

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения

Главный государственный санитарный врач

Республики Беларусь

И.В. Гаевский

13.06.2013

Регистрационный № 002-0213

**ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ВИРУСНЫХ  
ИНФЕКЦИЙ С ВОДНЫМ И ПИЩЕВЫМ ПУТЯМИ ПЕРЕДАЧИ**

инструкция по применению

Учреждение-разработчик: ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»

Авторы: Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Хило А.Н., Гринкевич П.И.,  
Богуш З.Ф., Казинец О.Н.

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, врачей-гигиенистов, врачей-инфекционистов.

## **1 Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники**

1. Автоклав;
2. Автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл;
3. Анализатор иммуноферментный или мультискан;
4. Вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз);
5. ДНК-маркер 50-1000 пар оснований;
6. Ионномер (рН-121);
7. Источник тока для электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
8. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия);
9. Камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
10. Ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой;
11. Набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
12. Набор для выделения РНК/ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе;
13. Набор для обратной транскрипции: обратная транскриптаза и буфер для обратной транскрипции;
14. Набор реагентов для амплификации кДНК ротавирусов;
15. Набор реагентов для амплификации кДНК норовирусов человека 1 и 2 геногрупп;
16. Набор реагентов для амплификации кДНК астровирусов;
17. Набор реагентов для амплификации ДНК аденовирусов;
18. Набор реагентов для амплификации кДНК энтеровирусов;
19. Наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой “RNAse, DNAse free” (0,5 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл);
20. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки 0,5; 0,2 мл, с маркировкой “RNAse, DNAse free”);
21. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ);
22. Пипетки стеклянные на 1, 5, 10 мл;
23. Посуда лабораторная (колбы, пробирки);
24. Препарат для ДНК-деконтаминации (ДП-2Т или аналоги);

25. Система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
26. Система для автоматической промывки планшетов;
27. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты;
28. Тест-система для выявления антигенов ротавирусов человека методом ИФА;
29. Тест-система для выявления антигенов норовирусов человека 1 и 2 геногрупп методом ИФА;
30. Тест-система для выявления антигенов астровирусов человека методом ИФА;
31. Тест-система для выявления антигенов аденовирусов 40 и 41 типов методом ИФА;
32. Тест-система для выявления антигенов энтеровирусов методом ИФА;
33. Термостат, регулируемый до  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;
34. Термоциклер;
35. Твердотельный термостат (для пробирок типа «Эппендорф»);
36. Трансиллюминатор (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
37. Хлороформ (х ч) ТУ 2631-02-11291058-96;
38. Центрифуга рефрижераторная на 1-5 тыс. об./мин;
39. Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф»);
40. Центрифуга-вортекс;
41. Холодильник-морозильник ( $-18 - -20^{\circ}\text{C}$ ,  $+4 - +8^{\circ}\text{C}$ );
42. Этиловый спирт ректифицированный (этанол, ГОСТ 5962-67).

## **2 Показания к проведению лабораторного контроля за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи**

### **2.1 Задачи лабораторного контроля за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи**

Основными задачами лабораторного контроля за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи являются:

- идентификация этиологического агента инфекции;
- идентификация источника заражения, путей и факторов передачи инфекции.

### **2.2 Планирование организации исследований.**

Лабораторные исследования клинического материала, проб воды и ПП на предмет выявления и идентификации вирусных патогенов проводят в плановом порядке, внепланово и в рамках производственного контроля, который осуществляют только для проб воды и ПП.

*Плановые исследования* проводят в течение определённого времени для получения информации о циркуляции возбудителей среди населения, включая

среду его обитания, если предполагается, что эффективность эпидемиологического надзора на данной территории недостаточна (или требуются дополнительные данные) и группа населения, в отношении которой предпринимается надзор, находится в следующих условиях:

- имеются сведения о недавней циркуляции в обследуемой группе населения вируса, вызвавшего групповую или вспышечную заболеваемость;
- имеется риск заноса «новых» для данной территории высокопатогенных вирусов из других стран (территорий);
- есть необходимость в проведении специальных исследований с научными целями.

