

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения
Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь,

Н. П. Жукова

«19» февраля 2018 г.

Регистрационный № 010-1118

АЛГОРИТМ ИНДИКАЦИИ ВИРУСНОЙ КОНТАМИНАЦИИ
И ОЦЕНКИ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д. м. н., профессор Амвросьева Т. В.; Казинец О. Н.;

к. б. н. Поклонская Н. В.; Богущ З. Ф.; Лозюк С. К.; Шилова Ю. А.;

Аринович А. С.

Минск 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова

19.12.2018

Регистрационный № 010-1118

**АЛГОРИТМ ИНДИКАЦИИ ВИРУСНОЙ КОНТАМИНАЦИИ
И ОЦЕНКИ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т. В. Амвросьева, канд. биол. наук
Н. В. Поклонская, О. Н. Казинец, З. Ф. Богуш, С. К. Лозюк, Ю. А. Шилова,
А. С. Аринович

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм индикации вирусной контаминации и оценки вирусологической безопасности пищевой продукции (ПП), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику инфекций с пищевым путем передачи.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-гигиенистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в учреждениях, осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Автоклав.

Весы лабораторные электронные.

Иономер.

Ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой.

Микроцентрифуга настольная лабораторная (1–14 тыс. об/мин);

Термостат твердотельный.

Термоциклер с оптическим модулем для ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции.

Холодильник от +2 до +8 °С с морозильной камерой от -16 до -20 °С;

Центрифуга рефрижераторная (1–5 тыс. об/мин).

Центрифуга–вортекс.

Гомогенизатор механический.

Дозаторы автоматические лабораторные переменного объема: 0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл.

Инструменты лабораторные (пинцеты, ножницы, скальпель, совок для взвешивания).

Колбы, стаканы пластиковые (50; 100; 250 мл).

Комплект капилляров для секвенирования.

Микропробирки для ПЦР, соответствующие типу используемого термоциклера (0,2; 0,5 мл).

Набор реагентов для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов.

Набор для экстракции и концентрирования вирусов из пищевых продуктов;

Набор для выделения РНК/ДНК из образцов.

Набор для обратной транскрипции.

Набор для амплификации кДНК энтеровирусов.

Набор для амплификации кДНК норовирусов человека 1 и 2-го типов.

Набор для амплификации кДНК ротавирусов.

Набор для амплификации ДНК аденовирусов.

Набор для амплификации кДНК астровирусов.

Набор для амплификации кДНК вируса гепатита А.

Набор для амплификации кДНК вируса гепатита Е.

Набор для очистки ДНК из геля.

Набор для секвенирования.

Пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл).

Штативы для пробирок.

Бифэкстракт.

Вода деионизированная, стерильная, свободная от нуклеаз;

Магний хлористый ($MgCl_2$).

Натрия гидроокись ($NaOH$).

Натрий лимоннокислый 3-замещенный ($Na_3C_6H_5O_7$).

Натрий хлористый ($NaCl$).

Перекись водорода, 3 %.

Олигонуклеотиды для амплификации фрагментов ДНК для молекулярного типирования (инструкция по применению «Алгоритм генотипирования эпидемически значимых вирусов-контаминантов объектов окружающей среды», рег. № 014-1115 от 04.04.2016).

Хлороформ, 97,4 %.

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для молекулярно-биологических исследований.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Клинические симптомы кишечной инфекции с пищевым путем передачи

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, включает 4 основных этапа:

разработка рабочей программы исследований;

получение проб ПП и пробоподготовка;

детекция вирусов-контаминантов ПП;

оценка вирусологической безопасности ПП.

Схематично этапы и стадии реализации метода представлены на рисунке.

Стадия экстракции проводится для жидкой, твердой и полутвердой ПП, она отсутствует при исследовании расфасованной воды и напитков.



Рисунок — Алгоритм индикации вирусной контаминации и оценки вирусологической безопасности ПП

Исследования осуществляются в рамках государственного санитарного надзора за субъектами хозяйствования на соответствие ПП установленным законодательством санитарно-эпидемиологическим требованиям при выборочных и внеплановых проверках, в т. ч. по санитарно-эпидемиологическим показаниям в случае подъема заболеваемости населения кишечными или другими вирусными инфекциями с пищевым путем передачи, уровень которой превышает средние сезонные показатели, а также при вспышке или эпидемии.

При исследованиях в рамках выборочных и внеплановых проверок ПП анализируется на предмет выявления в ней норовирусов (НоВ), аденовирусов (АдВ), ротавирусов (РВ), энтеровирусов (ЭВ).

При изучении ПП по санитарно-эпидемиологическим показаниям в перечень детектируемых вирусных агентов, кроме вышеуказанных, включается установленный возбудитель, вызвавший осложнение эпидемиологической ситуации (например, астровирусы, саповирусы, вирусы гепатита А и Е и др.).

Объектами исследований являются следующие виды ПП:

питьевая вода, расфасованная в емкости (расфасованная вода);

напитки;

жидкая ПП (молоко, кефир, соки и др.);

полутвердая ПП (молочная, мясная, рыбная, хлебные изделия и др.);

твердая ПП (крупы, сыры, мясо и др.);

овощи, фрукты, зелень;

кулинарные изделия (готовые к употреблению).

