Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью

Методические указания
МУК 4.2.2746—10

Издание официальное

Москва • 2011

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью

Методические указания
МУК 4.2.2746—10

ББК 51.9
П59

П59 **Порядок** применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—16 с.

1. Методические указания разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. Б. Ежлова, Ю. В. Демина), ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (А. Т. Подколзин, К. В. Кулешов, Г. А. Шипулин, В. В. Малеев, В. И. Покровский).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г.Онищенко 30 сентября 2010 года.

4. Введены в действие с 30 сентября 2010 года.

5. Введены впервые.

ББК 51.9

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

1. Область применения 4
2. Список сокращений 4
3. Общие положения 5
4. Организация исследований 6
5. Правила сбора, хранения и транспортировки клинического материала и образцов объектов окружающей среды 8
6. Порядок проведения лабораторных исследований 9
7. Нормативные ссылки 13
Приложение 1. Сбор, хранение и транспортировка материала для проведения молекулярно-генетических исследований 14
Приложение 2. Форма ежеквартального (ежемесячного без графы 12) отчета региональных центров по мониторингу за инфекционными и паразитарными болезнями, предоставляемых в референс-центр по мониторингу за кишечными инфекциями 15

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
30 сентября 2010 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью

Методические указания
МУК 4.2.2746—10

1. Область применения

1.1. В настоящих методических указаниях определены порядок применения молекулярно-генетических методов исследования, а также сбора, упаковки, хранения и транспортирования биологического материала и образцов объектов окружающей среды (ООС) при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью различной этиологии, вызванных ПБА III—IV группы, не относящимися к условно-патогенной флоре (УПФ).

1.2. Методические указания предназначены для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы лечебно-профилактическими и другими учреждениями, независимо от ведомственной принадлежности и организационно-правовой формы.

2. Список сокращений

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ОКИ – острые кишечные инфекции
ООС – объекты окружающей среды

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПБА – патологические биологические агенты
ПЦР – полимеразная цепная реакция
УПФ – условно-патогенная флора
AFLP – оценка полиморфизма длинны фрагментов амплификации
EIEC – энтероинвазивные *E. coli*
LCR – лигазная цепная реакция
MLST – мультилокусное секвенирование-типирование
NASBA – метод изотермической амплификации РНК (*Nucleic Acids Seaquencence Amplification*)
PFGE – электрофорез в пульсирующем поле
RAPD – амплификации со случайными праймерами
VNTR – амплификация тандемных повторов с переменной копийностью

3. Общие положения

К молекулярно-генетическим методам исследования относятся методы выявления и характеристики инфекционных агентов на основе исследования их нуклеиновых кислот с применением или без применения амплификационных технологий путем определения наличия, размера и нуклеотидного состава различных элементов генома возбудителя, либо сочетания этих подходов.

Наибольшее распространение получили амплификационные методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выявления ее продуктов применяются методы гель-электрофореза, гибридизации с флуоресцентно-меченными зондами, гибридизационно-ферментное выявление продуктов ПЦР и способы детальной характеристики продукта с применением нуклеотидных биочипов и метода прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей продуктов реакции.

Достаточно широкое распространение имеют также методы анализа генома возбудителя без применения амплификационных технологий. Наиболее распространенным из них является метод электрофореза в пульсирующем поле.

Применение молекулярно-генетических методов исследования должно рассматриваться не как альтернатива, а как обязательное дополнение к регламентированным схемам диагностики острых кишечных инфекций, позволяющее оперативно выявлять комплекс возбудителей ОКИ и проводить оценку идентичности бактериальных и вирусных изолятов.

4. Организация исследований

4.1. Молекулярно-генетические методы исследования в очагах ОКИ с групповой заболеваемостью применяются для решения следующих задач:

• наиболее раннего установления этиологии заболеваний с целью своевременного начала адекватной терапии и проведения соответствующих санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий;

• выявления ДНК/РНК возбудителей в предполагаемых факторах передачи и источниках инфицирования;

• оценки идентичности изолятов возбудителей, выделенных из различных материалов с целью определения источников инфицирования и факторов передачи инфекции.

