

УДК 579.67(047.31)

Поступила в редакцию 31.07.2019

**Т.В. Амвросьева, д.м.н., профессор; О.Н. Казинец; Н.В. Поклонская, к.б.н.;
С.К. Лозюк; Ю.А. Шилова; Ю.Б. Колтунова**

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь*

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ И ОЦЕНКИ ЕЕ БЕЗОПАСНОСТИ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ

Аннотация. В статье представлены результаты изучения вирусной контаминации пищевой продукции (ПП) с использованием современных технологий и методов для индикации вирусологических рисков здоровью человека. Общая частота вирусного загрязнения исследованных проб ПП (n=403) составила 10,17 %. В перечень обнаруженных вирусных патогенов вошли ротавирусы (1,99 %), норовирусы (4,47 %), кишечных аденовирусы (3,47 %), энтеровирусы (0,25 %). Наибольшее число положительных проб выявлено в овощах (6,2 %), меньше в салатах (1,5 %) и мясных изделиях (1,0 %), в остальных видах ПП частота детекции генетического материала кишечных вирусов колебалась в пределах 0,25–0,5 %. Разработанный алгоритм индикации вирусной контаминации и оценки вирусологической безопасности ПП для здоровья потребителей в ходе апробации в полевых условиях показал свою высокую результативность и эффективность в использовании. Его дальнейшее широкое внедрение в практику будет способствовать профилактике пищевых вирусных инфекций и улучшению эпидемиологического благополучия населения страны в целом.

Ключевые слова: пищевые продукты, вирусы, санитарно-вирусологический контроль, полимеразная цепная реакция

**T.V. Amvrosieva, O.N. Kazinets, N.V. Paklonskaya, S.K. Laziuk, Yu. A. Shilova,
Yu. B. Kaltunova**

The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

MODERN APPROACHES AND METHODS OF SOLVING THE PROBLEM OF STUDYING VIRAL CONTAMINATION OF FOOD PRODUCTS AND EVALUATING ITS HEALTH HAZARDS

Abstract. The article presents the results of food products viral control gained by using modern technologies and methods for indicating epidemiological risks to human health. The overall frequency of viral contamination of the analyzed samples of food products (n = 403) was 10.17 %. Positive samples for rotaviruses (1.99 %), noroviruses (4.47 %), intestinal adenoviruses (3.47 %), and enteroviruses (0.25 %) were detected. The highest number of positive samples was found in vegetables (6.2 %), less in salads (1.5 %) and meat products (1.0 %). In the rest of the analyzed products the frequency of the viral genetic material detection varied from 0.25 % to 0.5 %. The developed algorithm for indicating viral contamination and food virological health safety assessment showed its high effectiveness and efficiency in field testing. Being further introduced, the algorithm will help food infection prevention and improve the epidemiological state of the population as a whole.

Keywords: food products, viruses, sanitary and viral control, polymerase chain reaction

Введение. Безопасность продовольственного сырья и пищевой продукции (ПП) для здоровья населения представляет собой важную проблему общественного здравоохранения. В большинстве стран, где имеются системы отчетности в отношении кишечных вирусных заболеваний, связанных с пищевым фактором, отмечается тенденция их увеличения на протяжении последних пятнадцати лет. Данная проблема приобретает сегодня все большую значимость вследствие усиливающихся торговых и культурных связей между государствами и континентами.

Вирусы, попадающие в организм человека с контаминированной ПП, включают широкий круг патогенов и, в первую очередь, кишечных, таких как норовирусы (NoV), ротавирусы (РВ), энтеровирусы (ЭВ), кишечные аденовирусы (АдВ), астровирусы (АсВ), вирусы гепатита А (ВГА) и Е (ВГЕ). Именно данная группа инфекционных агентов чаще всего ассоциируется с так называемыми пищевыми вирусными инфекциями [1, 2, 3].

