения доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных в исследуемых санитарно-вирусологическом и клиническом материале в целях установления контактно-бытового пути передачи вирусной инфекции.

Рисунок 2. — Общая схема получения смывов и экстрактов с ОСОЧ и их концентрирования

Контролируемые показатели вирусной контаминации ОСОЧ:

- генетический материал (РНК, ДНК) возбудителей вирусных инфекций человека с контактно-бытовым путем передачи – энтеро-, норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов и др.;

- инфекционные энтеровирусы.

1. Обнаружение РНК/ДНК вирусов осуществляется методом ПЦР с использованием коммерческих ПЦР тест-систем, предназначенных для санитарно-вирусологических исследований и разрешенных для применения на территории Республики Беларусь. Проведение исследований осуществляют в соответствии с инструкцией производителя.

2. Выделение энтеровирусов в культурах клеток и их серотипирование

Выделение энтеровирусов, определение их инфекционного титра и серотипа (серотипирование) осуществляются стандартными методами, изложенными в «Инструкции по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций (рег. № 133-1204 от 12.04.2005, раздел 3).

3. Обнаружение РНК инфекционных энтеровирусов с помощью ИКК-ПЦР

Исследования проводятся в соответствии с п. 5.3.4 «Инструкции по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег. № 134-1204 от 12.04.2005).

4. Молекулярное типирование вирусов-контаминантов ОСОЧ — проводится общепринятыми методами при необходимости осуществления оперативной идентификации (установления серо-, генотипа) вирусного агента, обнаруженного в ОСОЧ с помощью ОТ-ПЦР, или в случае невозможности его выделения и серотипирования в культуре клеток с помощью реакции нейтрализации.

5. Сравнение генетического материала вируса, обнаруженного на поверхности ОСОЧ и вируса, выделенного от пациентов, осуществляют на основе использования биоинформационного анализа, который проводят в соответствии с инструкцией по применению «Лабораторный контроль за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи» (рег. № 002-0213 от 13.06.2013).

Оценка эпидемической опасности ОСОЧ в отношении вирусных патогенов

Осуществляется на основании критериев (показателей), отражающих наличие или отсутствие на поверхности ОСОЧ вирусных частиц (по результатам выделения на культурах клеток) и/или вирусного генетического материала (РНК/ДНК возбудителей вирусных инфекций по результатам ПЦР).

ОСОЧ признается эпидемически безопасным при отрицательном значении вышеуказанных показателей их вирусной контаминации (отсутствии на поверхности вирусных частиц и/или вирусного генетического материала).

Возможные проблемы при проведении санитарно-вирусологических исследований ОСОЧ

1. Возможные проблемы при детекции РНК/ДНК вирусов — контаминантов ОСОЧ и ИКК-ПЦР

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

1.1. Пути устранения ложноотрицательных результатов:

- при проведении всех этапов исследований необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции;

- для разведения выделенной РНК применяется только обработанная диэтилпирокарбонатом вода, или соответствующий РНК-элюент, входящий в состав набора, во избежание загрязнения препарата РНКазами.

1.2. Пути устранения ложноположительных результатов:

- соблюдение пространственного разделения рабочих зон, использование отдельных наборов посуды, пипеток и отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон;

- запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую.

2. Возможные проблемы при выделении энтеровирусов в культурах клеток и их серотипировании

Невозможность выделить энтеровирусный цитопатический агент классическим культуральным методом и/или невозможность его серотипировать с помощью реакции нейтрализации в культуре клеток.

2.1. Пути устранения:

- выявление в исследуемой пробе энтеровирусной РНК методом ОТ-ПЦР;

- молекулярное типирование энтеровирусного материала в положительных пробах.

3. Возможные проблемы при получении доказательств контактно-бытового пути передачи вирусных инфекций с использованием биоинформационных методов анализа

Низкое содержание нуклеиновых кислот возбудителя в пробах объектов окружающей среды, не позволяющее накопить достаточное количество ДНК-мишени для секвенирования.

3.1. Пути устранения:

- проведение 3 пассажей исследуемого образца в культуре чувствительных клеток для накопления вируса, если он является культивируемым (адено-, энтеровирусы);

- если вирусы-контаминанты ОСОЧ являются некультивируемыми, или плохо культивируемыми (рота-, норо-, астровирусы), то их низкое содержание в пробах считается непреодолимым препятствием для секвенирования. В последнем случае лабораторно подтвержденное наличие вирусной контаминации ОСОЧ в совокупности с данными эпидемиологического расследования может рассматриваться в качестве достаточных доказательств для установления контактно-бытового пути передачи вирусной инфекции.

Приложение

УТВЕРЖДАЮ
_____
Руководитель учреждения,
в котором
внедрена инструкция
"_____"_____20___г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения
_____

2. Кем предложено (наименование учреждения разработчика, автор)
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь _____
_____

3. Источник информации
_____
_____

4. Где и когда начато внедрение
_____

(наименование лечебного учреждения, дата внедрения)

5. Общее количество наблюдений _____
_____

6. Результаты применения метода за период с по
Эффективность внедрения:
_____

7. Замечания, предложения
_____
_____
_____

Дата_____

Ответственные за внедрение _____
должность, Ф.И.О., кафедра
_____
Подпись

Примечание: Акт внедрения направляется организации-разработчику (п. 2), пп. 4–8 заполняются организацией, внедрившей разработку.