

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения,
Главный государственный санитарный врач

_____ М.И.Римжа

28 декабря 2005 г.

Регистрационный № 123-1005

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии

Авторы: Т.В. Амвросьева, О.Н. Казинец, З.Ф. Богуш, Н.В. Поклонская,
К.Л. Дедюля, А.А. Безручко

Инструкция предназначена для специалистов НИИ, лабораторий санитарно-эпидемиологической службы и других учреждений, обеспечивающих государственный и ведомственный производственный контроль качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям.

1. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Автоклав.
2. Автоматические микропипетки со стерильными наконечниками.
3. Анализатор иммуноферментный (АИФ-340 или «Мультискан»).
4. Антибиотики: гентамицин, амфотерецин В.
6. Весы технические аптечные.
7. Весы торсионные.
8. Вода деионизированная (или дистиллированная вода, стерилизованная автоклавированием при $121\text{ }^{\circ}\text{C} + 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин) по ГОСТ 6709-82.
9. Глицин (ГОСТ 4209-67).
10. Гомогенизатор механический.
11. Инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, совок для взвешивания.
12. Иономер (рН-121).
13. Калий фосфорнокислый однозамещенный, х.ч. по ГОСТ 4198-75.
14. Кислота соляная, х.ч. по ГОСТ 3118-77.
15. Магний хлористый, х.ч. по ГОСТ 4209-67.
16. Микроскоп инвертированный.
17. Набор для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов (ТУ РБ 100558032.119-2005) производства ГУ НИИЭМ (г. Минск).
18. Натрия гидроксид, ч.д.а по ГОСТ 4328-77.
19. Натрий лимоннокислый 3-х замещенный по ГОСТ 22280-76.

20. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, х.ч. по ГОСТ 4172-76.
21. Натрий хлористый (NaCl, х.ч.).
22. Первичнотрипсинизированные линии клеток ПЭЧ, ФЭЧ.
23. Перевиваемые линии клеток RD (клетки рабдомиосаркомы человека), BGM (клетки почки африканской зеленой мартышки), Нер-2 (клетки карциномы гортани человека) производства ГУ НИИЭМ, г. Минск.
24. Перекись водорода, х.ч по ГОСТ 10929-78.
25. Пипетки стеклянные градуированные на 1, 5, 10 мл по ГОСТ 29227-91.
26. Полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000-8000) (Sigma).
27. Посуда лабораторная (чашки Петри, колбы, пробирки) по ГОСТ 1770-74.
28. Среды для культур клеток: MEM, DMEM (Sigma).
29. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.
30. Стерильные стеклянные флаконы для культуры клеток (емкостью 25, 50 мл).
31. Сыворотки диагностические энтеровирусные сухие (для реакции нейтрализации, группоспецифические и типоспецифические) по ФС-42-3875-99.
32. Сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота.
33. Термостат, регулируемый до 37°C+1°C.
34. Тест-набор конфирматорный для подтверждения специфичности выявления антигенов энтеровирусов иммуноферментным методом (ТУ РБ 100558032-093.2004 производства ГУ НИИЭМ, г. Минск).
35. Тест-система иммуноферментная для определения антигенов энтеровирусов (ТУ РБ 100558032.092-2004 производства ГУ НИИЭМ, г. Минск).
36. Холодильник-морозильник (от -20 °C до + 4 °C).
37. Центрифуга рефрижераторная на 1000-5000 об/мин.

38. Центрифуга высокоскоростная (не менее 10000 об/мин с охлаждением).

39. Хлороформ (х ч) ТУ 2631-02-11291058-96.

40. Этиловый спирт, ректифицированный по ГОСТ 5962-67.

Необходимые материалы и оборудование для осуществления ПЦР-исследований изложены в пп. 4.2.6.1, 4.2.6.2, 4.2.6.6, 4.2.7.1, 4.2.7.2

2 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований являются следующие виды пищи:

- питьевая вода, расфасованная в емкости (расфасованная вода);
- напитки, соки;
- жидкие молочные продукты;
- полутвердые пищевые продукты (молочные, мясные, рыбные, хлебные изделия и др.);
- твердые пищевые продукты (крупы, сыры, мясо и др.);
- овощи, фрукты, зелень.

3. ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

В качестве санитарно-показательных агентов при осуществлении исследований пищевых продуктов по вирусологическим показателям используются энтеровирусы. Санитарно-вирусологический контроль качества пищевых продуктов предусматривает следующие исследования:

- обнаружение антигена (АГ) энтеровирусов;
- обнаружение энтеровирусной РНК;
- выявление инфекционных энтеровирусов.

Рутинно контролируемые показатели являются антиген энтеровирусов и/или РНК энтеровирусов. При обнаружении в исследуемой пробе антигена и/или РНК энтеровирусов проводятся исследования по выявлению инфекционных энтеровирусов путем выделения вирусных агентов в

культурах чувствительных клеток или методом ИКК-ПЦР (интегрированной с культурой клеток полимеразной цепной реакцией).

По эпидпоказаниям исследование пищевых продуктов может проводиться на наличие других кишечных вирусов: гепатита А, рота-, Нороволк-вирусов и др. (выявление вирусспецифических АГ и РНК методами ИФА и ПЦР соответственно).

4. ПОРЯДОК И МЕТОДЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Контроль качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям осуществляется в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологического законодательства, а также по эпидпоказаниям и по специально разработанным программам исследований. Места и кратность отбора проб по эпидпоказаниям определяются эпидемиологом, а при необходимости совместно со специалистами по пищевой гигиене и санитарной вирусологии.

4.1. Оценка эпидемической безопасности пищевых продуктов

Оценка эпидемической безопасности пищевых продуктов осуществляется исходя из показателей и их нормативов, приведенных в таблице 2.

Таблица 2

Показатели	Нормативы
АГ энтеровирусов	Отсутствие в исследуемом количестве (объем, вес) *
РНК энтеровирусов	Отсутствие в исследуемом количестве (объем, вес) *
Энтеровирусы инфекционной форме	в Отсутствии в исследуемом количестве (объем, вес) *

*для расфасованных вод – 3-5 л (в зависимости от объема упаковки);

для жидких пищевых продуктов – 400 мл;

для полутвердых, твердых пищевых продуктов – 50 г.

Исследуемый пищевой продукт признается эпидемически безопасным в отношении вирусных инфекций человека при отсутствии в исследуемом объеме инфекционных энтеровирусов (по результатам выделения в культурах клеток или обнаружения методом ИКК-ПЦР) или других выявленных по эпидпоказаниям патогенных для человека вирусных агентов (вируса гепатита А, рота-, Норволк-вирусов и др.).

4.2. Методы санитарно-вирусологического контроля пищевых продуктов

При исследовании пищевых продуктов используется комплекс вирусологических, серологических и молекулярно-биологических методов.

4.2.1. Общая схема исследования пищевых продуктов

Этапы и общий порядок осуществления исследований пищевых продуктов представлены на рис. 1.

