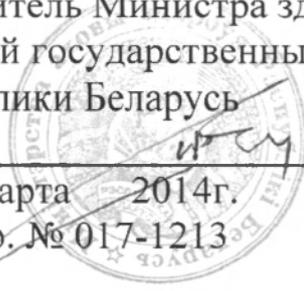


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –  
Главный государственный санитарный врач  
Республики Беларусь

 И.В. Гаевский  
«25» марта 2014г.  
Регистр. № 017-1213

**МЕТОД ОЦЕНКИ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА  
К ВИРУСУ ГЕПАТИТА А**

Инструкция по применению

**Учреждение-разработчик:**

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

**Авторы:**

В.Г. Гудков, Е.Г. Фисенко, И.А. Карабан, И.В. Федорова, А.С. Виринская

Минск, 2014

Настоящая Инструкция по применению «Метод оценки популяционного иммунитета к вирусу гепатита А» (далее - Инструкция) содержит описание условий и метода проведения лабораторных исследований по оценке популяционного иммунитета к возбудителю вирусного гепатита А (далее – ГА), направленных на совершенствование и повышение эффективности эпидемиологического надзора за этой инфекцией.

Инструкция предназначена для специалистов центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья Министерства здравоохранения Республики Беларусь, осуществляющих эпидемиологический надзор, лабораторную диагностику, оценку и мониторинг популяционного иммунитета, разработку противоэпидемических и профилактических мероприятий в отношении ГА.

Показания к применению:

определение уровня популяционного иммунитета к вирусу гепатита А (далее – ВГА) у различных групп населения и на различных территориях в эпидемиологических целях (характеристика иммунной прослойки, определение контингентов населения, не имеющих проективного иммунитета к возбудителю, оценка эффективности вакцинации и используемых вакцин).

оценка иммунного статуса у контактировавших с источником инфекции лиц в очагах инфекции, у лиц с повышенным риском инфицирования, при оценке необходимости вакцинации и ревакцинации.

Оценка популяционного иммунитета к ВГА осуществляется путем исследования проб сыворотки крови от различных (возрастных, профессиональных, социальных) контингентов населения на наличие защитного титра антител к этому возбудителю. Субъекты исследования (лица, от которых берутся пробы крови) включаются в исследование только при наличии их информированного согласия, а дети - при наличии ин-

формированного согласия их родителей или опекунов, подписанного до момента отбора крови. Могут также использоваться пробы крови, полученные и не использованные для других целей, соответствующие дизайну исследования и хранящиеся в надлежащих условиях. В этом случае согласия субъектов исследования.

Критерии включения в исследование:

отсутствие в анамнезе сведений о перенесенном гепатите А;

отсутствие документально подтвержденной информации о вакцинации против гепатита А;

наличие документально подтвержденной информации о вакцинации против гепатита А;

наличие информированного согласия;

наличие заполненной анкеты.

Критерии исключения из исследования:

наличие сведений о перенесенном ранее гепатите А;

наличие документально подтвержденной информации о вакцинации против гепатита А (при оценке популяционного иммунитета среди невакцинированных лиц);

отсутствие документально подтвержденной информации о вакцинации против гепатита А в возрастной группе 6-9 лет (при оценке популяционного иммунитета среди вакцинированных лиц);

отсутствие информированного согласия;

отсутствие заполненной анкеты;

## **2. Перечень необходимого оборудования и реагентов**

2.1. Пробирки стерильные для забора крови объемом от 2 до 5 мл.

Предпочтительнее использовать пробирки типа вакутайнер с активатором свертываемости, а также пробирки с активатором свертываемости и разделительным гелем.

2.2. Комплект оборудования для проведения исследований методом ИФА (автоматический анализатор, промывочное устройство, планшетный инкубатор или термостат на 37<sup>0</sup>С, набор одноканальных и 8-канальных дозаторов на 10 – 300 мкл).

2.3. Рутинное лабораторное оборудование (холодильник, морозильник, центрифуга лабораторная, автоклав и др.).

2.4. Тест-система для количественного определения иммуноглобулинов IgG к ВГА методом ИФА, соответствующая имеющемуся набору оборудования для проведения исследований методом ИФА. Для использования рекомендуется «Тест-система для количественного определения антител класса IgG к вирусу гепатита А методом иммуноферментного анализа ИФА-ВГА-АТ-Г» по ТУ ВУ 100558032.241-2013.

