

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Здравоохранения Республики Беларусь,

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть

«11» 06 2009 г.

Регистр. № 166-1208

**МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ПО  
ВИРУСОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ**

Инструкция по применению

**Учреждение-разработчик:** ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»

Министерства здравоохранения Республики Беларусь

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

Минск 2008

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)
- 5 Весы технические аптечные
- 6 Весы торсионные
- 7 Вода деионизированная (или дистиллированная вода, стерилизованная автоклавированием при 121°C+1°C в теч. 20 мин) по ГОСТ 6709-82
- 8 Глицин по ГОСТ 4209-67
- 9 Гомогенизатор механический
- 10 Инструменты лабораторные (пинцеты, ножницы, скальпель, совок для взвешивания)
- 11 Иономер (рН-121)
- 12 Магний хлористый (MgCl<sub>2</sub>), х.ч. по ГОСТ 4209-67)
- 13 Микроскоп инвертированный
- 14 Набор для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов (ТУ ВУ 100558032. 119-2005)
- 15 Набор для экстракции и концентрирования вирусов из пищевых продуктов (ТУ ВУ 100558032.152-2008)
- 16 Набор группоспецифических ингибиторов для первичной идентификации энтеровирусов и дифференциации их на полио- и неполиомиелитные вирусные агенты (ТУ РБ 100558032. 077-2002)
- 17 Натрия гидроокись (NaOH), ч.д.а. по ГОСТ4328-77

- 18 Натрий лимоннокислый 3-х замещенный по ГОСТ 22280-76
- 19 Перевиваемые линии клеток RD (клетки рабдомиосаркомы человека), BGM (клетки почки африканской зеленой мартышки), Нер-2 (клетки карциномы гортани человека) (производства НИИ ЭМ)
- 20 Перекись водорода , х.ч по ГОСТ 10929-78
- 21 Пипетки стеклянные градуированные на 1, 5, 10 по ГОСТ 29227-91
- 22 Посуда лабораторная чашки Петри, колбы, пробирки по ГОСТ 1770-74
- 23 Среды для культур клеток: MEM
- 24 Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты
- 25 Стерильные стеклянные флаконы для культуры клеток (емкостью 25, 50 мл)
- 26 Сыворотки диагностические энтеровирусные сухие (для реакции нейтрализации, группоспецифические и типоспецифические, ФС – 42 – 3875 – 99)
- 32 Сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота
- 27 Термостат, регулируемый до  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 28 Термостат ( $\text{CO}_2$ ) инкубатор
- 29 Тест-набор конфирматорный для подтверждения специфичности выявления антигенов энтеровирусов иммуноферментным методом (ТУ РБ 100558032.- 093. 2004)
- 30 Тест-система иммуноферментная для определения антигенов энтеровирусов  
( ТУ РБ 100558032.092-2004)
- 31 Тест-система иммуноферментная для выявления антигенов вируса гепатита А (ТУ РБ 100558032110-2004)
- 32 Тест-система иммуноферментная для выявления антигенов ротавирусов у людей и животных (ТУ РБ 100558032.108-2004 )
- 33 Холодильник-морозильник (от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $+4^{\circ}\text{C}$ )
- 34 Центрифуга рефрижераторная на 1-5 тыс. об./мин
- 35 Центрифуга высокоскоростная ( не менее 10000 об/мин с охлаждением)

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

37 Этиловый спирт по ГОСТ 5962-67

Необходимые материалы и оборудование для осуществления ПЦР-исследований изложены в п.п. 5.2.5.1, 5.2.5.2, 5.2.5.7, 5.2.6.1, 5.2.6.2.