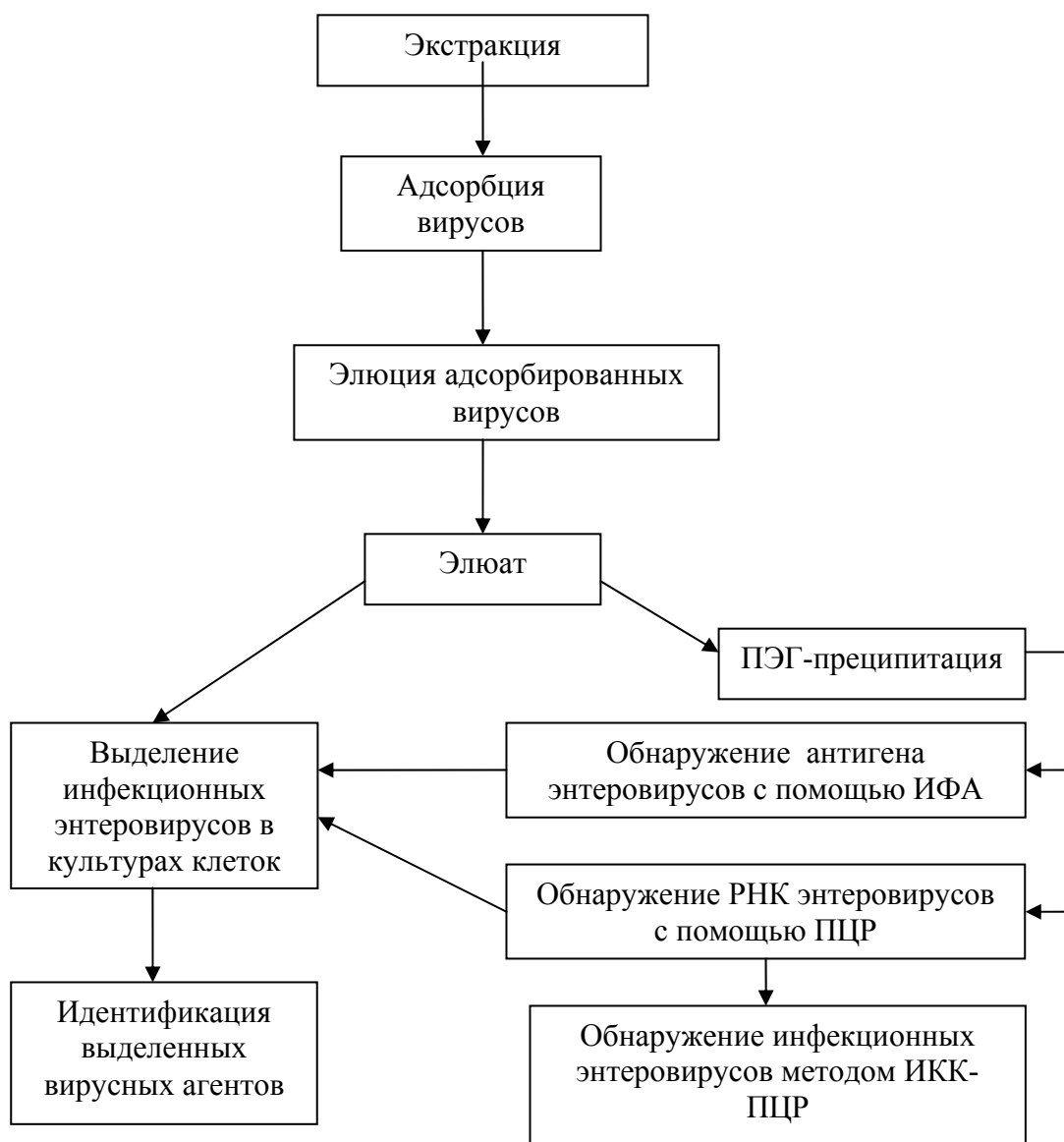


Рис.1 Общая схема исследования пищевых продуктов

4.2.2. Отбор проб

Отбор проб осуществляют в халате и резиновых перчатках. Жидкие и полутвердые пищевые продукты, в зависимости от регламентируемого объема исследований, отбирают расфасованными в стандартных упаковках. Твердые пищевые продукты отбирают в количестве 50 г, овощи, фрукты, зелень – по 1-2 образца в стерильную емкость. После окончания работы перчатки обрабатывают спиртом, а халаты стерилизуют. Пробы маркируют, указывая населенный пункт, точку отбора, дату (число, месяц, год), должность и Ф.И.О.

производившего отбор. Материал доставляют в лабораторию в максимально короткий срок (не более 6 часов). Каждую пробу регистрируют в рабочем журнале. Доставленный материал желательно немедленно обработать. В порядке исключения допускается его хранение при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 12 часов или при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 1 недели.

4.2.3. Обработка проб и концентрирование вирусов

4.2.3.1 Приготовление растворов

- 0,1 М глициновый буфер готовят, растворяя 7,5 г глицина в 100 мл дистиллированной воды, после чего доводят 0,01 М раствором NaOH pH буферного раствора до 8,8;

- 0,5 М фосфатный буфер готовят следующим образом: 108 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 1 л дистиллированной воды (раствор А), 68,06г KH_2PO_4 растворяют в 1 л дистиллированной воды (раствор Б), после чего смешивают 96,9 мл раствора А и 3,1 мл раствора Б, затем доводят pH полученного буфера до 8,2.

