

WORLD HEALTH ORGANIZATION
REGIONAL OFFICE FOR EUROPE



ORGANISATION MONDIALE DE LA
SANTÉ
BUREAU RÉGIONAL DE L'EUROPE

WELTGESUNDHEITSORGANISATION
REGIONALBÜRO FÜR EUROPA

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ЕВРОПЕЙСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ
БЮРО

Совещание региональных референс лабораторий (РРЛ),

Сеть полиомиелитных лабораторий ЕРБ ВОЗ

Шамони, Франция

24-25 июня 2012 года

РЕЗЮМЕ ОБСУЖДЕНИЙ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Совещание Региональных референс лабораторий (РРЛ) Европейского региона Глобальной сети полиомиелитных лабораторий (ГСПЛ) ВОЗ проходила в Шамони, Франция, с участием представителей 8 лабораторий-членов и сотрудников ВОЗ, ответственных за координацию деятельности сети.

Во время совещания директора лабораторий предоставили обновленную информацию об исследованиях материалов, научных исследованиях и обучении персонала в прошедшем году. Координатор лабораторной сети ознакомил участников с деятельностью сети и работой в Регионе в целом. В общей сложности было обработано 129142 проб, собранных в результате всех мероприятий по эпиднадзору в Европейском регионе в период с января по декабрь 2011 года. Из них 3188 проб были представлены образцами стула, полученными у пациентов с острыми вялыми параличами (ОВП). В течение 2011 года, после вспышки в Таджикистане в предыдущем году, дикие полиовирусы (ДПВ) не выделялись. Основной проблемой в улучшении своевременности выявления ДПВ и вакциннородственных штаммов полиовирусов (ВРПВ) явилась доставка образцов стула и изолятов полиовирусов (ПВ) в национальные лаборатории (НЛ) или РРЛ.

Эффективность работы Сети полиомиелитных лабораторий в Европейском регионе в 2011 году сохранялась на высоком уровне, несмотря на то, что лаборатории в Португалии и Испании подверглись специальной оценке вследствие низких результатов

профессионального тестирования и анализа чувствительности клеток, полученных во время процесса аккредитации в 2010 году. Был освещен потенциал методов ВТД гОТ-ПЦР в РРЛ и планы внедрения процедур стандартизации и обеспечения качества методов секвенирования. Большинство лабораторий успешно используют систему менеджмента лабораторными данными (СМЛД) после начала ее внедрения в прошлом году, хотя некоторые страны до сих пор не используют ее для предоставления отчетности. Были разработаны рекомендации по улучшению обеспечения качества эпиднадзора за энтеровирусами (ЭВ), отчетности по результатам всех видов эпиднадзора, связей между РРЛ и соответствующими НЛ, а также реализации обновленной ВТД гОТ-ПЦР и методов секвенирования.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОБСУЖДЕНИЙ

1. Эпиднадзор за полиовирусами в Европейском регионе

Эффективность деятельности сети полиомиелитных лабораторий в Европейском регионе в 2011 году сохранялась на высоком уровне с выделением 98% полиовирусов (ПВ) и получением 99% результатов ВТД в установленные сроки. Среди показателей, отрицательно влияющих или имеющих потенциальный эффект на своевременность выявления ПВ, отмечались: накопление партий проб стула перед отправкой, качество проб и их упаковка, неполная информация о доставке проб или ее задержка и ужесточение правил в отношении транспортировки/обращения с биологическими материалами в некоторых странах. Одним из возможных решений данных проблем является внедрение мощности ВТД в отдельных НЛ, несмотря на то, что это потребует тщательной оценки с целью подтверждения инвестиций. Использование карточек FTA для транспортировки также может облегчить полное исследование проб в установленные сроки. Подробные протоколы подготовки и обработки карточек FTA (с видео поддержкой) имеются в Региональном Бюро (веб-страница СУЛД <http://ldms.euro.who.int>; при успешной регистрации возможен доступ к видео материалам). Карточки FTA должны храниться и уничтожаться в соответствии с правилами утилизации инфекционных материалов.