4.2. Применение молекулярно-генетических методов исследования является обязательным в случае исследования материала из очагов ОКИ с групповой заболеваемостью:

• при регистрации в очаге групповой заболеваемости ОКИ летальных исходов от данных заболеваний, в том числе установленной этиологии;

• при отсутствии выделения от пациентов (> 30 % обследованных) безусловных патогенов в эпидемически значимых количествах в сроки, регламентированные действующими нормативно-методическими документами;

• при выделении от больных только условно-патогенной флоры в единичных случаях, без достоверно выявленного фактора передачи возбудителя;

• при проведении детекции вирусных агентов в материалах из окружающей среды, продуктов питания или лиц – предполагаемых источников инфицирования (если такая область применения регламентируется производителем диагностических препаратов);

• при проведении оценки идентичности изолятов микроорганизмов, выявленных из различных источников и нерезультативном применении при этом комплекса классических микробиологических и серологических методик.

4.3. При работе в эпидемических очагах ОКИ формирование панели образцов для исследования с определением количества обследуемых больных, лиц, подвергшихся риску заражения, декретированного контингента, образцов ООС и выделенных изолятов возбудителей определяется специалистами, уполномоченными осуществлять государствен-

ный санитарно-эпидемиологический надзор в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

4.4. Для обеспечения контроля качества проводимых исследований целесообразно дополнительно направлять на исследование клинический материал от лиц без клинических проявлений заболевания, не имеющих эпидемиологической связи с обследуемым очагом в количестве ~ 20 % от количества лиц, имеющих эпидемиологическую связь с очагом в виде единой зашифрованной отправителем панели. Клинический материал от лиц – предполагаемых источников инфицирования не подлежит зашифровке в целях правильной организации лабораторных исследований.

4.5. Первичное молекулярно-генетическое исследование (ПЦР-диагностика) клинического материала от больных проводится в лабораториях лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ), ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, имеющих в своем составе ПЦР-лаборатории.

4.6. Первичное молекулярно-генетическое исследование предполагаемых источников инфицирования, лиц, подвергшихся заражению и ООС осуществляют на базе ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, имеющих в своем составе ПЦР-лаборатории.

4.7. Региональные центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней (региональные центры) Роспотребнадзора проводят исследования по оценке идентичности возбудителей, выявленных у пострадавших, лиц – предполагаемых источников инфицирования и ООС (при наличии необходимого оборудования и квалификации персонала), а также оказывают помощь ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации при исследовании больших объемов материала. Оценка идентичности культур микроорганизмов проводится только в отношении тех штаммов, которые были расценены как идентичные при проведении микробиологической диагностики.

При невозможности проведения работ по оценке идентичности изолятов в условиях региональных центров Роспотребнадзора, материал для данных исследований направляется в референс-центр по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций (ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3).

4.8. При получении отрицательных результатов первичного исследования клинического материала от больных и при получении дискор-

дантных результатов исследований в региональных центрах, первичный клинический материал, образцы проб ООС и выделенные культуры возбудителей направляются для исследования в референс-центр по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций

4.9. Референс-центр по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций оказывает информационно-методическую поддержку деятельности органов и учреждений Роспотребнадзора.

4.10. ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации ежемесячно представляют информацию об этиологической расшифровке очагов ОКИ с групповой заболеваемостью (от 5-ти случаев) в региональные центры по мониторингу за инфекционными и паразитарными болезнями (прилож. 2 без графы 12).

4.11. Региональные центры Роспотребнадзора ежеквартально (до 15-ги числа следующего месяца) направляют информацию о результатах этиологической верификации очагов ОКИ с групповой заболеваемостью в референс-центр по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций в разрезе курируемых территорий.