## **2 Объекты исследования**

Объектами исследований являются следующие виды пищи:

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

## **3 Виды санитарно-вирусологического контроля пищевых продуктов**

- текущий (плановый);
- контроль в период эпидемиологического риска;
- экстренный;
- по санитарно- вирусологическим показателям

Текущий контроль осуществляется планоно (в течение года) в соответствии с разработанной региональной программой для конкретной территории (города, населенного пункта). Программа должна содержать:

- перечень контролируемых объектов и показателей;
- периодичность исследований;
- перечень применяемых для исследований методов;
- план пунктов (точек) отбора проб пищевых продуктов;
- количество контролируемых проб пищевых продуктов и периодичность их отбора;
- календарные графики отбора проб пищевых продуктов и проведения их исследований.

Программа, разработанная территориальным ЦГЭ, утверждается главным государственным санитарным врачом ЦГЭ на срок не более 1 года. В ней должен быть определен порядок передачи информации органу местного самоуправления. Программа, разработанная ведомственными лабораториями пищевых предприятий (при осуществлении производственного контроля), а также все изменения и дополнения в ней, должны согласовываться с территориальными ЦГЭ, а полученная информация - направляться в областные ЦГЭ и органы местного самоуправления.

Производственный контроль качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям может осуществляться по договору со специализированными лабораториями НИИ и санитарной службы.

Контроль в период «риска» предусматривает проведение санитарно-вирусологических исследований в весенне-летне-осеннее время - III-IX месяцы каждого года, которые являются наиболее уязвимыми в плане вирусного загрязнения пищевых продуктов.

Экстренный контроль предусматривает осуществление исследований в случае каких-либо внезапных нарушений или аварий в системе производства пищевых продуктов (включая нарушения в системе водоснабжения и канализации), в результате которых может произойти вирусная контаминация пищевых продуктов.

Контроль по санитарно-эпидемиологическим показателям осуществляется в случае подъема заболеваемости населения кишечными и другими вирусными инфекциями с пищевым путем передачи, уровень которой превышает средние сезонные показатели, а также при вспышке или эпидемии пищевого происхождения.

Экстренный контроль и контроль по санитарно-эпидемиологическим показателям осуществляются по согласованию с территориальным учреждением госсаннадзора с участием заинтересованных специалистов (эпидемиолога, санитарного врача, бактериолога, вирусолога) и предусматривают более частые исследования по сравнению с установленными в программе текущего контроля.

#### **4 Вирусологические показатели качества пищевых продуктов**

В качестве санитарно-показательных агентов при исследовании 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-, Норволк-вирусов и др. (выявление вирусспецифических АГ и РНК методами ИФА и ПЦР, соответственно).

#### **5 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, при необходимости - совместно со специалистами по пищевой гигиене и санитарной вирусологии.

##### **5.1 Оценка эпидемической безопасности пищевых продуктов**

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

Таблица 1 – Показатели и их нормативы для оценки эпидемической безопасности пищевых продуктов

Показатели	Нормативы
АГ энтеровирусов	Отсутствие в исследуемом количестве (объем, вес) *
РНК энтеровирусов	Отсутствие в исследуемом количестве (объем, вес) *
Энтеровирусы в инфекционной форме	Отсутствие 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 -, Нороволк-вирусов и др.).

## **5.2 Методы санитарно-вирусологического контроля пищевых продуктов**

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

### **5.2.1 Общая схема исследования пищевых продуктов**

Этапы и общий порядок осуществления исследований пищевых продуктов, отражающие стадии пробоподготовки и индикации вирусных агентов, представлены на рисунке 1. Руководствуясь этой схемой, следует учитывать,

что стадию экстракции необходимо проводить для жидких молочных, твердых и полутвердых продуктов. Обработка расфасованных вод не требует этой стадии. При индикации вирусного материала трудно культивируемых в культурах клеток вирусов (гепатитаА, рота-) или некультивируемых (Норволк) следует выявлять маркеры вирусов молекулярно-генетическими и иммунохимическими методами с помощью стандартных наборов и тест-систем.

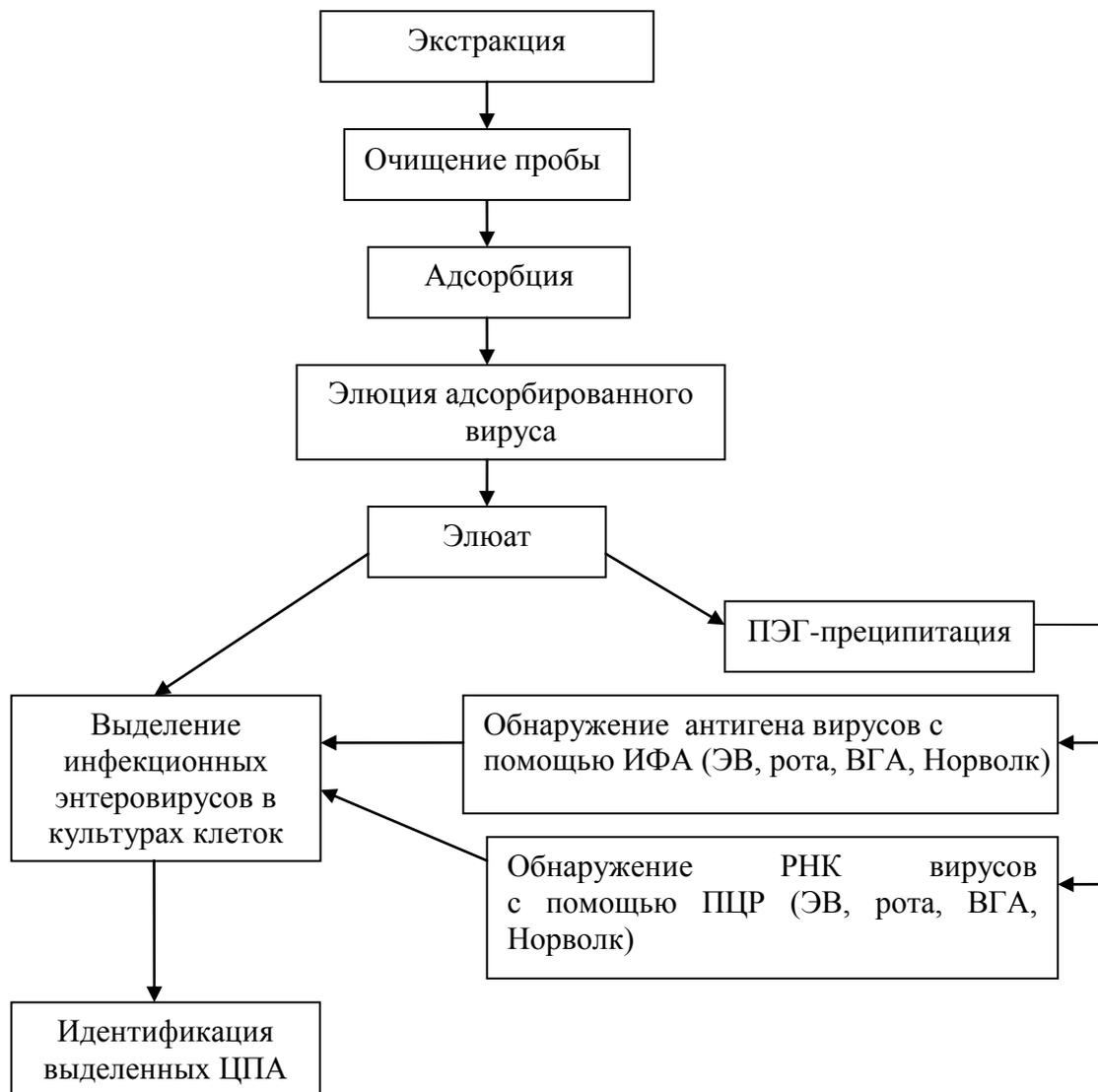


Рис.1 Общая схема индикации и идентификации кишечных вирусов в пищевых продуктах

## **5.2.2 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 заводских упаковках. Твердые пищевые продукты отбирают в количестве 50г, 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  $+4^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  не более 12 часов или при температуре  $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  не более 1 недели.