Несмотря на отличные показатели работы в Регионе, некоторые вопросы требуют решения в странах, не предоставлявших информации о выделении ПВ или неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) на протяжении нескольких лет. Обсуждались

изменения тенденций финансирования Инициативы по глобальной ликвидации полиомиелита и их возможного влияния на политику общественного здравоохранения в области эпиднадзора за полиовирусами и стратегию иммунизации.

2. Дополнительный эпиднадзор

Европейский регион уделяет первостепенное внимание изоляции и классификации полиовирусов из проб стула, полученных от пациентов с ОВП, при помощи других видов эпиднадзора, как-то: эпиднадзор за окружающей средой (ОС) или энтеровирусом (ЭВ). Лаборатории в данном Регионе имеют обширный опыт в этой области. Эпиднадзор за ОС и ЭВ имеет большое значение, так как эпиднадзор за ОВП не используется повсеместно в Регионе. Все больше стран включают такие мероприятия дополнительного эпиднадзора в свои национальные программы. Поэтому, для пользы Региона была признана необходимость использования общего руководства, усовершенствованной отчетности и программы обеспечения качества для поддержки мероприятий дополнительного эпиднадзора, как и в системе эпиднадзора за ОВП. Данные системы контроля должны помочь в определении показателей качества для оценки эффективности мероприятий дополнительного эпиднадзора и включать информацию по типам клинических синдромов и исследованным пробам, своевременности обработки проб и изоляции вируса и географического расположения места взятия пробы. В идеале, отчеты о таких видах деятельности должны содержать общее число исследованных проб, в том числе пробы с отрицательными результатами.

2.1 Эпиднадзор за энтеровирусом

Согласно полученной отчетности около 40 государств-членов используют эпиднадзор за ЭВ, как единственный механизм выявления полио или в сочетании с осуществлением эпиднадзора за ОВП или ОС. Хорошей новостью стала информация, что только в 3% проб, исследованных в рамках эпиднадзора за ЭВ в 2011 году, не было образцов стула, так как только использование последних позволяет наиболее точно определять наличие инфекции у людей. Однако, данный показатель не является одинаковым для всех стран; в некоторых странах исследуется менее 50% от общего числа проб, полученных в рамках эпиднадзора за ЭВ. Региональное бюро разработало руководство с охватом различных аспектов, имеющих отношение к эпиднадзору за ЭВ, как-то: обоснование эпиднадзора за ЭВ, рекомендованные процедуры транспортировки проб, выявление и классификация ЭВ

(включая лабораторные протоколы), а также документирование и учет результатов. Проект руководства был разработан и ожидается его утверждение.

2.2 Эпиднадзор за окружающей средой для выявления ПВ

Эпиднадзор за окружающей средой для выявления ПВ осуществлялся в некоторых странах Европейского региона на протяжении десятилетий. 20 государств-членов проводят этот вид эпиднадзора. Как правило, "Руководство ВОЗ по эпиднадзору за окружающей средой и циркуляцией ПВ" использовалось при реализации эпиднадзора за окружающей средой. Так же обсуждалась необходимость обновления этого руководства с целью отображения последних методов выявления вирусов. Эпиднадзор за окружающей средой необходимо поддерживать и расширять с целью содействия эпиднадзору за ОВП или замены его там, где он малоэффективен.

3. Серологические исследования

Исследования в области коллективного иммунитета могут предоставить полезную информацию об иммунном статусе населения в некоторых областях/странах. Результаты данных этих исследований помогут в расчетах вероятности циркуляции ДПВ и ВРПВ и определении пробелов иммунитета в определенных географических местоположениях или отдельных возрастных группах. Данные исследования будут иметь большее значение при завершающей фазе ликвидации полиомиелита, оказывая содействие в мониторинге прекращения использования ОПВ и/или других изменений в политике иммунизации против полиомиелита.

4. Выявление вакциннородственных штаммов полиовируса (ВРПВ)

ВРПВ изолировались из различных источников в Европейском регионе, хотя не было выявлено ни одного вируса от случая ОВП. В Турции были изолированы 3 ВРПВ1 (12-14 мутаций) из пробы от здорового ребенка методом случайной выборки в детском саду и 5 штаммов ВРПВ2 (16-18 мутаций) у ребенка с иммунодефицитом. Подобным образом был изолирован штамм 1 ВРПВ2 (14 мутаций) у ребенка с иммунодефицитом в Италии; этот ребенок позднее скончался от респираторной инфекции. 1 ВРПВ2 был изолирован у ребенка с иммунодефицитом из Вифлеема (Палестинская Автономия), который проходил лечение в больнице Израиля. Несколько положительных проб стула было получено от этого ребенка, прежде чем он умер от заболевания, не связанного с вирусом. ПВ1 имел

дивергенцию на 1,2%. 1 изолят ВРПВ2 был получен от хорошо известного на протяжении многих лет носителя с первичным иммунодефицитом в Великобритании. По расчетам, он выделяет ПВ на протяжении 26 лет. В течение семи лет ВРПВ периодически обнаруживался в пробах, полученных из окружающей среды в Европейских странах, как-то: Финляндия, Эстония и Израиль. В течение 2011 года, 18 штаммов ВРПВ2 были выделены из 15 проб сточных вод, полученных в различных точках большой канализационной системы Тель-Авива (Израиль), представляя два отдельных вирусносителя. 17 изолятов ВРПВ2 были выделены из 14 проб из одного эпидемиологического кластера (первый изолят получен в 1998 году). Процент замен на участке VP1 был в пределах 15,9% - 16,3%. 1 изолят ВРПВ2 был получен из 1 образца отдельного эпидемиологического кластера (первый изолят выделен в 2006 году). Отклонение ПВ1 отмечалось на уровне 11,18%. В настоящее время в Израиле проводится исследование с искусственным внесением вакцинного вируса в систему сточных вод; предварительные результаты обнадеживают, они помогут определить границы чувствительности надзора за ОС.

Исследование с участием лабораторий сети института Пастера позволяет оценить распространенность неполиомиелитных вирусов HEV-C в пробах, полученных от человека и из окружающей среды. При помощи данных исследований можно установить связь между неполиомиелитными изолятами HEV-C и штаммами цВРПВ. Это в конечном счете поможет составить описание факторов риска, связанных с вероятным ростом циркуляции сВРПВ в различных группах населения.

Результаты, представленные РРЛ в России, показали высокую долю ложноположительных результатов при проведении ВРПВ гОТ-ПЦР среди изолятов ПВ в 2011 году, в частности, типа ПВ2. Значительная доля ложноположительных ВРПВ привела к росту объема работы и чрезмерному использованию ценных ресурсов. Сотрудники СДС в настоящее время пытаются оптимизировать протоколы с целью усовершенствования данных методик.

5. Программа по обеспечению качества лабораторной деятельности

5.1 Ежегодный процесс аккредитации

Ежегодная проверка качества (ПК) и оценка лабораторий остается важной частью процесса оценки качества деятельности полиомиелитных лабораторий. Список ПК состоит из шести пунктов (i) точность изоляции вируса (два варианта, по старому и новому

алгоритму изоляции вирусов); ВТД посредством (ii) ИФА, (iii) гибридизации проб, (iv) традиционной ПЦР, (v) ПЦР в реальном времени (rOT-ПЦР), и, (vi) rOT-ПЦР для скрининга ВРПВ. Координация программы ПК осуществляется ВОЗ в сотрудничестве с двумя Глобальными специализированными лабораториями (ГСЛ) в Соединенных Штатах и Нидерландах. Проходной балл лабораторий, использовавших метод ИФА ПК в 2010 году, составлял > 90%. Проходной балл лабораторий, применявших метод традиционной ПЦР ПК, составлял > 90%. Проходной балл всех лабораторий, применявших rOT-ПЦР и скрининг ВРПВ составлял > 90%.