*Внеплановые вирусологические исследования* материалов проводятся в случае непредвиденных изменений санитарно-эпидемиологической ситуации на определённой территории в условиях, когда можно предположить существование водного и/или пищевого путей передачи вирусных инфекций.

К таким условиям относится подъём заболеваемости вирусными инфекциями с водным и пищевым путями передачи, возникновение очага групповой заболеваемости из 2 или более пациентов, при наличии информации о:

- употреблении заболевшими одних и тех же продуктов питания или питьевой воды из одного источника;
- контакте заболевших с водой одних и тех же открытых водоемов, плавательных бассейнов и других водных объектов;
- генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных у заболевших пациентов и в пробах употребляемой воды или пищи;
- авариях или нарушениях в системах водоснабжения или канализации, в результате которых может произойти интенсивное биологическое загрязнение поверхностных и подземных водоисточников, а также питьевой воды;
- нарушениях в технологическом и производственном процессах при приготовлении ПП и воды, расфасованной в емкости.

Для проведения плановых и внеплановых лабораторных исследований составляется план их проведения, который должен включать:

- продолжительность и сроки отбора проб;
- характеристику группы населения, в отношении которой предпринимается исследование (численность населения, состав и т.д.);
- распределение ответственности за сбор, обработку, исследование проб;
- наличие нормативных и методических документов, материального обеспечения для проведения исследований, протоколов проведения исследований;
- наличие обученного персонала и контроля качественного проведения исследований;
- определение порядка отчётности о результатах исследования;

– определение возможностей для своевременной пересылки выделенных штаммов вирусов (или РНК-, ДНК-позитивных материалов) для подтверждения и дальнейшего изучения в установленном порядке.

Исследования проб воды и ПП в рамках *производственного контроля* проводятся по специально разработанной рабочей программе с целью санитарно-вирусологической оценки производственных (технологических) процессов в соответствии с действующими нормативными и инструктивно-методическими документами.

### **3 Объекты исследований.**

Объектами исследований являются:

- клинический материал (фекалии, рвотные массы, сыворотка крови, носоглоточные смывы, спинномозговая жидкость, аутопсийный материал);
- пробы воды (питьевой, открытых водоемов, плавательных бассейнов и аквапарков, сточной);
- пробы ПП;
- вирусы (норовирусы I и II геногруппы, энтеровирусы, ротавирусы, аденовирусы 40 и 41 типов, астровирусы, вирусы гепатита А).

### **4 Отбор проб для проведения исследований, пробоподготовка, сортировка.**

#### **4.1 Пробы клинического материала**

Для идентификации этиологического агента острых кишечных инфекций (ОКИ) проводят исследования проб стула и/или рвотных масс, полученных от пациентов в течение 24-48 часов с момента появления клинических симптомов инфекции. Пробоподготовку осуществляют в соответствии с инструкцией «Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций» (рег. № 111-1210 от 24.12.2010, раздел 4).

При наличии у пациентов клинических симптомов энтеровирусной инфекции и соответствующих эпидемиологических данных отбор проб (фекалии, рвотные массы, сыворотка крови, носоглоточные смывы, спинномозговая жидкость, аутопсийный материал) и их обработку проводят в соответствии с «Инструкцией по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций» (рег. № 133-1204 от 12.04.2005, разделы 3-5).

#### **4.2 Пробы санитарно-вирусологического материала (ПП, вода)**

Отбор проб производят в самые ранние, насколько это возможно, сроки на основании результатов предварительного эпидемиологического расследования при наличии указаний на водный/пищевой путь передачи инфекции. Их исследования чаще выполняют после исследований клинического материала.