4.2.3.2. Экстракция вирусов из пищевых продуктов разной консистенции (получение экстрактов)

Расфасованные воды, напитки и соки не требуют выполнения этапа экстракции и их исследуют в соответствии с п.п. 4.2.3.3.

4.2.3.2.1. Обработка жидких молочных продуктов (молока, молочнокислых продуктов)

Обработка производится одним из двух способов, в зависимости от имеющихся в наличии реактивов.

Способ 1. Преципитация ПЭГ 6000-8000 и применение метода адсорбции-элюции

Для обработки используют 2 пробы образца молочного продукта. В каждую пробу молока или кефира объемом 200 мл добавляют сухой ПЭГ и сухой NaCl в количестве 10 г и 3,6 г, соответственно. Растворяют ингредиенты,

слегка взбалтывая флакон вручную до полного растворения, затем выдерживают в течение 18 часов в холодильнике при +4 °С. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 3000 об/мин в течение 1 часа. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 50 мл глицинового буфера (рН 7,2). Объединяют полученные объемы от двух параллельных проб, получая 100 мл экстракта. Дальнейшее концентрирование вирусов проводят согласно стадии 4.2.3.3.

Способ 2. Применение цитрата натрия, ПЭГ-преципитации и метода адсорбции-элюции

Для обработки используют 2 пробы образца молочного продукта. В 200 мл молока вносят 6 г цитрата натрия для подкисления пробы и усиления свертывания белков молока. Если молоко сворачивается недостаточно, добавляют несколько капель 1 н НСІ до рН 5,0. Затем добавляют 100 мл хлороформа, встряхивают 5 минут на шуттель-аппарате и центрифугируют при 2000 об./мин. 10 минут. Верхнюю фазу, которая представляет собой прозрачную слегка желтоватую жидкость, осторожно отбирают, а нижнюю отбрасывают. Доводят рН полученного супернатанта до 7,2 добавлением нескольких капель 1 н NaOH. Объединяют объемы полученных супернатантов от двух проб. Дальнейшее концентрирование вирусов проводят согласно стадии 4.2.3.3.

4.2.3.2.2. Обработка полутвердых (творог, сметана, творожные продукты, пюре из овощей и фруктов, мясные и рыбные полуфабрикаты, хлеб и др.) и твердых (крупа, сыры, овощи, фрукты, мясо, зелень и др.) пищевых продуктов

А) Экстракция вирусных частиц в жидкую фазу и осветление пробы

Способ 1. Параллельно обрабатывают две навески продукта по 25 г каждая. Измельчение навески полутвердых продуктов осуществляют в стерильном флаконе объемом 250 мл, а твердых – в стерильной чашке Петри с помощью стерильных инструментов (скальпель, ножницы, при необходимости

– ступка и пестик). Пробы твердых пищевых продуктов после измельчения переносят в стерильный флакон объемом 250 мл. К измельченной пробе добавляют 50 мл 0,1 М глицинового буфера, рН 8,8, пробы тщательно перемешивают стерильной стеклянной палочкой до образования гомогенной суспензии и встряхивают на шуттель-аппарате 20 мин. Для осветления пробы ее центрифугируют при 3000 об/мин. 20 мин. Надосадочную жидкость переносят в чистый флакон и используют для дальнейшей обработки. К надосадочной жидкости добавляют равный объем хлороформа, встряхивают 3 минуты на шуттель-аппарате и центрифугируют при 2000 об/мин 10 мин. Верхнюю фазу осторожно отбирают в чистый стерильный флакон, объединяют объемы жидкости от двух проб и используют для концентрирования вирусов (как описано в 4.2.3.3).

Способ 2. Параллельно обрабатывают две навески продукта. Каждую навеску продукта в количестве 25 г помещают в стерильный стакан от гомогенизатора и заливают 25 мл 0,5 М раствора фосфатного буфера, рН 8,2, или 0,1 М раствора глицинового буфера, рН 8,8. Глициновый буфер используют для более кислых продуктов (сметана, творог, хлеб). Одновременно к пробе добавляют 0,5 г сухого хлористого магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$). Пробу гомогенизируют вручную или при 4000-8000 об/мин в течение 2 мин. Гомогенат переносят в стерильный флакон и центрифугируют при 3000 об./мин в течение 20-30 мин. Надосадочную жидкость переносят в чистый флакон и используют для дальнейшей обработки. К надосадочной жидкости добавляют равный объем хлороформа, встряхивают 3 мин на шуттель-аппарате и центрифугируют при 2000 об/мин 10 мин. Верхнюю фазу осторожно отбирают в чистый стерильный флакон, объединяют полученные супернатанты от двух проб и используют для концентрирования вирусов (как описано в п. 4.2.3.3).

Б) Десорбция вирусных частиц с поверхности овощей, фруктов и зелени в жидкую фазу

2-3 образца продукта помещают в стерильную широкогорлую колбу или другую емкость, заливают 100 мл 0,5 М раствора фосфатного буфера, рН 8,2,

или 0,1 М раствора глицинового буфера, рН 8,8, закрывают отверстие стерильной фольгой и взбалтывают вручную или в шуттель-аппарате 10 мин. Жидкость сливают и центрифугируют при 3000 об/мин 20 мин. Надосадочную жидкость переносят в стерильный флакон и используют для концентрирования вирусов (как описано в 4.2.3.3).

4.2.3.3. Концентрирование вирусов из расфасованных вод, напитков, соков и экстрактов пищевых продуктов

Концентрирование вирусов из расфасованных вод, экстрактов молочных продуктов, полутвердых, твердых пищевых продуктов и смывов с овощей и фруктов, полученных на ст. 4.2.3.2.1, 4.2.3.2.2, проводят с использованием «Наборов для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов» (ТУ РБ 100558032.119-2005), согласно инструкции по применению. Затем в полученных пробах проводят индикацию энтеровирусов, как описано в пп. 4.2.4-4.2.7.

4.2.4 Обнаружение энтеровирусных антигенов с помощью метода ИФА

4.2.4.1. Постановка реакции ИФА

Выявление антигена энтеровирусов осуществляют с помощью иммуноферментных тест-систем (ТУ РБ 100558032.092-2004) согласно инструкции по применению.

4.2.4.2. Возможные осложнения в прохождении реакции ИФА и меры их устранения

А. Показатели оптической плотности положительного и отрицательного контроля ниже порогового уровня.

Меры устранения: строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

Б. Соотношение показателей оптической плотности отрицательного и положительного контроле ниже 2,1.

Меры устранения: тщательное перемешивание компонентов реакции в лунках планшета после добавления сыворотки иммунной, строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

В. Не развивается окраска после добавления субстратно-индикаторного раствора.

Меры устранения: слежение за полным растворением ортофенилендиамина в субстратном буферном растворе, строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

4.2.5 Обнаружение РНК энтеровирусов с помощью ОТ-ПЦР

Детекцию РНК энтеровирусов осуществляют постановкой ОТ-ПЦР.

4.2.5.1. Материалы

1. Набор для выделения РНК («Рибо-сорб» (Амплисенс, Россия), «TRI-reagent» (Sigma, США) или других производителей).

2. Набор для обратной транскрипции «РЕВЕРТА» (Амплисенс, Россия) или других производителей.

3. Свободная от РНКаз вода.

4. Тест-система для амплификации кДНК энтеровирусов АмплиСенс-100-R (кат. № V-16-100-R) производства АмплиСенс (Россия) или других производителей.

4.2.5.2. Оборудование

1. ламинарный бокс или УФ стерилизуемое помещение.

2. одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5; 0,5; 0,2 мл).

3. автоматические пипетки объемом от 0,5 мкл до 1 мл.

4. сменные одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.

5. центрифуга типа «Эппендорф» с охлаждением и скоростью не менее 10 000 g.

5. встряхиватель (вортекс).

6. термоциклер.

7. термостат или водяная баня на 65 °С.