2.5. Расходные материалы и реагенты (наконечники для дозаторов, салфетки, вода неионизированная или дистиллированная, дезинфицирующие средства, перчатки резиновые и др.).

Поверхности рабочих столов и оборудования перед работой и после ее завершения должны обрабатываться дезинфицирующим раствором.

### **3. Основные этапы исследования по оценке популяционного иммунитета к вирусу гепатита А.**

Исследование включает следующие этапы:

3.1. Разработка плана исследования.

3.2. Забор и подготовка проб крови для исследования.

3.3. Проведение исследования проб сывороток крови на наличие антител к ВГА.

3.4. Статистическая обработка полученных результатов исследования.

3.5. Оценка и рекомендации по использованию результатов мониторинга.

#### **4. Разработка плана исследования.**

План эпидемиологического исследования содержит информацию о планируемом исследовании по следующим основным пунктам:

##### 4.1. Паспортная часть.

4.1.1. Наименование эпидемиологического исследования с указанием территории, на которой оно проводится.

4.1.2. Название и юридический адрес организации, проводящей исследование.

4.1.3. Ф.И.О., место работы, должность и контактные данные руководителя исследования, а также ответственных исполнителей исследования с указанием их зоны ответственности, например, эпидемиология исследования, клиническая часть, лабораторные исследования, статистика и др.

##### 4.2. Основная часть плана исследования.

4.2.1. Введение, характеристика эпидемиологической ситуации на территории и обоснование планируемого исследования.

##### 4.2.2. Цели (задачи) исследования (главная цель, другие цели).

Главной целью исследования, как правило, является изучение напряженности иммунитета к вирусу гепатита А и риска инфицирования в различных возрастных и социально-экономических группах населения на территории исследования.

Другими целями исследования могут быть, например, разработка рекомендаций по совершенствованию тактики иммунопрофилактики ГА, проведению противоэпидемических мероприятий и др.

4.2.3. Основные параметры исследования (обследуемая популяция (контингенты) населения, дизайн исследования, объем выборки, методика исследования).

В зависимости от цели исследования в него могут включаться различные возрастные, профессиональные, социальные группы населения.

Объем выборки определяется возможностью установить статистически достоверные различия между обследуемыми группами, при этом в каждой обследуемой группе необходимое количество наблюдений отбирается методом случайной выборки.

4.2.4. Статистические методы обработки результатов исследования.

4.2.5. Планируемые формы реализации результатов исследования.

Любые отклонения от первоначального статистически обоснованного плана исследования описываются и мотивируются в поправках к этому плану и в заключительном отчете.

## **5. Забор и обработка проб крови.**

Сбор проб крови от субъектов исследования осуществляют учреждения здравоохранения в соответствии с действующими ТНПА.

Кровь от обследуемых лиц забирают в лабораторную стеклянную или пластмассовую посуду (предпочтительно, в вакутайнер с активатором свертываемости и разделительным гелем согласно инструкции по его применению) в объеме 2,0 – 5,0 мл. Выдерживают в термостате при плюс 37°C, затем центрифугируют при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин. Сыворотку отсасывают и хранят до исследования при плюс 2 - 8°C в течение 5 дней или при минус 20°C в течение более длительного срока. Каждая проба маркируется и регистрируется в журнале учета проб, этикетка с маркировкой пробы переносится или дублируется при переносе пробы в другую емкость.

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

## **6. Проведение исследования.**

Ход исследования. 1. *Сенсибилизация твердой фазы.* Анти-IgG иммуноглобулин (№1) растворяют в 3,0 мл дистиллированной воды, осторожно перемешивают пипетированием и вносят по 100 мкл в каждую лунку, кроме лунки А1. Лунку А1 оставляют пустой вплоть до внесения субстрат-индикаторного раствора (СИР). Заполненные лунки плотно заклеивают липкой лентой и инкубируют 2 часа во влажной камере при 37<sup>0</sup>С. Содержимое отсасывают и лунки отмывают 4 раза, как указано ниже.

Отмывка. *Концентрат ФСТБ (№9)* 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 37<sup>0</sup>С 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.

2. *БСА (№ 2)* растворяют в 2,5 мл дистиллированной воды и вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, плотно заклеивают липкой лентой и инкубируют во влажной камере в течение 45 мин при плюс 37<sup>0</sup>С. Отмывают 3 раза.

3. *ОК (№ 5)* растворяют в 2,5 мл, *ПК-1 (№ 6)* - в 2,5 мл, *ПК-2 (№7)* – в 0,5 мл отмывающего раствора. В следующие за А1 4 лунки ряда вносят по 100 мкл раствора ОК (№ 5), в следующие 2 - по 100 мкл раствора ПК-1 (№ 6), в следующие 3 – по 100 мкл ПК-2 (№7). Оставшуюся часть контрольных образцов хранят при минус 20<sup>0</sup> С.

*Исследуемые сыворотки* разводят этим же отмывающим раствором в 10 раз и вносят по 100 мкл в остальные лунки планшета (рекомендуется исследовать каждую пробу в 2-х лунках), плотно заклеивают заполненные лунки липкой лентой и инкубируют во влажной камере 2 часа при 37<sup>0</sup>С. Отмывают 4 раза.

4. *Антиген ВГА (№3)* растворяют в 2,5 мл отмывающего раствора. Вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют во влажной камере при плюс 37<sup>0</sup>С в течение 2-х ч или при плюс 18-20<sup>0</sup>С в течение 18-20 часов. Оставшийся антиген хранят при минус 20<sup>0</sup>С до следующей постановки. Отмывают 4 раза.

5. *Конъюгат (№4)* растворяют в 3,0 мл отмывающего раствора. Вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют во влажной камере 1,5 часа при плюс 37<sup>0</sup>С. Отмывают 4 раза.

6. *Субстрат - индикаторный раствор (СИР)* готовят непосредственно перед использованием. Для приготовления СИР следует использовать только новые наконечники.

К раствору ТМБ (№ 8) добавляют 1,8 мл СБ (№ 10). Тщательно перемешивают и вносят в каждую лунку по 100 мкл приготовленного СИР, выдерживают 10 мин в темном месте при комнатной температуре, после чего вносят в лунки по 50 мкл стоп-реагента (№11) и учитывают.

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-1 значе-

ния 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 0,15о.е. Положительными, содержащие 20 и более МЕ/мл IgG анти-ВГА считаются пробы, у которых ПОП равен или выше среднего значения ПОП для ПК-2.

Положительный результат свидетельствует о наличии в пробе защитного титра антител (20 и более мМЕ/мл) к ВГА.

### **7. Статистическая обработка результатов исследования.**

Результаты обрабатываются статистически для оценки значимости полученных показателей и достоверности различий между ними, а также для оценки риска инфицирования ВГА в различных возрастных, социальных, профессиональных и др. группах населения.

С целью определения вариативности величин, которые выражены в процентах, вычисляют среднюю ошибку по формуле:

$$m_p = \pm \frac{P(100 - P)}{n},$$

где:  $m_p$  - средняя ошибка,

$P$  - полученная частота в процентах,

$n$  - число наблюдений (при  $n < 30$  в формуле вместо  $n$  используют  $n-1$ ).

Сравнение относительных частот бинарного признака (наличие или отсутствие защитного титра антител) в различных возрастных, социальных, профессиональных и др. группах населения проводят путем сравнения их доверительных интервалов. При вычислении верхней и нижней границы 95% доверительного интервала для относительной частоты бинарного признака (доли) используют формулу:

$$P \pm 1,96 \times \left( \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} + \frac{1}{2n} \right),$$

где:  $P$  – относительная частота события,

$n$  – число наблюдений,

$1/2n$  – поправка на непрерывность, компенсирующая ошибку, возникающую при аппроксимации биномиального распределения нормальным.

Для установления статистически значимых различий между значениями относительных частот (доли) бинарного признака (наличие или отсутствие защитного титра антител) необходимо сравнить их доверительные интервалы. Если доверительные интервалы сравниваемых относительных частот не перекрываются, то различия данных показателей можно считать статистически значимыми (вероятность случайной ошибки меньше 5%,  $p < 0,05$ ). Соответственно, если доверительные интервалы перекрываются, то различия статистически незначимы (вероятность случайной ошибки больше 5%,  $p > 0,05$ ).

Оценка риска инфицирования ВГА в различных возрастных, социальных, профессиональных и др. группах населения проводится с использованием показателя отношения шансов OR (от англ. Odds Ratio). При этом за референтную принимается группа с наиболее низкой долей серонегативных лиц.

Исследуемые лица	Серонегативные (абсолютное число)	Серопозитивные (абсолютное число)
Референтная группа	a	b
Исследуемая (опытная группа)	c	d

Отношение шансов рассчитывается по формуле:

$OR = (a*d)/(b*c)$ , где:

a – абсолютное число серонегативных лиц в референтной группе,

b – абсолютное число серопозитивных лиц в референтной группе,  
c – абсолютное число серонегативных лиц в исследуемой группе,  
d – абсолютное число серопозитивных лиц в исследуемой группе.

Если  $OR = 1$ , то шансы быть восприимчивым к ВГА в исследуемой и референтной группах равны.

Если  $OR > 1$ , то шансы быть восприимчивым к ВГА в исследуемой группе выше, чем в референтной. Чем больше  $OR$  превышает 1, тем больше шансы заболеть в исследуемой группе в сравнении с референтной.

В случае, когда в нескольких возрастных, социальных, профессиональных и др. группах получены значения  $OR > 1$ , необходимо рассчитать вероятный диапазон достоверных значений  $OR$ .

Сначала вычисляется ошибка фактора:

$$\text{ошибка фактора} = e^{1,96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}}, \text{ где:}$$

e – натуральный логарифм (2,71828),

1,96 - число необходимое для того, чтобы быть уверенным, что существует 95% статистическая вероятность того, что в интервале между нижней и верхней границами находится истинное значение  $OR$ , вне зависимости от выбранных для исследования групп.

Затем, вычисляется нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала:

$$\text{нижняя граница} = \frac{OR}{\text{ошибка фактора}}$$

$$\text{верхняя граница} = OR * \text{ошибка фактора}$$

Наиболее вероятными шансы быть восприимчивым к ВГА будут в тех групп населения, в которых нижняя и верхняя границы доверительного интервала OR больше 1.

Статистическую обработку полученных результатов исследования рекомендуется проводить с использованием специализированных статистических пакетов STATISTICA, SPSS, EPI INFO, BIOSTAT и др.

### **8. Оценка и использование результатов мониторинга.**

Оценка индивидуального иммунитета к ВГА. Обследуемое лицо считается защищенным от заболевания ГА в случае обнаружения в крови защитного титра антител к ВГА – 20МЕ/мл или более.

Оценка популяционного иммунитета. Оценка популяционного иммунитета осуществляется с учетом эпидемиологической ситуации по ГА на конкретной территории, масштабов и продолжительности вакцинации, и полученной в результате проведенного там мониторинга структуры иммунной прослойки населения с защитным титром антител.

Так, на территории с благополучной эпидемиологической ситуацией и при отсутствии плановой вакцинации доля населения с защитным титром антител может не превышать 10 – 15%. Вместе с тем, при возникновении угрозы вспышки инфекции следует предусмотреть эффективные противоэпидемические мероприятия, включая экстренную вакцинопрофилактику в очагах инфекции или даже в пределах населенных пунктов.

На гиперэндемичных территориях, наоборот, доля популяции с защитным титром антител будет преобладающей, нередко достигающая 90 -100% в средних и старших возрастных группах. Снижение удельного веса иммунной прослойки будет свидетельствовать о снижении интенсивности циркуляции возбудителя, росте эффективности противо-

эпидемических мероприятий и улучшении санитарно-гигиенических условий жизни.

Эффективность вакцинации оценивается путем сопоставления доли привитых и реальной иммунной прослойки среди этого контингента населения.

Информация об уровне популяционного иммунитета к ВГА на конкретных территориях используется для оценки эпидемиологической ситуации и разработки плана противоэпидемических мероприятий в отношении ГА.

Популяционный иммунитет к ВГА обеспечивает противоэпидемический уровень защиты населения в случае удельного веса иммунной прослойки с защитным титром антител 70 – 75% и выше. При проведении экстренных противоэпидемических мероприятий следует достигать доли привитых более 75%.