## **5.2.3 Обработка проб и концентрирование вирусов**

### **5.2.3.1 Приготовление растворов**

- 0,1 М глициновый буфер готовят, растворяя 7,5 г глицина в 100 мл дистиллированной воды, после чего доводят 0,01М раствором NaOH pH буферного раствора до 8,8 и общий объем раствора доводят до 1000 мл дистиллированной водой;

- 0,01М раствор едкого натра готовят, растворяя 0,4 г NaOH в 1000 мл дистиллированной воды.

### **5.2.3.2 Экстракция вирусов из пищевых продуктов разной консистенции (получение экстрактов).**

Экстракцию вирусов из пищевых продуктов можно проводить с использованием стандартных «Наборов для экстракции и концентрирования вирусов из пищевых продуктов» (ТУ ВУ 100558032.152.- 2008) (далее по тексту «Набор №1») согласно инструкции или глицинового буферного раствора (п. 5.2.3.1).

### **5.2.3.2.1 Обработка жидких молочных продуктов**

Молоко (400 мл) наливают в стерильную емкость объемом 500 мл и добавляют 12г цитрата натрия или лимонной кислоты для подкисления пробы и сворачивания белков молока. Затем фильтруют через водонепроницаемую ткань, входящую в состав «Набора №1». Для этого можно также использовать сложенную вдвое марлю или капроновую ткань. Остатки на фильтре промывают 100 мл глицинового буферного раствора.

### **5.2.3.2.2 Обработка полутвердых и твердых продуктов**

а) Отбирают 50 г полутвердого пищевого продукта и помещают в стерильный флакон объемом 250 мл, добавляют к отобранной пробе 100 мл глицинового буферного раствора, пробы тщательно перемешивают стерильной стеклянной палочкой до образования гомогенной суспензии, закрывают пробкой или стерильной фольгой и встряхивают в шуттель-аппарате 20 минут.

б) Отбирают 50 г твердого пищевого продукта и помещают в стерильный стакан объемом 150 – 200 мл или в стерильную чашку Петри. Измельчают продукт с помощью стерильных инструментов (скальпель, ножницы, при необходимости – ступка и пестик). К измельченной пробе добавляют 100 мл 0,1 М глицинового буферного раствора, пробы тщательно перемешивают стерильной стеклянной палочкой до образования гомогенной суспензии и встряхивают в шуттель-аппарате 20 минут.

в) Для обработки твердых пищевых продуктов можно использовать гомогенизатор. Навеску продукта (50 г) помещают в стерильный стакан от гомогенизатора и заливают 100 мл глицинового буферного раствора. 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 минут. Гомогенат переносят в стерильный флакон.

г) Для осветления пробы центрифугируют при 2000 об/мин. 10 мин. Надосадочную жидкость переносят в чистый флакон и используют для дальнейшей обработки. Если нет возможности для центрифугирования такого

объема можно профильтровать пробу через водопроницаемый фильтр, входящий в состав «Набора 1» (также подходят для использования сложенная вдвое марля или капроновая ткань).

д) Для очищения пробы и исключения ложноположительных результатов при дальнейшей индикации маркеров вирусов в ИФА и ОТ-ПЦР используют хлороформ. К полученной надосадочной жидкости по п. г) добавляют хлороформа, равный половине объема полученного экстракта (~ 50 мл), закрывают пробками и встряхивают 5 минут в шуттель – аппарате или вручную. Затем центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин. Переносят верхнюю фазу в чистый стерильный флакон и доводят рН полученного супернатанта до 7,2 добавлением нескольких капель 1н HCl.