4.2.5.3. Меры предосторожности и правила работы при постановке ПЦР

Все манипуляции проводят при соблюдении правил работы с вирусами III-IV группы. Все этапы ПЦР выполняют в стерильных условиях с использованием перчаток свободных от талька. Постановку ПЦР осуществляют как минимум в 3 рабочих зонах:

Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка ПЦР реагентов.

Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, выделение РНК, внесение проб в пробирки с ПЦР реагентами.

Зона 3 – проведение амплификации и детекции амплифицированной ДНК.

Пробы из Зоны 3 запрещается переносить в Зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей. Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую.

4.2.5.4. Выделение РНК из исследуемых образцов

Выделение РНК осуществляют с использованием тест-системы "Рибосорб" производства "Амплисенс" (Россия) или другого производителя в соответствии с прилагаемой инструкцией.

4.2.5.5. Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции можно осуществлять с использованием набора «РЕВЕРТА» производства «Амплисенс» (Россия) или другого производителя (Sigma, Promega, Amersham, Fermentas) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

После синтеза кДНК на РНК-матрице пробы используют для ПЦР.

4.2.5.6. Полимеразная цепная реакция

Амплификацию полученной в реакции обратной транскрипции кДНК осуществляют с использованием тест-системы АмплиСенс-100-R для

амплификации участка кДНК 207 п. н. энтеровирусов (кат. № V-16-100-R) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

4.2.5.7. Анализ ПЦР-амплифицированной ДНК (учет результатов)

Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК используют разные методы, наиболее простым из которых является гель-электрофорез.

Материалы:

- агароза для электрофореза;
- ДНК-маркер 50-1000 пар оснований;
- ЭДТА;
- фиколл;
- бромфеноловый синий;
- Трис;
- бромистый этидий;
- ледяная уксусная кислота;
- борная кислота.

Подготовка реагентов:

- буферы для электрофореза:

ТАЕ (50X) на 1 л	0,04 М Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты) 0,002 М ЭДТА (100мл 0,5 М ЭДТА рН 8,0)
ТБЕ (5X) на 1 л	0,089 М Трис-борат (54 г Трис, 27,5 г борной кислоты) 0,002 М ЭДТА (20 мл 0,5 М ЭДТА рН 8,0)

- 1,5-2 % агароза – 1,5-2 г агарозы на 100 мл 1X буфера ТАЕ или ТБЕ. Агарозу плавят на водяной бане при 100⁰С до полного расплавления.

- бромистый этидий – матричный раствор 10мг/мл. Бромистый этидий вносят из матричного раствора в аликвоту расплавленной остывшей до 55-56⁰С агарозы до конечной концентрации 0,1-10 мкг/мл.

- буфер для нанесения проб: 0,25 % бромфеноловый синий, 20 % фикоколл 400, 0,1 М ЭДТА.

Оборудование:

- прибор для горизонтального электрофореза;
- гребенки для горизонтального электрофореза;
- источник питания (источник постоянного тока);
- трансиллюминатор;
- фото- или видеокамера с фильтрами для съемки в УФ;
- автоматические пипетки и наконечники.

Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза:

Реагент бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все манипуляции проводят с использованием перчаток. Все реагенты, содержащие бромистый этидий, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке.

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 литров с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 часов. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

Постановка:

- в электрофорезную кювету вставляют гребенку так, чтобы расстояние между дном кюветы и зубцами гребенки составляло 1 мм;
- подготовленную агарозу заливают в электрофорезную кювету с гребенкой и дают ей застыть;
- после застывания агарозы гребенку аккуратно достают, стараясь не повредить образовавшиеся лунки, и помещают в прибор для электрофореза так, чтобы лунки геля располагались ближе к отрицательному электроду;

- в случае использования минерального масла проводят подготовку ПЦР-продуктов, добавляя 100 мкл хлороформа с последующим встряхиванием и центрифугированием при 12 000 g в течение 1 мин. Верхнюю водную фазу переносят в новые пробирки. Пробы амплифицированные без минерального масла не требуют подготовки;

- 15 мкл ПЦР-амплифицированной подготовленной пробы вносят в чистые пробирки и добавляют 3 мкл буфера для проб, перемешивают;

- прибор для электрофореза наполняют 1X буфером ТАЕ или ТБЕ так, чтобы агароза была полностью им покрыта;

- через слой жидкости, внимательно, в отдельные лунки вносят по 15-20 мкл ДНК-маркера, положительный, отрицательный контроли и пробы;

- электрофорез проводят при напряжении 10 В/см.