4.12. Референс-центр по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций ежегодно (до 15-го марта следующего за отчетным года) направляет в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека отчет о регистрации и этиологической верификации очагов ОКИ с групповой заболеваемостью на территории Российской Федерации, а также рекомендации по совершенствованию применяемых при их расследовании методов лабораторной диагностики.

5. Правила сбора, хранения и транспортировки клинического материала и образцов объектов окружающей среды

5.1. Сбор хранение и транспортировка клинического материала и образцов ООС осуществляется врачами ЛПУ и специалистами, уполномоченными осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор в соответствии с действующими нормативно-методическими документами (раздел № 7) и инструкциями к используемым тест-системам.

5.2. Лабораторным исследованиям подлежат следующие материалы:

• клинический материал от пострадавших лиц, полученный в первые 72 ч от начала заболевания и не позднее 1 дня госпитализации (фекалии, взятые в объеме 2—5 мл), рвотные массы, по согласованию – мазки из ротоглотки и другие типы клинического материала);

• аутопсийный материал (фекалии, фрагменты стенки различных отделов ЖКТ);

• клинический материал от лиц – предполагаемых источников инфицирования (фекалии, взятые в объеме 2—5 мл, или ректальные мазки (прилож. 1), рвотные массы, по согласованию – образцы крови и другие типы клинического материала). Сбор ректальных мазков следует проводить только при невозможности получения фекалий в виде объемной пробы;

• образцы объектов окружающей среды (ООС), как предполагаемых факторов передачи заболевания. Объем выборки ООС (продукты питания, концентраты образцов воды) определяется специалистами, уполномоченными осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор. При исследовании продуктов питания обязательным является исследование смывов с их упаковок, поэтому продукты питания для исследования необходимо предоставлять в целой упаковке;

• культуры штаммов микроорганизмов, выделенных при проведении исследований клинического материала или ООС на транспортных средах.

5.3. Не допускается транспортировка клинического материала от больных и выделенных культур микроорганизмов в одном контейнере с образцами ООС и материалом от лиц – предполагаемых источников инфицирования.

5.4. В учреждении, осуществляющем первичное исследование материала, каждый образец клинического материала и ООС делится на две части, одна из которых подвергается исследованию, а другая хранится для обеспечения возможности ее исследования в региональном центре или референс-центре по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций.

6. Порядок проведения лабораторных исследований

6.1. Лабораторные исследования проводятся в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

6.2. Лабораторные исследования для установления этиологии заболеваний, и выявления аналогичных возбудителей в ООС и лиц – предполагаемых источников инфицировании, организуемые на базе лабораторий ЛПУ, ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации и Региональных центрах Роспотребнадзора проводят с использованием диагностических тест-систем, разрешенных к

применению на территории Российской Федерации в установленном порядке.

Для выявления патогенов методом ПЦР (ОТ-ПЦР) предпочтение должно отдаваться диагностическим тест-системам, которые обеспечивают максимальную контаминационную безопасность исследований (тест-системы с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, с возможностью использования деконтаминационных процедур на основе принципа пост-ПЦР стерилизации).

Референс-центр по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций использует в своей работе весь доступный комплекс молекулярно-генетических методик.

6.3. Минимальный спектр исследований клинического материала от пострадавших при вспышках ОКИ должен включать детекцию:

- норовирусов 2 генотипа;
- ротавирусов группы А;
- микроорганизмов рода *Shigella* и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC);
- микроорганизмов рода *Salmonella*;
- термофильной группы микроорганизмов рода *Campylobacter*.

Для детекции ротавирусов группы А в клиническом материале могут альтернативно применяться диагностические тест-системы на основе ИФА или латекс-агглютинации при наличии данных о их валидации относительно тест-систем, рекомендованных для использования ВОЗ (Базовые протоколы оценки бремени ротавирусных гастроэнтеритов по данным госпитализации и изучения обращаемости детей за медицинской помощью по поводу гастроэнтеритов на уровне обслуживаемого населения).