е) 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 глицинового буферного раствора, закрывают отверстие стерильной фольгой и взбалтывают вручную или в шуттель-аппарате 10 мин. Жидкость сливают и центрифугируют при 2000об./мин. 10 мин. Надосадочную жидкость переносят в стерильный флакон, доводят рН 7,2 и используют для дальнейшего концентрирования вирусов.

### **5.2.3.3 Концентрирование вирусов из расфасованных вод, напитков, соков и экстрактов пищевых продуктов**

Концентрирование вирусов из расфасованных вод, экстрактов полутвердых, твердых пищевых продуктов и смывов с овощей и фруктов, полученных на ст. 5.2.3.2. проводят с использованием адсорбентов вирусов - активного оксида алюминия, входящего в состав «Наборов для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов» («Набор №2») или волокнистого фильтра, входящего в состав «Набора №1» Для этого адсорбент помещают в исследуемую бутылку с расфасованной водой или экстракт пищевого продукта, полученный по п.5.2.3.2 и проводят концентрирование вирусов методом адсорбции-элюции. Дополнительное концентрирование вирусов проводят с помощью ПЭГ-

преципитации (см. инструкции по применению). Затем в полученных пробах проводят индикацию энтеровирусов, как описано в п.п 5.2.4 – 5.2.5.

## **5.2.4 Обнаружение энтеровирусных антигенов с помощью метода ИФА**

### **5.2.4.1 Постановка реакции ИФА**

Выявление антигена энтеровирусов осуществляют с помощью иммуноферментных тест-систем (ТУ РБ 100558032.092-2004, ТУ РБ 100558032.093-2004) согласно инструкции по применению.

В случае необходимости по эпидпоказаниям для определения антигенов ротавирусов и вируса гепатита А применяют иммуноферментные тест-системы производства РНПЦ ЭМ или других производителей.

### **5.2.4.2 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: строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

## **5.2.5 Обнаружение РНК энтеровирусов с помощью ОТ-ПЦР**

Детекцию РНК энтеровирусов осуществляют постановкой ОТ- ПЦР.

### **5.2.5.1 Материалы**

- Набор для выделения РНК (Рибосорб, производства "Амплисенс" или других производителей, TRI-reagent, производства "Sigma", США, или других производителей)

- Набор для обратной транскрипции (РЕВЕРТА, производства "Амплисенс", Россия или других производителей)

- Свободная от РНКаз вода

- Тест-система для амплификации кДНК энтеровирусов АмплиСенс-100-R (Кат. № V-16-100-R), производства "Амплисенс", Россия или других производителей)

#### **5.2.5.2 Оборудование**

- ламинарный бокс или УФ стерилизуемое помещение;

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

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

- сменные одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами;

- центрифуга типа «Эппендорф» с охлаждением и скоростью не менее 10 000 g;

- встряхиватель (вортекс);

- термоциклер ;

- термостат или водяная баня на 65<sup>0</sup>С

#### **5.2.5.3 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.

#### **5.2.5.4 Выделение РНК из исследуемых образцов**

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

#### **5.2.5.5 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.

#### **5.2.5.6 Полимеразная цепная реакция**

Аmplification полученной в реакции обратной транскрипции кДНК осуществляют с использованием тест-системы АмплиСенс-100-R для амплификации участка кДНК 207п.н. энтеровирусов (Кат. № V-16-100-R), или другого производителя, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

#### **5.2.5.7 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 (242г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты 0,002 М ЭДТА (100мл 0,5 М ЭДТА рН 8,0)
ТБЕ (5X) на 1 л	0,089М Трис-борат (54г. Трис, 27,5 г. борной кислоты 0,002М ЭДТА (20мл 0,5М ЭДТА рН 8,0)

- 1,5 - 2% агароза – 1,5 - 2 г агарозы на 100мл 1X буфера ТАЕ или ТБЕ. Агарозу плавят на водяной бане при 100<sup>0</sup>С до полного расплавления.