Учет результатов:

Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора. При этом агарозный гель либо достают из кюветы и помещают на стекло трансиллюминатора либо используют емкости из УФ проницаемых материалов.

При постановке ПЦР для выявления в пробе РНК энтеровирусов положительные образцы должны содержать специфическую полосу ДНК размером п. н., соответствующую инструкции производителя используемой тест-системы. Размер полосы определяют по соотношению с ДНК-маркером. Результаты можно фиксировать посредством фотографирования или видеосъемки геля при использовании УФ фильтров.

4.2.6. Обнаружение РНК инфекционных энтеровирусов с помощью интегрированной с культурой клеток ПЦР (ИКК-ПЦР)

4.2.6.1. Материалы

- 0,25 % раствор трипсина в физрастворе или растворе Хенкса;
- среда культуральная ДМЕМ;
- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота;
- физиологический раствор или раствор Хенкса;

- набор для выделения РНК (Рибозоль Микро ("Амплисенс", Россия) или TRI-reagent ("Sigma", США));
- набор для обратной транскрипции «РЕВЕРТА» ("Амплисенс", Россия);
- свободная от РНКаз вода;
- тест-система для амплификации кДНК энтеровирусов АмплиСенс-100-R (кат. № V-16-100-R) производства "Амплисенс" (Россия) или других производителей.

4.2.6.2. Оборудование

1. Ламинарный бокс или УФ стерилизуемое помещение.
2. Микроскоп инвертированный.
3. Термостат регулируемый ($37 \pm 0,1$ °C).
4. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5; 0,5; 0,2 мл).
5. Автоматические пипетки объемом от 0,5 мкл до 1 мл.
6. Сменные одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.
7. Центрифуга типа «Эппендорф» с охлаждением и скоростью не менее 10 000 g.
8. Встряхиватель (вортекс).
9. Термоциклер.
10. Термостат или водяная баня на 65 °C.

4.2.6.3. Отбор и концентрирование проб

Отбор и концентрирование проб проводят, как описано в пп. 4.2.3.

4.2.6.4. Заражение культур клеток и их последующая обработка

Для проведения ИКК ПЦР следует использовать не менее двух культур клеток, учитывая их чувствительность к различным типам энтеровирусов. Рекомендуется использовать следующие сочетания клеточных культур: BGM и RD или Нер-2 и RD.

1. В пробирках (пенфлаконах) с хорошо сформированным клеточным монослоем заменяют ростовую среду на поддерживающую с 1-2 % сыворотки

крови эмбрионов крупного рогатого скота и добавлением антибиотиков: гентамицина К в дозе 80-100 мкг/мл, амфотерицина В в дозе 2,5 мкг/мл.

2. Маркируют пробирки (по 2 на каждую исследуемую пробу), затем осуществляют заражение, внося в каждую пробирку по 0,2 мл образца, и помещают в термостат (36,5-37 °С). Для контроля оставляют несколько пробирок с незараженной культурой (со сменой и без смены среды).

3. Инкубируют пробирки в течение 5 суток, микроскопируя их ежедневно для контроля состояния культуры. При первых признаках цитодеструкции (но не позднее 5-х сут) пробирки извлекают из термостата для перевода в суспензию и выделения из них РНК. Из флаконов удаляют культуральную среду и промывают клеточный монослой, добавляя 1 мл физраствора. После промывки удаляют физраствор пипеткой, не задевая клеточный монослой.