Для детекции перечисленных групп бактериальных возбудителей обязательно параллельное применение бактериологической диагностики, проводимой в соответствии с действующими нормативно-методическими документами, с получением чистых культур возбудителей для возможного проведения впоследствии оценки их идентичности.

6.4. При неинформативности исследования на первичный спектр микроорганизмов (п. 6.3) или наличии дополнительных клинико-эпидемиологических данных в данный спектр исследований целесообразно включать возбудителей астровирусной инфекции, аденовирусной инфекции, тифо-паратифозных заболеваний, иерсиниозов, эшерихиозов.

При наличии клинико-эпидемиологических данных не позволяющих исключить у пациента холеру, лабораторное исследование мате-

риала проводится в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

6.5. Лабораторное исследование материала от пострадавших на наличие возбудителей острых кишечных инфекций вирусной и бактериальной этиологии, вызванных ПБА III—IV группы проводится в течение 24-х часов с момента его поступления в лабораторию. При поступлении в лабораторию большого количества образцов и невозможности их исследования в указанные сроки в полном объеме, специалистами лаборатории формируется репрезентативная выборка (не менее 20 образцов), исследование которой производится в вышеуказанные сроки, с последующим проведением полного объема исследований.

6.6. Лабораторные исследования по установлению идентичности изолятов микроорганизмов проводятся с применением молекулярно-генетических методик, обеспечивающих:

- необходимую для исследований разрешающую способность (способность дифференцировки штаммов микроорганизмов, циркулирующих на данной территории);
- межлабораторную воспроизводимость результатов исследований;
- низкий риск получения невалидных результатов исследования в комплексе с применением диагностических тест-систем.

6.7. В отношении возбудителей вирусной этиологии используются методы, основанные на прямом секвенировании вариабельного участка (участков) их генома. Для исключения получения ложноположительных результатов, методом прямого секвенирования исследуются смещенные или альтернативные по отношению к используемым для диагностики области генома возбудителя. Предпочтение должно отдаваться методикам, позволяющим провести исследование возможно более протяженного участка генома возбудителя.

6.8. В отношении возбудителей бактериальной этиологии, используются методы, минимизирующие возможность субъективной оценки их результатов. Предпочтение должно отдаваться широко используемым в мире методикам, позволяющим провести сопоставление получаемых результатов с международными данными (мультилокусное секвенирование-типирование – *MLST* и его варианты, амплификация тандемных повторов с переменной копийностью – *VNTR* и его варианты, электрофорез в пульсирующем поле – *PFGE*, оценка полиморфизма длинны фрагментов амплификации – *AFLP*). Желательно более широкое применение методик основанных на прямом секвенировании участка (участ-

ков) генома возбудителя, как методик обеспечивающих абсолютную воспроизводимость исследований.

Не рекомендуется применение методик, обладающих низкой межлабораторной воспроизводимостью – например амплификации со случайными праймерами (*RAPD*) или низкой дифференцирующей способностью.

6.9. При необходимости проведения одновременного исследования клинического материала от пострадавших и материалов с потенциально редким или низким содержанием возбудителя (ООС, предполагаемые источники инфицирования) придерживаются следующей последовательности выполнения работ:

1. Обработка материала и выделение нуклеиновых кислот (без проведения детекции патогенов) из образцов с потенциально редким или низким содержанием возбудителя (ООС, лица – предполагаемые источники инфицирования).

2. Обработка и исследование материала от пострадавших лиц и установление доминирующего возбудителя или доминирующих возбудителей.

3. Тестирование проб ООС и материала от лиц – предполагаемых источников инфицирования на наличие доминирующего патогена или патогенов.

При проведении лабораторной диагностики заболеваний данной группы следует учитывать, возможную крайне высокую концентрацию их возбудителей в клиническом материале и высокий риск перекрестной контаминации образцов при нарушении правил их хранения, транспортировки и обработки. Особенно характерным это является для ротавирусов и аденовирусов.