##### **4.2.1 Пробы ПП**

Вирусная контаминация продуктов питания может реализовываться 2 путями:

- через контаминированную вирусами воду (фрукты, овощи, морепродукты, молочные продукты, пищевой лед, бутилированная вода и напитки, мороженое и т.д.);

– через загрязненные руки вирусносителя в процессе ее приготовления (салаты, бутерброды, торты, пирожные и т.д.).

При подозрении на реализацию пищевого пути распространения инфекций отбирают образцы именно тех продуктов, которые употребляли в пищу заболевшие. При отсутствии такой возможности, отбирают образцы из той же партии ПП, контейнера и т.д.

Отбор проб ПП, их обработка для экстракции и концентрирования вирусов осуществляют в соответствии с требованиями, изложенными в инструкции по применению «Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателями» (рег. № 166-1208 от 11.06.2009, разделы 5.2.2, 5.2.3).

Пробы ПП транспортируют и хранят при температуре 4<sup>0</sup>С не более 24 часов. При необходимости хранения в течение более длительного времени, они подвергаются замораживанию при -18<sup>0</sup>С. Не допускается повторное замораживание-оттаивание образцов.

#### **4.2.2 Пробы воды**

Отбор проб воды разного вида пользования, улавливание вирусов и их концентрирование осуществляют в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег. № 134-1204 от 12.04.2005, разделы 5.3.1, 6.6, 6.7) и инструкцией по применению «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов» (рег. № 112-1210 от 02.12.2010, раздел 4.3.1).

#### **4.3 Сортировка проб**

После проведения пробоподготовки каждый образец клинического и санитарно-вирусологического материала делят на 2 равные аликвоты, одну из которых используют для идентификации содержащегося в нем этиологического агента инфекции, а другую хранят при -20<sup>0</sup>С для использования на этапе получения доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных в клиническом и санитарно-вирусологическом материалах.

### **5 Лабораторная диагностики вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи**

Диагностика вирусных инфекций носит комплексный характер и предусматривает оценку клиники заболевания совместно с данными эпидемиологического анамнеза и результатами лабораторных исследований

5.1 Диагноз ОКИ при спорадической заболеваемости устанавливается на основании клинических, эпидемиологических данных и обязательного лабораторного подтверждения.

5.2 В очагах регистрации групповой заболеваемости ОКИ лабораторное обследование для установления этиологии инфекции проводится:

- при регистрации очага в организованных группах до 15 заболевших - у всех лиц, при количестве заболевших от 15 до 30 - не менее чем у 10 лиц, при большем количестве заболевших – не менее чем у 20% из них;
- при ограничении очага по территориальному принципу до 30 заболевших - у всех лиц, при количестве заболевших от 30 до 100 - не менее чем у 30 лиц, при большем количестве заболевших - 20% из них.

5.3 Критерием установления роли возбудителя как основного этиологического агента в очаге групповой заболеваемости служит его выявление не менее чем у 30% обследованных в соответствии с п.5.2.

5.4 В очаге групповой заболеваемости (в соответствии с пп. 5.2 и 5.3) допускается установление диагноза у части пострадавших на основании клинико-эпидемиологического анамнеза без лабораторного подтверждения.

5.5 Лабораторная диагностика для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи проводится в отношении следующих возбудителей:

- норовирусы I и II геногруппы;
- энтеровирусы;
- ротавирусы;
- аденовирусы 40 и 41 типов;
- астровирусы;
- вирус гепатита А.

5.6 Порядок и очередность проведения исследований в отношении различных возбудителей определяются на основании клинической картины заболевания. Изолированный синдром гастроэнтерита является показанием к проведению клинической диагностики в отношении норо-, рота- и астровирусов. Наиболее часто возбудителями вирусных инфекций с пищевым путем передачи являются норовирусы I и II геногруппы.

5.7 Методом выбора при проведении лабораторной диагностики для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи является ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции. При невозможности проведения исследований методом ПЦР для лабораторной диагностики могут быть использованы метод ИФА для выявления антигенов вирусов, или хроматографический экспресс-тест.