Попадая в организм человека алиментарным путем, болезнетворные вирусы могут вызывать развитие широкого спектра инфекционных заболеваний и серьезных патологий. На практике пищевые вирусные инфекции чаще регистрируются как острые гастроэнтериты (ОГЭ) или острые кишечные инфекции (ОКИ). Особое внимание заслуживает рост вспышек вирусных инфекций, ассоциируемых с пищевым путем передачи. Так, согласно информации Центра по контролю за заболеваниями (CDC) из числа зарегистрированных в США в последние годы пищевых вспышек 48 % имели вирусную этиологию [4, 5]. По мировой статистике среди доминирующих возбудителей вирусных вспышек пищевого происхождения первое место занимают NoV. В соответствии с данными европейской системы наблюдений (Food-borne viruses in Europe network) NoV явились этиологической причиной более 85 % вспышек небактериальных ОГЭ [6, 7].

Следует отметить, что одним из важных аспектов контроля безопасности ПП в отношении вирусных патогенов является разработка соответствующей методологии и методов индикации их вирусной контаминации. Имеющиеся в мировой литературе на эту тему данные ограничены и разрознены [2, 3, 7]. Остается открытым ряд вопросов. Среди них наиболее актуальным является выбор репрезентативных контролируемых показателей вирусного загрязнения ПП и их оценка. В этой связи определенный интерес представляет методология индикации и управления вирусологическими рисками.

Выбор адекватных подходов, технологических приемов, схем и алгоритмов исследований, а также критериев оценки степени опасности ПП, контаминированных вирусами с учетом их инфицирующих доз, имеет важное значение для оценки вероятности заражения человека.

Целью настоящей работы была разработка современных технологий и методов контроля вирусной контаминации ПП для индикации вирусологических рисков здоровью человека.

Материалы и методы. За период с мая 2016 г. по апрель 2019 г. из торговой сети и по эпидемиологическим показаниям отобрано и исследовано 403 пробы ПП, которые включали овощи (помидоры, кабачки, морковь, капусту белокачанную, капусту пекинскую, редис, огурцы, баклажаны, перец), ягоды замороженные (черника, брусника), фрукты (хурма, бананы, виноград), зелень (укроп, зеленый лук, салат листовой, петрушка), молочные продукты (йогурт, творог, молоко, сырки творожные, сыр), кулинарные продукты (салаты многокомпонентные), мясные изделия, морепродукты, расфасованные воды.

Пробоподготовку образцов ПП осуществляли в соответствии с ранее разработанной инструкцией по применению [8].

Контроль стадий пробоподготовки проводили с использованием контрольных образцов, представляющих собой псевдовирусные частицы, состоящие из диагностически значимых фрагментов РНК ЭВ или NoV, упакованных в белковую оболочку бактериофага MS2 (РНПЦ ЭМ). Основным свойством этих контрольных образцов является способность имитировать РНК-содержащий безоболочечный вирус и тем самым контролировать все этапы санитарно-вирусологического исследования ПП, начиная с этапа сорбции-элюции, и заканчивая диагностической ПЦР.

Выделение РНК/ДНК вирусных частиц из проб проводили с помощью набора «Рибопреп», производства «Амплисенс» (г.Москва).

Индикацию РНК/ДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции.

Постановку реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «РЕВЕРТА», производства «Амплисенс» (Россия).

Аmplификацию полученной в реакции обратной транскрипции кДНК осуществляли с использованием тест-систем для выявления NoV II геногруппы методом ПЦР «NoV II-ПЦР» и для выявления ЭВ методом ПЦР «ЭВ-ПЦР», производства РНПЦЭМ (г. Минск).

Выявление ДНК/РНК АдВ группы F, РВ группы А и АсВ проводили с помощью набора «Амплисенс ОКИ скрин-FL».

Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах RotorGene 3000 и 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия) и CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad, США).

