

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Главный государственный
санитарный врач

Республики Беларусь



А.А. Тарасенко

06 2022 г.

Регистрационный № 025-1221

**АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ СЕРОЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОПУЛЯЦИОННОГО
ИММУНИТЕТА К КОРИ И КРАСНУХЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

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

АВТОРЫ:

доктор мед. наук, профессор Е.О. Самойлович, доктор мед. наук М.А.
Ермолович, канд. биол. наук Г.В. Семейко

Минск, 2022

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь
_____ А.А. Тарасенко
10.06.2022
Регистрационный № 025-1221

**АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ СЕРОЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОПУЛЯЦИОННОГО
ИММУНИТЕТА К КОРИ И КРАСНУХЕ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

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

АВТОРЫ:

доктор мед. наук, профессор Е.О. Самойлович, доктор мед. наук М.А.
Ермолович, канд. биол. наук Г.В. Семейко

Минск, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен алгоритм проведения сероэпидемиологических исследований для оценки популяционного иммунитета к кори и краснухе.

Инструкция предназначена для врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-инфекционистов, иных врачей – специалистов, осуществляющих лабораторную диагностику и слежение за корью и краснухой.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Сероэпидемиологические исследования являются эффективным методом оценки динамики показателей восприимчивости населения к инфекциям и предоставляют максимально достоверную информацию для определения панорамы иммунитета популяции.

Основные понятия, которые используются в сероэпидемиологических исследованиях:

- серологический скрининг – сбор и тестирование образцов из определенной популяции в течение конкретного периода времени для обнаружения антител против данного этиологического агента в качестве показателя иммунитета населения;

- серопозитивность – серологическое свидетельство наличия антител определенного типа в сыворотке (или плазме) крови;

- серопревалентность – доля людей в популяции с положительным результатом теста на наличие антител против конкретного заболевания или возбудителя; ее часто выражают как долю (процент) положительных результатов от общего количества протестированных образцов.

- популяционный иммунитет – приобретенное состояние специфической защищенности населения, слагающееся из иммунитета индивидуумов, входящих в данную популяцию.

- пороговый (критический) уровень популяционного иммунитета — минимальная доля лиц (переболевших и вакцинированных) с защитным уровнем антител и выше, достаточная для сдерживания распространения инфекции при ее заносе (или поддержания эпидемического благополучия на территории, или прекращения эндемичной циркуляции возбудителя).

Динамическое слежение за состоянием иммунитета населения к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (в том числе к кори и краснухе), позволяет своевременно установить признаки эпидемиологического неблагополучия, свидетельствующего о начавшейся активизации эпидемического процесса. Прогноз дальнейшего развития ситуации по каждой из наблюдаемых инфекций считается неудовлетворительным, если выявляется тенденция к увеличению доли серонегативных лиц и превышению их допустимого уровня в популяции.

1 Показания и противопоказания к применению

Показания к применению:

Выявление уровня и напряженности индивидуального и коллективного иммунитета к кори; выявление уровня и напряженности индивидуального и коллективного иммунитета к краснухе; определение соответствия коллективного иммунитета к кори и краснухе пороговому уровню, достаточному для поддержания элиминации этих инфекций на территории Республики Беларусь.

Противопоказания к применению:

противопоказаний не имеет.

2 Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов, расходных материалов

Перечень оборудования, материалов и реагентов для лабораторного исследования IgG антител к кори и краснухе изложен в инструкции по

применению «Методы изучения популяционного иммунитета к вакциноуправляемым инфекциям (полиомиелиту, кори, эпидемическому паротиту, краснухе, коклюшу)» (регистрационный номер Министерства здравоохранения 003-0612).

3 Алгоритм проведения сероэпидемиологических исследований для оценки популяционного иммунитета к кори и краснухе

Основными этапами проведения сероэпидемиологических исследований для оценки популяционного иммунитета являются следующие (рисунок):