6.10. При проведении исследования продуктов питания на содержание ПБА наряду с самим продуктом исследуются смывы с его упаковки.

6.11. При тестировании материалов с потенциально редким или низким содержанием возбудителя с применением тест-систем на основе амплификационных технологий количество отрицательных контролей, прошедших все этапы исследований, должно составлять не менее 20 % от количества исследуемых образцов.

6.12. По результатам проведенных исследований оформляется заключение в котором должна быть представлена следующая информация:

• количество, характер поступивших на исследование образцов и их состояние после транспортировки (особое внимание должно уделяться состоянию целостности первичных контейнеров и упаковок продуктов питания);

• перечень использованных тест-систем;

• полученные результаты исследования.

При проведении исследования части образцов оформляется предварительное заключение, в котором дополнительно приводятся сведения о доле исследованных образцов.

6.13. В заключении, оформляемом по результатам оценки идентичности изолятов, должна быть представлена следующая информация:

• количество, состояние полученных культур микроорганизмов;

• краткое описание используемой методики, с указанием используемого оборудования и программного обеспечения, при использовании метода прямого секвенирования – размеров и расположения анализируемых участков генома;

• при использовании методик, результаты которых имеют форму паттернов (*VNTR, AFLP, PFGE*) – графическое представление полученных результатов.

6.14. Организации, ответственные за проведение данных разделов работы сохраняют образцы клинического материала и ООС, культуры микроорганизмов и результаты исследований в виде первичных материалов (файлы, полученные на детектирующих приборах) до оформления окончательного донесения о очаге инфекционного заболевания с групповой заболеваемостью, а при проведении комиссионной судебной экспертизы в рамках уголовного дела – до истечения срока обжалования решения суда.

7. Нормативные ссылки

1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» с дополнением СП 1.3.2518—09 от 02.06.2009 № 42.

2. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

3. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

4. МУК 4.2.2029—05. «Методические указания по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов».

5. МУ 4.2.2218—07 «Лабораторная диагностика холеры»

6. ГОСТ 26668—85 «Методы отбора проб для микробиологических анализов»

7. ГОСТ Р ИСО 7218—2008 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям»

Приложение 1

Сбор, хранение и транспортировка материала для проведения молекулярно-генетических исследований

Фекалии

Пробу фекалий (1,0—2,0 г.) у грудных детей забирают из подгузника у пациентов старшего возраста – из помещенного в горшок или подкладное судно одноразового полиэтиленового пакета или одноразовой пластиковой емкости (чашка Петри). Затем в количестве 1,0 г (примерно) переносят в специальный стерильный контейнер. Контейнер с материалом доставляется в лабораторию в емкости со льдом в течение 1 суток.

Условия хранения и транспортировки материала:

- при температуре 2—8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Форма ежеквартального (ежемесячного без графы 12) отчета региональных центров по мониторингу за инфекционными и паразитарными болезнями, предоставляемых в референс-центр по мониторингу за кишечными инфекциями

(ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва, ул. Новогиреевская,3)
(заполняется на очаги с групповой заболеваемостью от 5-ти случаев)

Субъект РФ	Наименование муниципального образования (город, район, населенный пункт)	Наименование учреждения	Число случаев заболеваний/в том числе среди детей	Диагноз	Выделен возбудитель (определен молекулярно-генетическими методами), не выделен/не определен	От скольких больных выделен возбудитель	От скольких контактных выделен возбудитель/ работников декретированных групп	С каких объектов внешней среды выделен (определен) возбудитель (вода, продукты, готовые блюда, смывы)	Метод, которым определен возбудитель, используемые тест-системы	Учреждение, лаборатория, где проводились исследования	Исследования, проведенные в региональном центре по конкретному очагу (наименование материала, число проб, метод, результат)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью

Методические указания
МУК 4.2.2746—10

Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 25.02.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 200 экз. Заказ 45

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru