

Приложение
к письму Роспотребнадзора
от «____» _____

22.08.2024 02/14535-2024-32

**Алгоритм лабораторного обследования в очагах гепатитов В, С, D,
связанных с оказанием медицинской помощи**

**Рекомендации по лабораторному обследованию лиц с подозрением на
заболевания и контактных.**

Сбор образцов от впервые выявленных лиц с гепатитами В, С, D необходимо осуществлять в максимально короткие сроки, не позднее 14 дней после постановки диагноза и **до начала противовирусной терапии.**

Обследование контактных лиц в очагах гепатитов В, С, D, связанных с оказанием медицинской помощи (персонала и пациентов, находившихся в равных условиях с учетом риска возможного инфицирования, контактных в семейно-квартирных очагах), проводится на все гемоконтактные инфекции: (гепатиты В, С и ВИЧ-инфекция)¹.

Лица с маркерами гепатита В дополнительно обследуются на гепатит D².

Лабораторное обследование контактных лиц в очагах гепатитов В, С, D, связанных с оказанием медицинской помощи, проводится:

- при выявлении очага,
- через 1 месяц,
- через 6 месяцев.

Объем биоматериала для проведения лабораторных исследований, необходимых для обследования контактных лиц в очагах гепатитов В, С, D, связанных с оказанием медицинской помощи, составляет **не менее:**

- 4 аликвоты по 1 мл плазмы крови;
- 4 аликвоты по 1 мл сыворотки крови.

Взятие и хранение плазмы и сыворотки крови:

Плазма крови:

1. Взятие крови произвести в пробирку с 6 % ЭДТА (пробирка с сиреневым колпачком).

! Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя, так как происходит ингибирование ПЦР, что может привести к ложноотрицательным результатам.

¹ Пункт 753 главы VII СанПиН 3.3686-21

² Пункт 716 главы VII СанПиН 3.3686-21

2. Закрытую пробирку с кровью сразу после взятия несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке с антикоагулянтом тщательно перемешалась.

3. После перемешивания пробирку поместить в штатив.

4. Для получения плазмы крови пробирки с цельной кровью центрифугировать при 3000 об/мин в течение 10 мин при температуре 18–25 °С.

5. Далее аликвоту плазмы крови в объёме не менее 1,0 мл перенести в пробирки объёмом 2,0 или 5,0 мл, используя наконечник с фильтром.

Условия хранения и транспортировки материала

- при температуре 2–8 °С – в течение 5 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

! Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

Сыворотка крови:

1. Взятие крови произвести в пробирку с активатором свертывания или с активатором свертывания и гелем (пробирки с красным или желтым колпачками). Закрытую пробирку с кровью сразу после взятия несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке с активатором свертывания и гелем тщательно перемешалась.

2. После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

3. Для получения сыворотки крови пробирки с гелем необходимо центрифугировать при 3500 об/мин. в течение 10 мин при температуре 18–25°С.

4. Далее аликвоту сыворотки крови в объёме не менее 1,0 мл перенести в пробирки объёмом 2,0 или 5,0 мл, используя наконечник с фильтром.

! Недопустимо использование гемолизированной сыворотки крови!

Условия хранения и транспортировки материала

- при температуре 2–8 С – в течение 5 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

! Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

В очагах парентеральных вирусных гепатитов, предположительно связанных с инфицированием при оказании медицинской помощи, с целью уточнения этиологии заболевания и своевременного выявления заболевших среди контактных проводятся следующие исследования:

1) На гепатит В – рекомендуется проводить одновременное исследование на:

а. HBsAg в сыворотке крови (Метод ИФА. С обязательным подтверждающим исследованием положительных результатов);

б. ДНК ВГВ в плазме крови (Метод ПЦР. Предпочтительно использовать методику с увеличенной чувствительностью - 50 МЕ/мл или 10 МЕ/мл. Для этого выделение нуклеиновых кислот проводится из 200 или 1000 мкл плазмы крови).

2) На гепатит С – рекомендуется проводить одновременное исследование на:

а. anti-HCV суммарные в сыворотке крови (Метод ИФА);

б. РНК ВГС в плазме крови (Метод ПЦР. Предпочтительно использовать методику с увеличенной чувствительностью – 50 МЕ/мл или 10 МЕ/мл. Для этого выделение нуклеиновых кислот проводится из 200 или 1000 мкл плазмы крови).

3) На гепатит D (проводится у пациентов с положительными результатами на маркеры гепатита В) - рекомендуется проводить одновременное исследование на:

а. anti-HDV суммарные в сыворотке крови (Метод ИФА);

б. РНК ВГД в плазме крови (Метод ПЦР. Предпочтительно использовать методику с увеличенной чувствительностью – 50 копий/мл или 10 копий/мл. Для этого выделение нуклеиновых кислот проводится из 200 или 1000 мкл плазмы крови).

4) Обследование на ВИЧ-инфекцию:

Проводится в соответствии с установленными требованиями³.

В связи с длительным инкубационным периодом (до 12 месяцев) у лиц с иммунодефицитными состояниями рекомендуется проводить исследование с помощью диагностических тестов, выявляющих антитела к ВИЧ 1,2 и антиген р24, а также определение РНК ВИЧ молекулярно-биологическими методами⁴.

Проведение филогенетического анализа

Секвенирование и филогенетический анализ с целью установления наличия или отсутствия эпидемиологической связи между заболевшими гепатитами В, С, D и предполагаемыми источниками вирусов гепатитов В, С, D проводится в Референс центре по мониторингу за вирусными гепатитами ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (далее - РЦВГ).

Для проведения филогенетического в исследование **необходимо включение группы сравнения.**

Группу сравнения составляют не менее 30 образцов плазмы крови (положительных в исследовании методом ПЦР), полученных от пациентов с

³ Пункты 621-634, 648, 676 главы VI СанПиН 3.3686-21, приложение 13 к СанПиН 3.3686-21

⁴ Пункт 598 главы VI СанПиН 3.3686-21

хроническими гепатитами В, С, D из того же региона страны, что и пациенты исследуемой группы, но эпидемиологически не связанных с ними.

Перед отправкой в РЦВГ необходимо провести в лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» качественное определение РНК/ДНК вирусов гепатитов (в зависимости от вида гепатита, по которому проводится эпидемиологическое расследование). Достаточно использовать методику со стандартной чувствительностью, выделяя РНК/ДНК вирусов гепатитов из 100 мкл плазмы крови.

От каждого пациента группы сравнения с положительным результатом ПЦР в РЦВГ необходимо передать:

- по 2 аликвоты по 1 мл плазмы крови.

Отбор и исследование проб объектов внешней (больничной) среды в медицинских организациях.

Специалистами ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» обеспечивается отбор проб и их транспортирование в РЦВГ. Лабораторное исследование проб проводится в РЦВГ (по предварительному согласованию). Исследования проводятся с использованием ультрачувствительной методики с выделением нуклеиновых кислот из 1000 мкл плазмы крови или транспортной среды.

Смывы с поверхностей:

Для взятия смывов рекомендуется использовать зонд-тампоны, состоящие из пластикового зонда и тампона из вискозы, полиэфирного материала или велюра.

! Не рекомендуется использование зонд-тампонов с ватными тампонами или с деревянными зондами в связи с наличием в них жирных кислот и других ингибирующих веществ, что может привести к получению ложноотрицательных результатов анализа.

Смывы отбираются в стерильные одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом от 5 мл с транспортной средой объемом не менее 3,5 мл. В качестве транспортной среды используется:

- фосфатно-солевой буферный раствор (PBS);
- транспортная среда для вирусов с добавками, подавляющими рост бактерий и грибов),
- среда Игла.

Число и локализацию точек, откуда берутся смывы в каждом помещении, определяет эпидемиолог, осуществляющий эпидемиологическое расследование,

исходя из технологического процесса процедур, проводимых в каждом обследуемом помещении, и исследуемой гипотезы заражения.

Рекомендации по взятию смывов:

1. Перед взятием смывов погрузить рабочую часть зонда-тампона в пробирку с транспортной средой, выдержать до полного пропитывания.
2. Взять смывы с поверхностей медицинского кабинета (помещения) с учетом не менее 100 см² площади поверхности на каждый смыв. Отбор проб с мелких однородных предметов и поверхностей небольшой площади в одном помещении (например, ручки дверей, поверхности выключателей/переключателей и пр.) допускается брать пулом в один смыв. В сумме площадь данных предметов должна быть не менее 100 см².
3. В случае недостаточной влажности тампона в процессе отбора пробы допускается дополнительное смачивание в транспортной среде. В процессе отбора смыва необходимо поворачивать тампон для использования всех его поверхностей.
4. После взятия смыва перенести рабочую часть зонда-тампона в пробирку, интенсивно вращать 5–10 с.
5. Отломить зонд по уровню пробирки.
6. Пробирку плотно закрыть крышкой, оставив тампон внутри пробирки.

Условия хранения и транспортировки материала:

- при температуре 2–8 °С – в течение 24 ч;
 - при температуре от минус 24° до минус 16° С – до 1 месяца;
 - при температуре не выше минус 68 °С – длительно.
- ! Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

Многодозовые ампулы/флаконы с растворами лекарственных препаратов и/или растворами для разведения лекарственных препаратов

1. Отбор ампул/флаконов проводится в случае их использования (подозрения на использование) более чем у одного пациента, для выявления факторов передачи инфекции;
2. Рекомендуется отбирать и направлять для исследования методом ПЦР на ДНК/РНК вирусов, вскрытые на момент отбора ампулы/флаконы, имеющие содержимое.

Плазма крови из внешнего контура гемодиализа для одноразового использования (при исследованиях, проводимых в гемодиализных отделениях):

Отбор плазмы крови из внешнего контура гемодиализа для одноразового использования проводится с помощью стерильных одноразовых шприцев объемом 10 мл:

1. Место прокола, откуда будет производиться забор плазмы, протереть спиртовой салфеткой.
2. Сделать прокол трубки контура в месте, где сосредоточен больший объем плазмы;
3. Аккуратно провести забор плазмы;
4. Перенести плазму в четыре стерильные закрывающиеся пробирки, чтобы получилось четыре аликвоты по 1 мл.

Условия хранения и транспортировки материала

- при температуре 2–8 °С – в течение 5 суток;
 - при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
 - при температуре не выше минус 68 °С – длительно.
- ! Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

Диализат из внутреннего контура гемодиализных аппаратов (при расследованиях, проводимых в гемодиализных отделениях):

Забор образцов диализата из внутреннего контура гемодиализных аппаратов, проводится:

- до дезинфекции;
- после дезинфекции.

Забор образцов диализата проводится из отверстия для отбора проб жидкости (Fluid sample Port), расположенного на передней или боковой (в зависимости от модели) поверхности гемодиализного аппарата.

! Отборщику проб обязательно должен ассистировать помощник.

Порядок отбора проб:

1. Отбор проводится стерильными одноразовыми шприцами объемом 20 мл;
2. Забор проводится после окончания проведения процедуры гемодиализа пациенту, **только у работающего аппарата** иначе процедуру отбора пробы провести технически невозможно.
3. Перед отбором пробирка маркируется, в списке проб указывается номер пробирки, номер аппарата и этап работы аппарата (до дезинфекции/после дезинфекции).
4. Носик шприца без иглы вставить в отверстие для отбора проб жидкости.
5. Быстрым и решительным движением набрать около 10 мл диализата (есть внутреннее сопротивление тока жидкости при заборе).
6. Вытащить шприц из отверстия и перелить 5 мл содержимого в заранее подготовленную и промаркированную пробирку.

Условия хранения и транспортировки материала

- при температуре 2–8 С – в течение 24 ч;

- при температуре от минус 24° до минус 16° С – до 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Взаимодействие с РЦВГ

Если в конкретном эпидемиологическом расследовании не установлен особый порядок взаимодействия с РЦВГ, то необходимо соблюдать следующий порядок:

Первый этап лабораторных исследований

1. Пробы биоматериала от больных и контактных

- Все исследования, включающие определение anti-HCV, HBsAg, anti-HDV методом ИФА и качественное определение ДНК/РНК вирусов гепатитов методом ПЦР проводятся в лабораториях ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» или в лабораториях других учреждений, которые определены для проведения подобных исследований.
- Образцы материала для проведения первого этапа исследований должны быть переданы в лабораторию в максимально короткие сроки после отбора (до 6 часов). Хранение и транспортировка осуществляется при температуре не выше 2–8° С, не допуская замораживания.
- В РЦВГ направляются все образцы, по которым получены положительные результаты в исследованиях методом ПЦР.
- Необходимый объем, передаваемых в РЦВГ образцов, составляет:
 - 2 аликвоты по 1 мл плазмы крови,
 - 2 аликвоты по 1 мл сыворотки крови.
- Кроме образцов в РЦВГ необходимо направлять протоколы всех постановок (независимо от результата). Скриншоты протоколов можно направлять в электронном виде на электронную почту: Hepatitis_outbreak@cmd.su.

2. Исследования смывов и других объектов внешней среды проводятся в РЦВГ (по согласованию)

Второй этап лабораторных исследований

Проводится в РЦВГ:

1. Количественное определение ДНК/РНК вирусов гепатитов.
2. Секвенирование выделенных последовательностей ДНК/РНК вирусов гепатитов;
3. Определение генотипов и субтипов вирусов гепатитов В, С, D.

4. Филогенетический анализ выделенных последовательностей ДНК/РНК вирусов гепатитов с установлением наличия или отсутствия генетической связи между выделенными изолятами вирусов гепатитов;

5. По результатам проведенных молекулярно-генетических исследований специалистами РЦВГ оформляется Экспертное заключение.

6. Экспертное заключение направляется в официальном порядке на имя руководителя управления Роспотребнадзора по субъекту Российской Федерации и в Роспотребнадзор.

Правила отправки материала для исследований в РЦВГ

1. Все образцы должны иметь свой индивидуальный номер в соответствии с направительным бланком.

2. Маркировку на пробирки с биоматериалом наносят с использованием водостойкого фломастера черного или синего цвета таким образом, чтобы исполнитель мог четко идентифицировать пробу с направительным бланком.

3. Для маркировки образцов, переданных в рамках одного эпидемиологического расследования, используют сквозную нумерацию с №1 и так далее, независимо от числа посылок.

4. На направляемые образцы заполняются сопроводительные документы. Файлы можно скачать на сайте РЦВГ: <https://rcvh.ru/>.

5. Посылку с материалом для исследования необходимо направлять в РЦВГ с сопроводительным письмом на имя директора ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. В письме указывается цель передачи образцов.

6. Образцы транспортируют в замороженном виде при температуре не выше -18°C (с сухим льдом, хладагентами). Доставка материалов с соблюдением температурного режима осуществляется курьером или экспресс-почтой.

Образцы доставляются по адресу:

г. Москва, ул. Новогиреевская, д.3а, комната 501, Референс-центр по мониторингу за вирусными гепатитами ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

Непосредственно перед отправкой посылки необходимо согласовать дату и время доставки с РЦВГ. Контактное лицо Референс-центра по мониторингу за вирусными гепатитами - с.н.с. РЦВГ ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора Клушкина Виталина Владимировна, тел.: +7(926)-296-32-93.

Контактное лицо Референс-центра по мониторингу за ВИЧ и ВИЧ-ассоциированными инфекциями - с.н.с. ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора Ладная Наталья Николаевна, тел.: +7(916)-675-45-35.