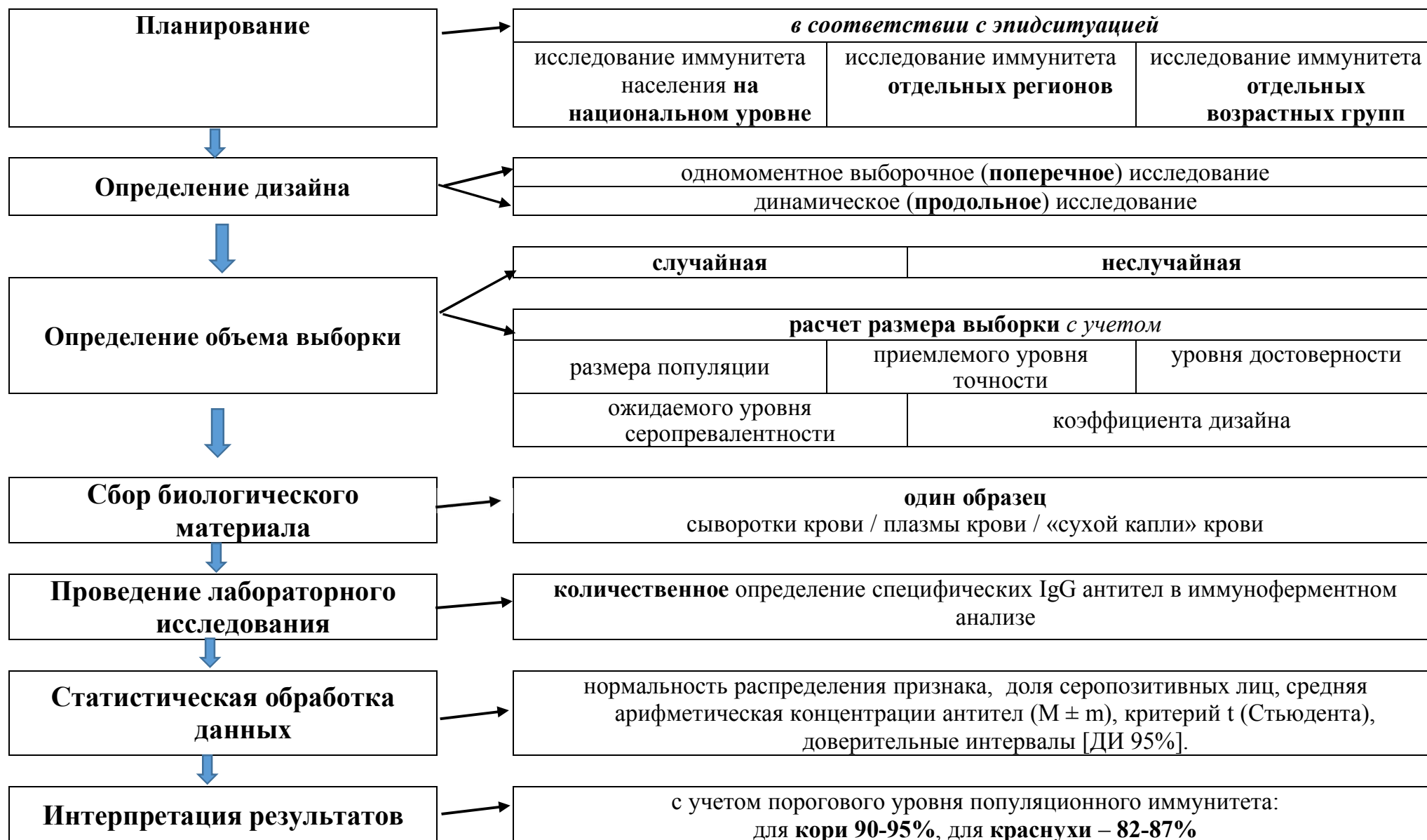
- планирование исследования,
- определение дизайна исследования,
- определение объема выборки,
- сбор, транспортировка, хранение биологического материала,
- проведение лабораторного исследования,
- статистическая обработка данных,
- интерпретация полученных результатов исследования.

3.1 Планирование сероэпидемиологического исследования

Определение целей и задач исследования начиная с ранних стадий его планирования должно быть совместным усилием эпидемиологов и специалистов, проводящих лабораторную диагностику. На этапе планирования исследования необходимо разработать письменный протокол его проведения и ознакомить с ним всех участников.

Конкретные цели проведения сероэпидемиологического исследования зависят от эпидемической ситуации по данной инфекции. В зависимости от поставленной цели исследование может быть направлено как на изучение иммунитета населения в целом, так и населения определенных регионов, возрастных и социальных групп. При определении

Рисунок. – Алгоритм проведения сероэпидемиологического исследования для оценки популяционного иммунитета к кори и краснухе



регионов особое внимание уделяется территориям с низким охватом иммунизацией, а также территориям, где имели место вспышки данной инфекции. Обследуемые возрастные группы населения целесообразно стратифицировать в соответствии с национальной историей иммунизации (т.е. не привитые по возрасту лица, лица, привитые 1 дозой вакцины, лица, привитые с использованием двух доз вакцин и т.д.). Если применялись вакцины различного штаммового состава, это также следует учитывать при формировании групп обследуемых лиц. Для того, чтобы получить информацию по распространенности антител к кори и краснухе в национальном масштабе, в исследование целесообразно включить все регионы страны.