4. Во все флаконы добавляют 0,1 мл 0,25 % раствора трипсина и помещают в термостат на 1-2 мин, после чего их микроскопируют. Для успешного перевода в суспензию все клетки, составляющие монослой, должны округлиться. Если округление всех клеток при первом микроскопировании не наблюдается, флаконы помещают в термостат еще на 1-2 мин. После того, как все клетки округлились, во флаконы добавляют 1 мл среды ДМЕМ, содержащей 10 % ЭТС для инактивации трипсина. Затем флаконы энергично встряхивают и повторно пипетируют для перевода клеток в суспензию.

5. Маркируют соответствующее количество стерильных пластиковых пробирок на 1,5 мл (типа «Эппендорф»). Полученную суспензию клеток, включая контроль клеток, переносят из пенфлаконов в пластиковые пробирки.

6. Осаждают клетки центрифугированием в течение 5 мин при 2000 об/мин и аккуратно пипеткой удаляют среду. После чего клетки промывают, добавляя 1 мл физраствора и интенсивно встряхивая. Центрифугируют в течение 5 мин при 2000 об/мин и пипеткой удаляют среду. Повторяют отмывку еще 1 раз.

7. После второй отмывки осадок, содержащий клетки, ресуспендируют в 0,25 мл физраствора и используют для выделения РНК.

4.2.6.5. ПЦР контроли

Для контроля специфичности ПЦР используют положительный и отрицательные контроли. В качестве положительного контроля используют культуры клеток, зараженные любым энтеровирусом и прошедшие те же этапы, что и исследуемые пробы. В качестве отрицательных контролей используют стерильную дистиллированную воду и 2 флакона с незараженной культурой клеток (со сменой и без смены среды). Все манипуляции проводят параллельно для проб и для контролей.

4.2.6.6. Выделение РНК

Выделение РНК осуществляют с использованием коммерческих наборов «РибоЗоль-микро» (Амплисенс, Россия) или TRI-реагент (Sigma, USA), или других производителей в соответствии с прилагаемой инструкцией.

4.2.6.7. Хранение выделенной РНК

РНК можно хранить в течение 1 месяца в изопропанолe при -20°C . Для длительного хранения к раствору РНК добавляют 2 объема 96 % этанола (температура хранения -70°C).

4.2.6.8. Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции можно осуществлять с использованием набора «РЕВЕРТА» производства Амплисенс (Россия) или другого производителя (Sigma, Promega, Amersham, Fermentas) в соответствии с инструкцией.

После синтеза кДНК на РНК-матрице пробы используют для ПЦР.

4.2.6.9. Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию полученной кДНК осуществляют в соответствии с п. 4.2.6.6.

4.2.6.10. Анализ ПЦР-амплифицированной ДНК

Анализ продуктов ИКК-ПЦР осуществляют в соответствии с п. 4.2.6.7.

4.2.6.11. Интерпретация результатов, полученных с использованием ИКК-ПЦР

Выявление РНК энтеровирусов в пробе исследуемой воды с помощью ИКК-ПЦР свидетельствует о присутствии в ней инфекционных энтеровирусных агентов и интерпретируется как положительный результат.

4.2.6.12. Возможные проблемы при детекции РНК энтеровирусов с помощью ПЦР и ИКК-ПЦР и их устранение

Отсутствие специфической полосы в пробе положительного контроля или ее наличие в пробе отрицательного контроля свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Отсутствие специфической полосы в препарате положительного контроля указывает на возможную деградацию РНК и/или внесение в реакционную смесь ингибиторов реакции. Пути устранения:

- при проведении данного этапа исследований необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников на всех стадиях постановки во избежание внесения ингибиторов реакции;

- для разведения выделенной РНК применяется только обработанная диэтилпиروкарбонатом вода во избежание загрязнения препарата РНКазами.

Наличие специфической полосы в препарате отрицательного контроля свидетельствует о контаминации проб. Пути устранения:

- соблюдение пространственного разделения рабочих зон;
- работа только в одноразовых перчатках и их смена при переходе из одной зоны в другую;
- использование отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон.

4.2.7 Выделение энтеровирусов в культурах клеток

Порядок и техника выделения энтеровирусов, определение их инфекционного титра, а также идентификация осуществляются стандартными методами, описанными в Инструкции по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций (регистрационный № 133-1204 от 12 апреля 2005 г).