5.8 Лабораторная диагностика для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи в клиническом материале проводится в соответствии с требованиями инструкции по применению «Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций» № 111-1210 от 24.12.2010 и «Инструкции по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций» № 133-1204 от 12.04.2005.

## **6 Индикация и идентификация вирусной контаминации воды и ПП.**

6.1 Исследования сконцентрированных проб санитарно-вирусологического материала (воды, ПП) проводят после установления этиологии возникшей

инфекционной заболеваемости и осуществляют в отдельном боксовом помещении, в котором не проводились исследования клинического материала.

6.2 При наличии эпидемиологических или иных показаний на установление водного или пищевого пути передачи инфекции пробы воды или ПП анализируются на предмет выявления в них конкретного(ых) вирусного агента(тов), который(е) идентифицирован(ы) в качестве возбудителя(ей) возникшей инфекционной заболеваемости.

6.3 В зависимости от вида искомого вирусного патогена для выявления и идентификации вирусной контаминации воды и ПП могут быть использованы разные методы лабораторных исследований. Среди них наибольшее предпочтение отдается методам, основанным на амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР), в связи с их высокой чувствительностью, что обуславливает возможность детекции вирусных агентов при их традиционно низком содержании в воде и пище. Наиболее целесообразно использовать для исследования этих проб метод ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в связи с низким риском контаминации продуктами предыдущих реакций.

Использование других методов детекции вирусного материала в воде и ПП, например, ИФА и хроматографических тестов для выявления вирусных антигенов является менее предпочтительным в связи с недостаточной чувствительностью этих методов.

Для хорошо культивируемых в системе ин витро вирусов, в частности, энтеровирусов, одним из методов выбора может быть их выделение и последующая идентификация в культурах чувствительных клеток.

6.4 Обнаружение и идентификацию вирусов в сконцентрированных пробах вод разного вида пользования и ПП осуществляют в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег. № 134-1204 от 12.04.2005, разделы 5.3.3-5.3.5, 6.7), инструкцией по применению «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов» (рег. № 112-1210 от 02.12.2010, раздел 4.3.2-4.3.5), инструкцией по применению «Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателями» (рег. № 166-1208 от 11.06.2009 г., разделы 5.2.4- 5.2.7).

6.5 Все этапы лабораторных исследований для индикации идентификации вирусов-контаминантов воды и ПП проводят с использованием препаратов и диагностических тест-систем, зарегистрированных на территории Республики Беларусь и предназначенных для исследований внешнесредовых образцов.

## **7 Получение лабораторных доказательств в пользу водного или пищевого пути передачи вирусных инфекций.**

**7.1 Использование биоинформационных методов анализа для доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, обнаруженных в клиническом материале пациентов и в пробах воды и ПП.**

### **7.1.1 Получение фрагментов нуклеотидной последовательности вирусов, выявленных в клиническом материале пациентов, и в пробах окружающей среды.**

Первым этапом биоинформационного анализа является получение фрагментов нуклеотидной последовательности вирусов, выявленных в клиническом материале пациентов, и вирусов-контаминантов воды и ПП. Получение фрагментов нуклеотидной последовательности проводят методом секвенирования. Для этого аликвоты проб клинического и санитарно-вирусологического материалов, хранившиеся после сортировки при  $-20^{\circ}\text{C}$ , передают в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Транспортировку образцов осуществляют, используя холодовую цепь при температуре  $4-8^{\circ}\text{C}$ . В сопроводительных документах должно быть указаны следующие данные:

- вид клинического/санитарно-вирусологического материала;
- дата отбора проб;
- вид пробоподготовки;
- тип идентифицированного вирусного агента.

Результаты секвенирования получают в течение 3-14 сут, и пересылают затем по электронной почте в организацию, из которой поступили образцы для секвенирования, в виде файлов в формате \*.txt, каждый из которых содержит фрагмент нуклеотидной последовательности вируса, обнаруженного в 1 исследуемой пробе.