3.2 Определение дизайна исследования

Поскольку перенесенная коревая и краснушная инфекция приводят к пожизненному иммунитету, а вакцинация против кори и краснухи также стимулирует развитие длительного, порой пожизненного, иммунитета наиболее целесообразным при изучении популяционного иммунитета к этим инфекциям с точки зрения информативности, экономической целесообразности и временных затрат является ***выборочное одномоментное (поперечное) исследование***. Цель выборочных исследований – получить репрезентативную информацию, которую можно было бы экстраполировать на всю генеральную совокупность. Одномоментным исследованием предусмотрено выявление всех случаев, обладающих искомым признаком (в данном случае – Ig G антителами к вирусу кори/вирусу краснухи) на момент исследования, его также называют исследованием на распространенность. При необходимости такие исследования могут повторяться.

В случае необходимости систематического изучения иммунитета к кори/краснухе одной и той же группы населения (например, в случае

необходимости контроля проведенных мероприятий по дополнительной иммунизации) целесообразно проведение *динамического (продольного) исследования*. Такие исследования проводятся через определенный промежуток времени. Можно применить метод поперечных срезов или когортное исследование. При исследовании методом поперечных срезов на каждом этапе допускается включение новых участников. При когортном исследовании предполагается отбор проб у одних и тех же испытуемых. Результаты продольных исследований могут предоставить информацию не только о распространенности антител, но и о динамике изменения их концентрации во времени. Одномоментное поперечное исследование может стать первым этапом для проведения продольного исследования.

3.3 Определение объема выборки

Корректность полученных результатов выборочных исследований напрямую зависит от репрезентативности выборки. Условия, обеспечивающие репрезентативность выборки, – это объем (т.е. необходимая численность) и соблюдение принципа рандомизации. Выборочная совокупность должна быть качественно и количественно репрезентативной.

Выборка может быть случайной, либо неслучайной. Золотым стандартом исследований является случайная выборка, поскольку ее результаты при достаточном числе наблюдений будут репрезентативными. Оценка серологической распространенности антител для всей генеральной совокупности производится путем взвешивания результатов выборки в соответствии с вероятностью выбора.

В одномоментных исследованиях чаще всего используются следующие выборки: простая случайная, стратифицированная случайная, систематическая.

Из неслучайных выборок наиболее часто используется удобная (convenience) выборка. Выборка проводится из части населения (например, лица, посещающие поликлиники в определенный день недели, доноры крови, беременные женщины), либо из оставшегося биологического материала от ранее проведенных исследований, что более легко и удобно. Хотя такая выборка и не является предпочтительной, она иногда является единственным доступным вариантом для сероэпидемиологического исследования. Несмотря на то, что неслучайная выборка значительно менее затратна, экстраполяция результатов такой выборки на генеральную совокупность может представлять трудности. Следует предпринять усилия по уменьшению потенциальных ограничений, накладываемых неслучайной выборкой, насколько это возможно. Сбор подробной информации об участниках, в частности информации, связанной с потенциальным источником систематической ошибки, поможет лучше описать выборку и оценить, насколько точно она соответствует генеральной совокупности. Еще один потенциальный подход, направленный на уменьшение потенциальных ограничений неслучайной выборки – диверсификация источников образцов. Если результаты из разных источников согласуются друг с другом, может быть более высокая степень уверенности в том, что эти образцы, хотя и не основаны на случайной выборке, истинно отражают распространенность антител в интересующей популяции. Эти подходы полностью не устраняют ограничений неслучайной выборки, но помогают лучше оценить ее репрезентативность и обобщаемость результатов.

3.3.1 Расчет размера выборки

Параметры, которые необходимо учитывать при определении размера выборки, представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Параметры, которые необходимо учитывать при определении размера выборки