Ежегодный процесс аккредитации заканчивается тщательным изучением стандартного контрольного списка аккредитации, который заполняет каждая лаборатория. Данный список охватывает все аспекты работы в лаборатории, включая соблюдение сроков обработки проб и изоляции вируса, классификацию ПВ, информацию о персонале, участвующем в исследованиях, мероприятиях по биологической безопасности, получении результатов ПК, управлении данными и т.д. Контрольный список имеет несколько разделов, каждый из которых оценивается инспектором, затем выводится окончательная оценка, которая выражается в процентном отношении и которая и является показателем статуса аккредитации лаборатории. Аккредитационные визиты в лаборатории, в которых отмечаются сложности в осуществлении деятельности, проводятся по мере необходимости. Все полиомиелитные лаборатории в Европейском регионе за исключением одной (Узбекистан) были полностью аккредитованы ВОЗ к декабрю 2011 г.

5.2 Посещение НЛ в Испании и Португалии

Вследствие получения субоптимальных результатов тестов чувствительности клеток и ПК в 2010 году, два представителя РРЛ посетили НЛ Испании и Португалии с целью проведения комплексных оценок по предложению и при поддержке Регионального Бюро. Оценочные визиты выявили серьезные недостатки в методах лабораторных исследований и обучении персонала. В этих странах были немедленно предложены корректирующие меры для обеспечения эффективного определения ПВ, а также выработаны рекомендации для восстановления соответствующего уровня деятельности обеих НЛ. Кроме того, было предложено использовать некоторые рекомендации другими НЛ, в частности, о необходимости создания крупного банка клеток с целью снижения запросов на клетки в РРЛ. Опыт Испании и Португалии осветил важную роль ПК и оценки чувствительности

клеток в выявлении лабораторий, которые сталкиваются со сложностями в осуществлении своей деятельности. Упор также делался на важность использования СОПов в соответствии с протоколами ВОЗ для рутинного исследования проб посредством изоляции и типирования в культурах клеток, так как эти методы полностью выверены и поддерживаются ВОЗ, кроме того, они проходят тщательную оценку посредством ежегодной ПК. Вполне возможно предотвратить периодическое снижение эффективности деятельности, наблюдаемое в некоторых НЛ, через более тесное сотрудничество РРЛ с ассоциированными НЛ и прямым участием ученых РРЛ в процессе аккредитации НЛ.

Обсуждались рекомендации по улучшению процесса обучения нового персонала, и в частности, новых руководителей лабораторий. Также акцент был сделан на необходимость продолжения использования видеоматериалов ВОЗ по биологической безопасности во время обучения. Лабораториям необходимо напомнить о важности обязательной вакцинации против полиомиелита для всех сотрудников лаборатории.

5.3 Идентификация клеточных линий, используемых в сети

ГСЛ в Великобритании разработала стандартную методику идентификации клеточных линий, используемых для изоляции ПВ в полио сети. В основе методики лежит секвенирование митохондриального фрагмента на 5' конце цитохромной оксидазы С и осуществление гОТ-ПЦР с анализом кривой плавления. Метод очень чувствительный и может выявить наличие 1 человеческой клетки в 10^5 клеток мыши. NIBSC исследовал клетки L20B и RD и все они имели вполне ожидаемое происхождение. Тестирование идентификации клеток будет проводиться во всех лабораториях, распространяющих клетки в лаборатории сети.

6. Лабораторные методы

6.1 гОТ-ВТД ПЦР изолятов ПВ

Результаты ГСЛ СДС показывают, что чувствительность ВТД может значительно повыситься при использовании двухступенчатого метода (Ракета) гОТ-ПЦР, который, по существу, состоит в осуществлении первоначального набора 15 циклов гОТ-ПЦР в более разрешающих условия до стандартных реакций 40 циклов-ВТД гОТ-ПЦР. Данная техника будет иметь особое преимущество в лабораториях с высокими объемами, которые наиболее вероятно сталкиваются со смесями вирусов или с пробами с низкой

концентрацией вирусов. Будет отсутствовать необходимость в выделении РНК, что позволит сохранить время и средства. Не потребуются никаких изменений в существующих наборах ВТД ПВ rOT-ПЦР. Настоятельно рекомендуется использовать “Ракету” ВТД при исследовании образцов, полученных из окружающей среды. Внедрение ВТД Ракета rOT-ПЦР потребует валидации техники для различных платформ ОТ-ПЦР, используемых в полиомиелитных лабораториях.