Для накопления фрагментов генома вируса с целью секвенирования использовали Diamant HF ДНК полимеразу, 2,5x реакционный буфер «HF», содержащий 0,5 мМ смесь дезоксирибонуклеотидов

и 5 мМ раствор $MgCl_2$ (ГНУ «Институт микробиологии НАН Б», Беларусь). Амплификацию осуществляли с применением взятых из литературных источников праймеров и зондов, синтезированных фирмой PrimeTech (Беларусь).

Реакцию секвенирования проводили с помощью набора «GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit» (Beckman coulter, США). Детекцию результатов осуществляли на приборе SEQ 8 000 (Beckman coulter, США), анализ результатов — в MEGA6 [9].

Молекулярное типирование выполняли с помощью программного продукта Norovirus Genotyping Tool Version 1.0, доступного для свободного использования в режиме онлайн по адресу <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>, и BLAST, открытого для свободного использования по адресу <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Результаты и обсуждение. Как показывает мировая практика, к наиболее эпидемически значимым ПП в отношении контаминации кишечными вирусами (КВ) относятся морепродукты, овощи, ягоды, фрукты, салаты, зелень. Эти группы ПП наиболее часто контаминируются первичным путем, т.е. в процессе выращивания, а также использовании для полива сточных вод и контаминированных удобрений, что нередко становится причиной вспышек вирусных инфекций [1, 3]. Однако чаще всего имеет место вторичный путь контаминации ПП, который реализуется при их транспортировке, упаковке или через грязные руки вирусоносителей (поваров, раздатчиков, продавцов) [2, 10]. Обычно во время вспышек заболеваемости присоединяется контактно-бытовой путь трансмиссии возбудителей в сочетании с передачей инфекции от человека к человеку или через загрязнение объектов окружающей среды. КВ имеют низкую инфекционную дозу, хорошо выживают во внешней среде, куда выделяются в изобилии с фекалиями. Все эти факторы способствуют их широкому распространению в популяции человека и возникновению вспышек кишечных вирусных инфекций, которые происходят чаще в закрытых коллективах, таких как школы, колледжи, учреждения для ухода за детьми, воинские части, дома для престарелых, а также у путешественников на круизных лайнерах, в отелях, лагерях [1, 2, 3]. Несмотря на имеющиеся достижения в области санитарной вирусологии ПП в ряде стран, чаще всего расследование причин пищевых инфекций в очагах проводится исходя из данных классического эпидобследования и результатов диагностических исследований у заболевших пациентов.

В настоящей работе проведены исследования различных групп ПП ($n=403$), отобранных из торговой сети, а также доставляемых в лабораторию по направлениям врачей-эпидемиологов во время регистрации групповой заболеваемости КВИ. Исследовались пробы различной консистенции (жидкие, твердые и полутвердые). Все ПП подвергались пробоподготовке [8], последующая индикация вирусных РНК/ДНК осуществлялась методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Данный метод детекции генетического материала вирусов — контаминантов ПП в настоящее время является наиболее чувствительным, позволяющим выявлять единичные вирусные частицы в исследуемых образцах. В перечень детектируемых вирусных патогенов вошли НоВ, ЭВ, РВ, АдВ и АсВ, которые являются наиболее эпидемически значимыми среди КВ с алиментарным путем передачи. Кроме этого, в мясной ПП определяли ВГЕ, учитывая повышенный риск ее контаминации данным возбудителем [7].

Разработанный нами и апробированный на практике алгоритм исследования ПП представлен на рис. 1. Принимая во внимание данные наших предыдущих исследований, в структуре анализируемой ПП преобладали овощи (21,59 %) и салаты (21,84 %) — как пища повышенного риска контаминации [11]. В перечень другой исследуемой ПП вошли ягоды и фрукты (17,12 %), зелень (13,4 %), молочные продукты (12,16 %), мясные изделия (10,17 %), морепродукты (1,99 %), расфасованные воды (1,74 %).