№	Параметры	Их значение
1	Размер популяции	При постоянных других параметрах требуемый размер выборки увеличивается с увеличением генеральной совокупности. Однако размер выборки меняется очень мало после того, как численность населения превысит 10 000 и достигает плато для населения более 1 миллиона человек.
2	Приемлемый уровень точности (допустимая ошибка)	Уровень точности 5%–7% обычно считается минимально допустимым при серологических исследованиях. Более высокая достоверность соответствует более низкой точности и наоборот. Чем ниже допустимая точность, тем больший размер выборки необходим для ее достижения.
3	Уровень достоверности	Этот показатель отражает вероятность достижения желаемой точности. Приемлемым уровнем достоверности обычно является 95% (90% или 99% могут также использоваться в некоторых случаях). Необходимость более высокого уровня достоверности приводит к увеличению требуемого размера выборки.
4	Ожидаемый уровень серопревалентности	Это ожидаемая частота (процент) серопозитивных в исследуемой популяции. Ожидаемый уровень 50% требует наибольшего размера выборки. Следовательно, если ожидаемая серопревалентность неизвестна, для расчета размера выборки следует использовать значение 50%. Это обеспечит достаточный размер выборки для любых уровней серопревалентности в популяции.
5	Коэффициент дизайна	Если в некластерной выборке коэффициент дизайна равен 1, то при кластерной выборке его значения меняются в зависимости от плана обследования, изучаемых групп населения и т.д. Размер выборки увеличивается соответственно (умножается на величину коэффициента дизайна, как правило он составляет от 1 до 2). Следовательно, более высокий коэффициент дизайна требует большего размера выборки.

Расчеты размера выборки могут быть выполнены с использованием статистических формул или, что более удобно, с помощью инструментов, доступных в Интернете или в стандартных статистических пакетах. В таблице 2 приведены примеры вариаций требуемого размера выборки в зависимости от приемлемой точности и ожидаемой серопревалентности.

Таблица 2. – Примеры минимальных требуемых размеров выборки с учетом приемлемой точности и ожидаемой серопревалентности (численность населения 100 000 человек; уровень достоверности 95%; коэффициент дизайна 1.0)

Допустимая ошибка, %	Ожидаемая серопревалентность (%)					
	50	70	80	90	95	99
+3	1056	889	679	383	203	43
+5	383	322	246	139	73	16
+7	196	165	126	71	38	8

Источник: Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health [website]; 2013 (<http://www.openepi.com/>)

Число, полученное в результате этих расчетов, является минимальным требуемым размером выборки для данной единицы анализа (например, возрастной когорты). Важно учитывать, что эта статистическая мощность не обязательно является достаточной для анализа подгрупп, особенно если серологическая распространенность близка к 50%, когда требуемый размер выборки самый большой. Следовательно, если планируется подгрупповой анализ, выборку следует проводить для отдельных подгрупп, а общий размер выборки должен быть суммарным (включать все подгруппы). Например, если исследование предполагает определение серопревалентности к кори среди детей в возрасте от 1 до 19 лет и одновременно предполагается оценить серопревалентность в

отдельных возрастных группах (например, 1–4, 5–9, 10–14 и 15–19 лет), размер выборки следует рассчитывать для каждой возрастной группы отдельно. Это приводит к значительному увеличению общего размера выборки и должно быть приведено в соответствие с техническими и финансовыми возможностями.

В качестве примера расчета размера выборки с использованием статистических формул приведен расчет для поперечного (одномоментного) популяционного исследования, стратифицированного по возрасту, в Республике Беларусь. Для исследования определены 8 возрастных когорт: 1-9, 10-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59, 60-69, 70 лет и старше.

Размер выборки рассчитан по формуле

$$\text{Sample size} = \frac{\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2}}{1 + \left(\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2 N} \right)}$$

где N – размер популяции (возрастной когорты),

z – уровень достоверности (для 95% ДИ 1,96)

p – ожидаемый уровень серопревалентности. Если ожидаемый уровень серопревалентности не известен, он принимается за 50% (т.е. p = 0.5), что требует наибольшего размера выборки

e - допустимая ошибка (5%).

Население Республики Беларусь составляет около 9,4 млн. На январь 2021 г. каждая из возрастных когорт, выбранных для исследования, включала от 946,139 to 1,525,685 человек. В соответствии с выполненными расчетами минимальное репрезентативное число обследованных лиц из каждой возрастной группы должно быть не менее 385. Следовательно, в целом для Республики Беларусь размер стратифицированной по возрастам выборки при коэффициенте дизайна 1 должен быть не менее 3080 человек при непропорциональном методе выбора.

Пропорциональный выбор является более предпочтительным. При данном методе отбора размер каждой страты в выборке получается пропорционально размеру всей страты в генеральной совокупности. Это называется пропорциональным размещением, т.е. доля отбора одинакова для каждой страты.

Численность каждой когорты в выборке можно рассчитать, определив необходимую долю для отбора из каждой когорты, затем умножив на нее численность когорты в генеральной совокупности (таблица 3). Как видно из таблицы 3, наименьшая численность когорты 10-19 лет. Если из нее отобрать 385 человек, то это составит 0,04%. Такую же долю нужно отобрать из каждой когорты. Аналогичный результат можно получить исходя из процентной доли возрастных когорт среди всего населения (таблица 3).

