

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения
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:

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

АВТОРЫ:

д. м. н., профессор Амвросьева Т. В.; к. б. н. Поклонская Н. В.;

Казинец О. Н.; Богуш З. Ф.; Лозюк С. К.; Шилова Ю. А.; Аринович А. С.

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.

Показания к применению: клинические симптомы кишечной инфекции с пищевым путем передачи

Противопоказания отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ И РЕАКТИВОВ

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 гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции;

холодильник (от +2°C до +8°C) с морозильной камерой (от -16°C до -20°C);

центрифуга рефрижераторная (1-5 тыс. об./мин.);

центрифуга – вортекс;

гомогенизатор механический;

дозаторы автоматические лабораторные переменного объема: 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;

инструменты лабораторные (пинцеты, ножницы, скальпель, совок для взвешивания);

колбы, стаканы пластиковые (50 мл, 100 мл, 250 мл);

комплект капилляров для секвенирования;

микропробирки для проведения ПЦР, соответствующие типу используемого термоциклера (0,2 мл, 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 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-х замещенный ($Na_3C_6H_5O_7$);

натрий хлористый (NaCl);

3% перекись водорода;

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.-4.2016 г.);

97,4 % хлороформ.

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

1 ТЕХНОЛОГИЯ РЕАЛИЗАЦИИ 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 том числе 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 проведении исследований в рамках выборочных и внеплановых проверок ПП анализируется на предмет выявления в ней норовирусов (НоВ), аденовирусов (АдВ), ротавирусов (РВ), энтеровирусов (ЭВ).

При исследованиях 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)

2 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).

3 ПОЛУЧЕНИЕ ПРОБ ПП И ПРОБОПОДГОТОВКА

Расфасованную воду напитки отбирают в объеме не менее 3 л (Гигиенический норматив «Требования безопасности питьевой воды, расфасованной в емкости, утв. Пост. МЗ РБ от 15.12.2015 г. №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 программы 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 проведения анализа, которое для расфасованной воды и напитков составляет 3 л., для жидкой ПП – 400 мл; для полутвердой, 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 часов). Каждую пробу регистрируют в рабочем журнале. Хранение проб допускается при температуре плюс 2-8⁰С не более 24 часов или при температуре минус 16-18⁰С 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 минус 16-20⁰ С для последующего использования при необходимости проведения молекулярного типирования выявленного вируса.

4 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. Проведение исследований осуществляют в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР исследования 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», утв. Пост. МЗ РБ от 06.01.2017 г. №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 – 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.

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 проводятся 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 г.).

Для исследования в референс-лабораторию передают аликвоты проб элюатов, хранившихся после сортировки при температуре минус 16-20°С. Транспортирование осуществляют при температуре плюс 2-8°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.

4.1 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 диэтилпиروкарбонатом 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.

5 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, твердой ПП – 50 г.