Общая частота обнаружения вирусного материала в проанализированных пробах составила 10,17 %. Среди выявленных вирусов-контаминантов оказались РВ, НоВ, кишечные АдВ, ЭВ. При этом АсВ и ВГЕ не были обнаружены. Наибольшее число положительных проб выявлено в овощах (6,2 %). В салатах и мясных изделиях контаминация составила 1,5 % и 1,0 %, соответственно. В остальной ПП частота детекции генетического материала КВ колебалась в пределах 0,25–0,5 %. Лидирующее положение среди выявленных вирусных агентов занимали НоВ (4,47 %) и АдВ (3,47 %). Обнаружение РВ и ЭВ составило 1,99 и 0,25 %, соответственно.

Наиболее разнообразный спектр вирусов-контаминантов выявлен в овощной продукции, в которой удалось обнаружить НоВ, РВ и АдВ. В зелени, морепродуктах ягодах и молочных продуктах были обнаружены единичные пробы с частотой 0,25–0,5 %. В молочных продуктах выявлена единичная положительная на НоВ, в зелени — две положительные пробы в отношении РВ. В расфасованных водах положительные пробы не были выявлены.

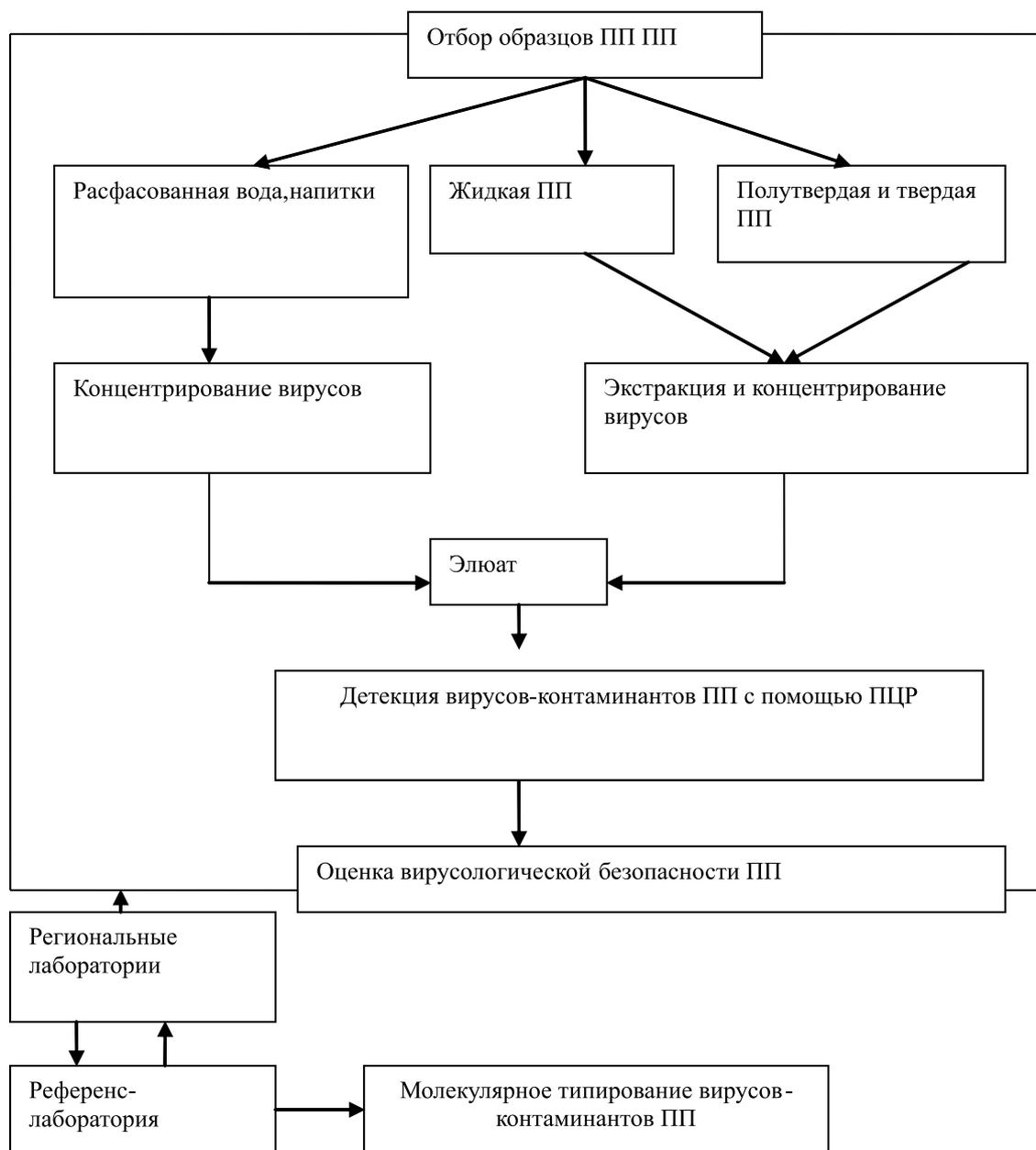


Рис. 1. Алгоритм индикации вирусной контаминации и оценки вирусологической безопасности ПП

Для оценки вирусологической безопасности ПП проводили учет экспозиции обнаруженных вирусных агентов, которая соответствовала уровню циклов их амплификации (Ст). Установлено, что они были в пределах 36–39 циклов, что соответствовало примерно одной вирусной частице. Учитывая тот факт, что КВ являются чрезвычайно контагиозными и для развития инфекции, по мнению ведущих специалистов, достаточно одной вирусной частицы, можно сделать заключение о том, что ПП, в которых выявлены РНК/ДНК вирусов являются потенциально опасными.