Таблица 3. – Пример расчета размера пропорциональной стратифицированной выборки

Возрастные когорты, лет	Численность возрастной когорты в популяции	Доля возрастной когорты в популяции	Минимальная численность возрастной когорты в выборке	Возможная численность возрастной когорты в выборочном исследовании (пример)	Доля возрастной когорты в выборке
1-9	1031176	11	424	445	11
10-19	937433	10	385	405	10
20-29	1124919	12	462	486	12
30-39	1499893	16	616	648	16
40-49	1312406	14	539	567	14
50-59	1312406	14	539	567	14
60-69	1218663	13	501	527	13
70 и старше	937433	10	385	405	10
Всего (1 – 70 лет и старше)	9 374 329	100	3851	4050	100

3.4 Сбор, транспортировка, хранение биологического материала

Для серологического исследования на корь и краснуху обычно используется количественное определение антител в одном образце сыворотки или плазмы крови. Возможно использование альтернативных образцов, в частности «сухой капли крови». Несмотря на то, что риски от образцов, полученных от практически здоровых людей, считаются низкими, должны быть предприняты соответствующие меры предосторожности в области биобезопасности и процедуры управления биологическими рисками в местах отбора проб и лабораториях, где проводится их обработка, тестирование и, при необходимости, хранение. Вся работа по сбору, доставке и хранению образцов выполняется в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденными Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 06.01.2017 г. № 2.

3.5 Проведение лабораторного исследования

Для выявления антител IgG к кори и краснухе могут быть использованы различные методы исследования (метод редукции бляшкообразования, метод флюоресцирующих антител и др.), однако для целей популяционных исследований наиболее подходящим является иммуноферментный анализ. Исследования на наличие антител класса IgG к кори и краснухе в иммуноферментном анализе и интерпретация результатов индивидуальных исследований проводятся в соответствии с инструкцией по применению «Методы изучения популяционного иммунитета к вакциноуправляемым инфекциям (полиомиелиту, кори, эпидемическому

паратиту, краснухе, коклюшу)» (регистрационный номер Министерства здравоохранения 003-0612).

3.6 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных и анализ результатов исследования проводятся с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft®, США), Statistica для Windows ((StatSoft®, США). Нормальность распределения признака в выборке определяется с помощью теста Шапиро–Уилка. Используются параметрические методы описательной статистики для расчета количественных признаков: доля серопозитивных лиц, средняя арифметическая концентрации антител ($M \pm m$), критерий t (Стьюдента). Доверительные интервалы определяются методом Клоппера–Пирсона [ДИ 95%]. Результаты признаются статистически значимыми, если значение ошибки 1-го рода (p) меньше 0,05, а мощность критерия (M_k) превышает 80%

3.7. Интерпретация результатов популяционных исследований серопревалентности к кори и краснухе

Согласно расчетным данным пороговым (критическим) уровнем популяционного иммунитета при кори является 90-95% серопозитивных, при краснухе – 82-87% серопозитивных.

Если полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что уровень популяционного иммунитета ниже критического, необходимо предусматривать проведение дополнительных мероприятий по иммунизации.

5. ВОЗМОЖНЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ СЕРОЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

Ограничения	Усилия по их устранению
Сероэпидемиологические исследования являются весьма трудоемкими и затратными	Если имеются надежные данные, позволяющие провести непрямую оценку состояния иммунитета населения (данные по охвату вакцинацией, единичным случаям и вспышкам и т.д.) возможно проведение косвенной оценки состояния популяционного иммунитета
Вероятность смещений (ошибок), если выборка не является репрезентативной (систематическая ошибка отбора, систематическая ошибка истощения из-за отсева участников, предвзятость волонтеров и др.)	Грамотное планирование и расчет размера выборки с учетом возможных систематических ошибок
Высокая стоимость проведения сероэпидемиологических исследований, связанная со сбором и транспортировкой биологических образцов	Если доступны ранее собранные образцы или если проспективный отбор образцов может быть проведен в сочетании с другими исследованиями, стоимость сероэпидемиологического исследования может быть снижена
Зависимость полученных результатов от использованных тест-систем	Следует использовать тест-системы с подтвержденной высокой чувствительностью и специфичностью
Невозможность на основании результатов серологических исследований идентифицировать различия между поствакцинальными и постинфекционными IgG	Сбор детальной информации об анамнезе и вакцинальном статусе обследуемого перед проведением серологического исследования