### **7.1.2 Проведение биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей**

После получения результата секвенирования проводят сравнение полученных последовательностей между собой и с нуклеотидными последовательностями вирусов того же типа, выделенных в тот же период времени на территории Республики Беларусь и в других странах (референсные нуклеотидные последовательности). Целью этого исследования является получение информации о степени сходства и близкородственности вирусов, содержащихся в исследуемых пробах. Анализ проводят программой MEGA (версия 5.0 и выше). Эту программу скачивают с сайта <http://www.megasoftware.net> (программа является бесплатной для некоммерческого использования) и устанавливают на рабочий компьютер. Далее осуществляют выравнивание исследуемых последовательностей вирусов, полученных от пациентов, из проб окружающей среды (вода, пища) и последовательностей вирусов того же типа, выделенных в тот же период времени на территории Республики Беларусь и в других странах. Для этого следует:

1. Запустить программу MEGA.
2. Выбрать пункт меню «Alignment», в открывшемся списке выбрать «Alignment Explorer/Clustal».
3. В открывшемся диалоговом окне M4: Alignment Editor выбрать пункт «Create a new alignment» и нажать ОК.

4. В результате появляется диалоговое окно «Confirm», в котором предлагается выбрать тип выравниваемой последовательности («Are you building a DNA [Yes] sequence alignment (otherwise choose [No] for Protein)»? Следует нажать кнопку «Yes».
5. Появляется окно программы M5: Alignment Explorer.
6. В меню выбрать пункт «Edit» и в открывшемся списке команд выбрать «Insert Sequence From File».
7. Вставить последовательности из соответствующих файлов - содержащего исследуемые последовательности и последовательности вирусов, выбранных для сравнения.
8. Выбрать пункт меню «Edit», в открывшемся списке команд выбрать «Select All».
9. Выбрать пункт меню «Alignment», в открывшемся списке команд выбрать «Align by ClustalW».
10. В открывшемся диалоговом окне «M5: ClustalW parameters» нажать кнопку «OK» (настройки параметров выравнивания установлены по умолчанию).

В результате все исследуемые последовательности будут выровнены между собой. После этого удаляют неперекрывающиеся участки выровненных последовательностей, как показано на Рис. 1.

11. Для сохранения полученного выравнивания выбрать пункт меню «Data», в открывшемся списке команд выбрать «Export alignment» и «MEGA format». В результате выравнивание будет сохранено в файл \*.meg.

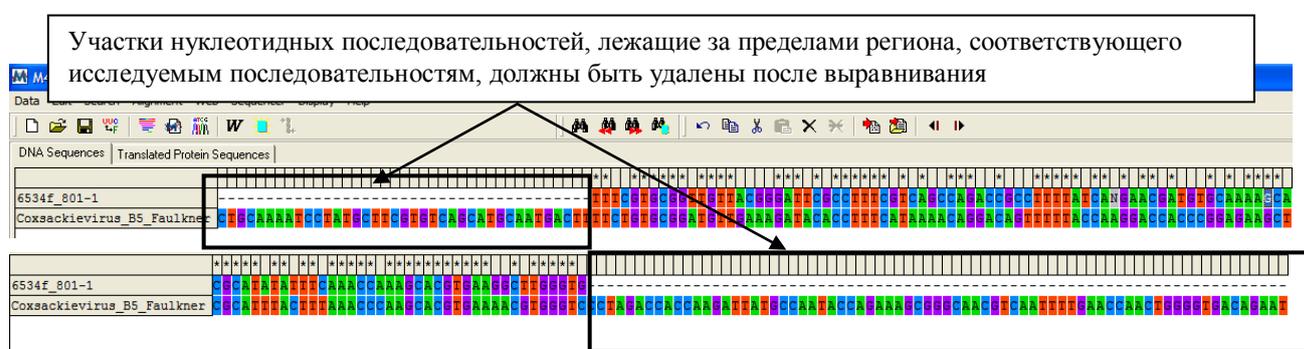


Рис. 1 Удаление неперекрывающихся участков в выровненных последовательностях

12. Закрыть программу M5: Alignment Explorer. После этого появится окно с вопросом, надо ли открыть сохраненный файл в MEGA. После утвердительного ответа сохраненный файл автоматически открывается программой MEGA и доступен для дальнейшего анализа.