Рабочая программа исследований

Программа должна содержать:

перечень контролируемых ПП;

план пунктов (точек) отбора проб ПП;

объем выборки и количество анализируемых проб, периодичность отбора проб;

перечень контролируемых вирусов;

перечень применяемых для исследований методов;

распределение ответственности за сбор, обработку, исследование проб;

перечень необходимых нормативных и методических документов с указанием материального обеспечения для проведения исследований;

другие разделы (при необходимости).

Получение проб ПП и пробоподготовка

Расфасованную воду, напитки отбирают в объеме не менее 3 л (Гигиенический норматив «Требования безопасности питьевой воды, расфасованной в емкости», утвержденный постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 15.12.2015 № 123). Отбор проб ПП осуществляют согласно правилам ГОСТ ISO 707-2013 и ГОСТ 31904-2012 в соответствии с разработанной рабочей программой исследований.

Минимальный объем отбираемой пробы для жидкой ПП составляет 400 мл, полутвердой и твердой ПП — 50 г. Количество проб определяется согласно рабочей программе исследований. После доставки в лабораторию из отобранных проб из каждой партии жидкой, полутвердой или твердой продукции готовят среднюю лабораторную пробу путем перемешивания в стерильной емкости. Затем отбирают необходимое количество для анализа, которое для расфасованной воды и напитков составляет 3 л, для жидкой ПП — 400 мл; для полутвердой и твердой ПП — 50 г.

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 ч). Каждую пробу регистрируют в рабочем журнале. Хранение проб допускается при температуре от 2 до 8 °С не более 24 ч или от -16 до -18 °С не более 1 недели.

Пробоподготовку образцов ПП осуществляют в соответствии с инструкцией по применению «Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям» (рег. № 166-1208 от 11.06.2009).

После проведения пробоподготовки каждый образец сконцентрированного элюата делится на 2 аликвоты, одну из которых используют для детекции потенциальных вирусов-контаминантов, а другую хранят при температуре от -16 до -20 °С для последующего применения при необходимости молекулярного типирования выявленного вируса.

Детекция и идентификация вирусов-контаминантов ПП

Рутинно контролируемые показателями вирусной контаминации ПП являются РНК/ДНК потенциальных вирусов-контаминантов, детекцию которых осуществляют методом ПЦР с использованием соответствующих ПЦР-наборов, предназначенных для санитарно-вирусологических исследований и зарегистрированных на территории Республики Беларусь в установленном порядке в соответствии с инструкцией производителя. Предпочтение отдается наборам с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени в связи с низким риском перекрестной контаминации продуктами амплификации при их использовании. Исследования осуществляют в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР проводят при соблюдении правил работы с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами I-II группы риска (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утверждены Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 № 2).

Все этапы ПЦР выполняют в стерильных условиях с использованием перчаток, свободных от талька. Постановку ПЦР осуществляют в трех 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 нуклеиновых кислот, внесение проб в пробирки с ПЦР-реагентами. Зона 3 — амплификация и детекция 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.

При необходимости идентификации выявленного в ПП вирусного агента до генотипа (геноварианта) проводят его молекулярное типирование. Данные высокотехнологичные исследования требуют специального оборудования, материалов и обученных специалистов, они выполняются на базе специализированной референс-лаборатории согласно инструкции по применению «Лабораторный контроль за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи» (рег. № 002-0213 от 13.06.2013).

Для исследования в референс-лабораторию передают аликвоты проб элюатов, хранившихся после сортировки при температуре от -16 до -20 °С. Транспортирование осуществляют при температуре от 2 до 8 °С. В сопроводительных документах должны быть указаны следующие данные:

- наименование продукта;
- номер партии;
- дата отбора проб;
- наименование предприятия изготовителя;
- метод пробоподготовки;
- тип обнаруженного вирусного агента.

Возможные проблемы при детекции вирусных РНК/ДНК методом ПЦР

Наличие ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов (в соответствии с критериями, изложенными в инструкции на соответствующий набор) свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Пути устранения ложноотрицательных результатов:

при проведении всех этапов исследований необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции;

для разведения выделенной РНК применяется только обработанная диэтилпироскарбонатом вода или соответствующий РНК-элюент, входящий в состав набора, во избежание загрязнения препарата РНКазами.

Пути устранения ложноположительных результатов:

соблюдение пространственного разделения рабочих зон, использование отдельных наборов посуды, пипеток и отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон;

запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую.

Возможные проблемы при проведении молекулярного типирования

Низкое содержание нуклеиновых кислот возбудителя в пробах ПП, не позволяющее накопить достаточное количество ДНК-мишени для секвенирования.

Пути устранения:

проведение 3-х пассажей исследуемого образца в культуре чувствительных клеток для накопления вируса, если он является культивируемым (адено-, энтеровирусы);

если вирусы-контаминанты ПП являются некультивируемыми или плохо культивируемыми (рота-, норо-, астровирусы), то их низкое содержание в пробах считается непреодолимым препятствием для секвенирования.

Оценка вирусологической безопасности ПП

Анализируемая ПП признается эпидемически безопасной в отношении вирусных инфекций при отсутствии РНК/ДНК патогенных вирусов человека в анализируемом объеме, который составляет для расфасованной воды и напитков — 3 л, для жидкой ПП — 400 мл; для полутвердой и твердой ПП — 50 г.