- Бромистый этидий – матричный раствор 10мг/мл. Бромистый этидий вносят из матричного раствора в аликвоту расплавленной остывшей до 55-56<sup>0</sup>С агарозы до конечной концентрации 0,1-10 мкг/мл.

- Буфер для нанесения проб: 0,25% бромфеноловый синий, 20% фиколл 400, 0,1М 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.

### 5.2.5.8 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.

#### **5.2.5.9 Постановка электрофореза:**

- 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 100мкл хлороформа с последующим встряхиванием и центрифугированием при 12000g 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 15-20мкл ДНК маркера, положительный, отрицательный контроли и пробы;

- электрофорез проводят при напряжении 10 В/см

#### **5.2.5.10 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.

## **5.2.6 Обнаружение РНК инфекционных энтеровирусов с помощью интегрированной с культурой клеток ПЦР (ИКК-ПЦР)**

### **5.2.6.1 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, производства "Амплисенс", Россия);

- Свободная от РНК вода;
- Тест-система для амплификации кДНК энтеровирусов АмплиСенс-100-R (Кат. № V-16-100-R), производства "Амплисенс", Россия или других производителей

### **5.2.6.2 Оборудование**

- ламинарный бокс или УФ стерилизуемое помещение;
- микроскоп инвертированный;
- термостат регулируемый ( $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ )
- одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5; 0,5; 0,2 мл);

- автоматические пипетки объемом от 0,5 мкл до 1мл.
- сменные одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами;
- центрифуга типа «Эппендорф» с охлаждением и скоростью не менее 10 000 g;
- встряхиватель (вортекс);
- термоциклер ;
- термостат или водяная баня на 65<sup>0</sup>С

### **5.2.6.3 Отбор и концентрирование проб**

Отбор и концентрирование проб проводят как описано в п.п. 5.2.2, 5.2.3.

### **5.2.6.4 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. Рекомендуются использовать следующие сочетания клеточных культур: BGM и RD, или Нер-2 и RD.

- 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.

- 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<sup>0</sup>С). Для контроля оставляют по несколько пробирок с незараженной культурой (со сменой и без смены среды).

- Инкубируют пробирки в течение 5 суток, микроскопируя их ежедневно для контроля состояния культуры. При первых признаках цитодеструкции (но не позднее 5-х суток), 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.

- Во все флаконы добавляют 0,1 мл 0,25% раствора трипсина и помещают их в термостат на 1-2 минуты, после чего микроскопируют флаконы. 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 минуты. 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.

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

- 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 аккуратно, пипеткой удаляют среду. Повторяют отмывку еще 1 раз.

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

#### **5.2.6.5 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.

#### **5.2.6.6 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.

#### **5.2.6.7 Хранение выделенной РНК**

РНК можно хранить в течение 1 месяца в изопропанолe при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для длительного хранения к раствору РНК добавляют 2 объема 96% этанола и помещают на  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.2.6.8 Обратная транскрипция**

Осуществляют согласно п. 5.2.5.5.

После синтеза кДНК на РНК матрице пробы используют для ПЦР.

#### **5.2.6.9 Полимеразная цепная реакция**

Аmplификацию полученной кДНК осуществляют, как описано в п.5.2.5.6

#### **5.2.6.10 Анализ ПЦР-амплифицированной ДНК**

Анализ продуктов ИКК-ПЦР осуществляют, как описано в п.5.2.5.7

#### **5.2.6.11 Интерпретация результатов, полученных с использованием ИКК- ПЦР**

Выявление РНК энтеровирусов в пробе исследуемого пищевого продукта с помощью ИКК ПЦР свидетельствует о присутствии в ней инфекционных энтеровирусных агентов и интерпретируется как положительный результат.

#### **5.2.6.12 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 диэтилпиокарбонатом 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.

### **5.2.7 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 (рег.№ 133-1204 от 12 апреля 2005 г).