Несмотря на несколько попыток лабораторий сети, не было достигнуто никакого прогресса в разработке методов прямого определения ПВ из проб стула с использованием исследований на основе ПЦР. Однако, совсем непросто интерпретировать отрицательные результаты и избежать их. Опыты в Израиле показали важность использования бактериофага MS2 для контроля выделения РНК из образцов стула при выявлении ингибиторов ПЦР и сравнения нескольких наборов для выделения РНК, имеющихся в продаже. Результаты четко показали различия между способами выделения и подтвердили, что использование MS2 может помочь в разработке эффективных методов для прямого определения ПВ в образцах стула или других проб, полученных в результате различных видов эпиднадзора.

6.2 Секвенирование изолятов ПВ

Программа аккредитации секвенирующих лабораторий прошла пилотное тестирование в 17 лабораториях ГСПЛ, включая 3 в Европейском регионе. Оценки не выставлялись, несмотря на то, что 15 лабораторий получили секвенсы, идентичные ожидаемым. Каждая лаборатория получила свой отзыв. СДС разработал стандартный протокол секвенирования полиовируса и контрольный список для аккредитации секвенирующих лабораторий. Недавно в СОПы был добавлен раздел по секвенированию гетеротипических смесей (смешение более одного серотипа) с использованием новых праймеров, типичных для циркулирующих в настоящее время типов ДПВ 1 и 3. Необходимо рассмотреть возможность решения о полном принятии СОП СДС по проведению секвенирования, включая применение одного и того же набора праймеров и алгоритмов исследования.

7. Система отчетности СМЛД

Новая система отчетности СМЛД, внедренная в Европейском регионе в прошлом году, была внимательно рассмотрена. СМЛД в онлайн режиме – это веб-сайт на основе

системы управления лабораторными данными, который оказывает поддержку при регистрации проб, их отслеживании, исследовании, обеспечении качества и составлении отчетности, при ответе на вопросы. Он объединяет результаты лабораторного эпиднадзора за ОВП, ЭВ и ОС, а также улучшает эпиднадзор за каждым случаем ОВП путем динамичной связи и обмена лабораторной информацией с базой данных ОВП. Вместе с веб-системой эпиднадзора за ОВП, онлайн СМЛД обеспечила Европейское Региональное Бюро ВОЗ потенциальной платформой для осуществления интегрированного эпиднадзора за полиомиелитом. Связь данных по ОВП и данными образцов стула увеличилась с 10% в 2007 году до 90% в 2011. Предоставление отчетности через СМЛД сводит к минимуму ошибки в отчетах между базами данных эпиднадзора и лабораторий. Кроме того, система позволяет немедленно информировать ЕРБ ВОЗ о ДПВ и отслеживать образцы стула в режиме почти реального времени. Кроме того, лаборатории могут вводить географические данные об образцах ЭВ и из окружающей среды. СМЛД – это комплексная система, которая требует минимум переменных, ее очень просто использовать и обновлять, она доступна круглосуточно, имеет три степени защиты (РРЛ->НЛ->СНЛ) и позволяет провести быструю валидацию данных.

Также обсуждалась разработка дополнительных функций СМЛД. Скоро будет доступна связь данных секвенирования с базой данных типирования ЭВ RIVM. Будут добавлены опции фильтрации образцов, что позволит видеть текущий статус изолятов ПВ и без затруднений получать ожидаемые результаты. Кроме того, использование СМЛД поможет в улучшении полноты и своевременности отчетности по эпиднадзору за ЭВ и окружающей средой. Будет возможно использовать СМЛД для регистрации результатов и данных анализа различных экспериментов и исследований, включая тестирование обеспечения качества, которое помогает предупреждать РРЛ о наличии возможных проблем в соответствующих НЛ.

Кроме того, были отмечены трудности в получении информации из лабораторий, которые не используют СМЛД для предоставления отчетности или не входят в сеть. Необходимо предпринять попытки для получения хотя бы ежегодных суммарных данных из этих лабораторий. РРЛ, связанные с такими лабораториями, должны вводить эти результаты в СМЛД. Отчеты должны содержать число положительных образцов, общее число образцов с административным делением, по возможности. Была отмечена важность предоставления отчетности через СМЛД каждую неделю, независимо от фактического проведения мероприятия по исследованию.

РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. Руководители РРЛ должны предпринять усилия, чтобы укрепить связи с ассоциированными НЛ для обеспечения быстрой доставки изолятов, раннего выявления и устранения проблем. Для достижения этого:
 - a. Необходимо улучшить коммуникацию между РРЛ с ассоциированными НЛ с целью обеспечения своевременной информации и отслеживания доставки образцов, а также обеспечения эффективной доставки и получения изолятов ПВ для ВТД.
 - b. Директора РРЛ должны принимать непосредственное участие в процессе аккредитации НЛ. С этой целью Региональное Бюро должно предоставить контрольный список в РРЛ.
 - c. Директора РРЛ могут предложить необходимость аккредитационных визитов НЛ при наличии веских причин после проверки деятельности НЛ.
2. Предоставление результатов исследования за ОВП лабораториями Сети полиомиелитных лабораторий ЕРБ ВОЗ с использованием СМЛД обязательно.
 - a. Лаборатории, которые до сих пор не предоставляют отчетность через данную систему, должны начать это делать в скорейшие сроки.
 - b. Региональное Бюро может оказать поддержку при возникновении проблем в реализации.
 - c. Отчеты через СМЛД должны отправляться еженедельно. При отсутствии мероприятий по исследованию, простого входа и выхода из системы достаточно для получения нулевого отчета.
3. Существует необходимость определения показателей качества и улучшения процедуры стандартизации для мероприятий дополнительного эпиднадзора, осуществляемых в Европейском регионе, так как это единственный способ выявления ПВ во многих странах. Для достижения этого:
 - a. Необходимо утвердить и распространить «Руководство по осуществлению эпиднадзора за ЭВ», разработанное Региональным Бюро.
 - b. Настоятельно рекомендуется провести критический пересмотр качества мероприятий дополнительного эпиднадзора, в частности за ЭВ, участвующими лабораториями в государствах-членах.

- c. Необходимо оказать поддержку в подготовке отчетов о результатах всех видов эпиднадзора через СМЛД, новые функции необходимо включить в систему СМЛД для помощи в улучшении полноты и своевременности эпиднадзора за ЭВ и окружающей средой.
 - d. Директора РРЛ должны выявить пути оказания поддержки данным мероприятиям, независимо от того, принимают ли они непосредственное участие в лабораторных исследованиях или нет.
4. Лаборатории с потенциалом проведения ВТД гОТ-ПЦР и методов нуклеотидного секвенирования должны участвовать в пилотном тестировании и проверке качества, организованных ВОЗ и СДС для вклада в улучшение, стандартизацию и обеспечение качества данных методов.
- a. Новые методы ВТД Ракета гОТ-ПЦР должны пройти пилотные испытания в лабораториях с потенциалом проведения гОТ-ПЦР ВТД, следуя указаниям СДС.
 - b. Лаборатории, проводящие секвенирование, должны завершить ПК для секвенирования на 2012 год, следуя указаниям СДС.
 - c. Координатор Европейской сети лабораторий должен предоставить протоколы методов секвенирования лабораториям, осуществляющим секвенирование, с целью гармонизировать процедуры и реактивы.
5. Ежегодная оценка качества мероприятий, проводимых во всех полиомиелитных лабораториях региона, должна и дальше иметь высокий приоритет.
- a. Лаборатории должны пересматривать свои методы обучения с целью обеспечения наличия СОПов с описанием источников и валидации различных лабораторных техник.
 - b. Введение обучения для новых руководителей НЛ должно планироваться с участием соответствующей РРЛ.
 - c. Лаборатории должны учредить крупные банки клеток с целью свести к минимуму запросы на поставку клеток из РРЛ. Региональное Бюро должно разработать для всего региона форму заказа клеток, которая бы включала обоснование для такого заказа.
 - d. ГСЛ в Великобритании должна проверить наличие базовых клеток RD и L20В в лабораториях, распространяющих клетки в НЛ.

е. 2-3 представителя РРЛ и ГСЛ должны оказать содействие в процессе аккредитации НЛ путем тщательной оценки контрольного списка аккредитации.