13. Для установления доли нуклеотидных различий между последовательностями выбрать пункт меню «Distances». В открывшемся списке команд выбрать «Compute Pairwise...».

19. Для подсчета доли различий между последовательностями необходимо выбрать следующие настройки:

→Estimate variance:

Variance estimation method: Analytical method;  
→Substitution model:  
Substitution type: nucleotide;  
Model/Method: p-distance;  
Substitution to include: d:Transitions+Transversions;  
→Rate and patterns:  
Rate among Sites: Uniform Rate;  
Pattern among Lineages: Same (Homogeneous);  
→Data subset to use:  
Gap/Missing Data: Complete Deletion;  
Codon Positions: 1<sup>st</sup>+2<sup>nd</sup>+3<sup>rd</sup>+noncoding.

20. Запустить программу подсчета, нажав кнопку «Compute» внизу экрана.

21. Результат появляется в новом окне в виде таблицы. Данные таблицы разделены по диагонали так, что в нижнем левом углу содержатся данные о долях нуклеотидных различий между последовательностями, а в правом верхнем – значения стандартной ошибки доли. Для удобства анализа все значения переводят в процентный формат, умножив их на 100%.

### **7.1.3 Анализ и интерпретация полученных результатов.**

Подтверждением пищевого/водного пути распространения вирусов является достоверно меньшая доля нуклеотидных различий между исследуемыми вирусами, обнаруженными у пациентов и в пробах воды и ПП, при сравнении их между собой, чем с референсными нуклеотидными последовательностями.

Пример: между нуклеотидной последовательностью А (норовирус выделен от пациента с гастроэнтеритом) и нуклеотидной последовательностью В (норовирус выделен из образца салата, который употреблял в пищу заболевший) доля нуклеотидных различий составляет  $0,4 \pm 0,4\%$ , тогда как при сравнении А и В с другими норовирусами того же генотипа, циркулировавшими в это же время в Республике Беларусь, минимальная доля различий составляет  $3,2 \pm 1,2\%$ . Так как  $0,4 \pm 0,4\%$  достоверно меньше, чем  $3,2 \pm 1,2\%$ , то полученный результат служит доказательством пищевого пути передачи норовируса, а источником инфекции являлся контаминированный вирусами салат. Таким образом, с помощью методов биоинформационного анализа удастся получить доказательства реализации пищевого/водного пути распространения инфекций и идентифицировать источник заражения.

### **7.1.4 Возможные проблемы при использовании биоинформационных методов анализа для установления водного/пищевого путей передачи вирусных инфекций.**

Наиболее частая проблема, препятствующая использованию биоинформационных методов анализа – низкое содержание нуклеиновых кислот возбудителя в пробах объектов окружающей среды, не позволяющее накопить достаточное количество ДНК-мишени для секвенирования. В такой ситуации, если вирусы-контаминанты являются культивируемыми (адено-, энтеровирусы), рекомендуется провести 3 пассажа исследуемого образца в культуре чувствительных клеток для накопления вируса. Если вирусы-

контаминанты относят к некультивируемым, или плохо культивируемым (рота-, норо-, астровирусы), низкое содержание вируса в пробах объектов окружающей среды является непреодолимым препятствием для их секвенирования. В таком случае лабораторно подтвержденное наличие вирусной контаминации объектов окружающей среды в совокупности с данными эпидемиологического расследования могут рассматриваться в качестве достаточных доказательств для установления водного/пищевого путей передачи вирусных инфекций.