Проведение молекулярно-эпидемиологических исследований с целью установления путей и факторов передачи пищевых вирусных инфекций является заключительным важным этапом санитарно-вирусологических исследований ПП. Получение нуклеотидных последовательностей вирусов-контаминантов и их сравнение с вирусами, циркулирующими среди населения, является одной из задач проводимого санитарно-вирусологического контроля. Данные исследования в нашей стране пока возможно осуществлять только на базе референс — лаборатории РНПЦ ЭМ. Для их выполнения из содержащих НоВ проб, была выделена вирусная РНК и накоплены фрагменты гена РНК-зависимой

РНК-полимеразы с целью дальнейшего секвенирования и молекулярного типирования. Так как вирусный материал в контаминированных ПП содержится в очень малой концентрации, и в наших исследованиях она была в пределах 1–10 ГЭ на мл (34,21–35,87 циклов амплификации), то накопить фрагменты ДНК для проведения секвенирования удалось не для всех выявленных НоВ. Идентифицированные нуклеотидные последовательности НоВ депонированы в международный GenBank.

По результатам проведенного молекулярного типирования установлено, что проанализированные НоВ принадлежали ко II геногруппе, которой отводится доминирующая роль в возникновении групповой и спорадической заболеваемости норовирусной инфекцией в человеческой популяции (табл. 1).

Таблица 1. Результаты молекулярного типирования НоВ, выявленных в ПП

№ п/п	Наименование ПП	Тип вируса-контаминанта	Результат генотипирования	Номер депонента в GenBank
1	Овощи (кабачок)	Норовирус	GII.4 2006b Den Haag	KY214375
2	Овощи (кабачок)	Норовирус	GII.4 2006b Den Haag	KY214376
3	Молочный продукт (творог)	НоВ	GII.P16 /GII.2	MF 163173
4	Кабачок	НоВ	GII.P16	MH423864
5	Капуста белокачанная	НоВ	GII.Pe.	MH423865

Обнаруженный в кабачках НоВ принадлежал к генотипу GII.4 2006b Den Haag, который ранее циркулировал среди населения нашей страны и был этиологическим агентом регистрируемой заболеваемости ОГЭ. Идентифицированный в пробе капусты белокачанной НоВ принадлежал к генотипу GII.Pe, который впервые был выявлен на территории Республики Беларусь в 2015 году и широко распространен на сегодняшний день. Генотипы GII.P16 и GII.P16 /GII.2, обнаруженные в кабачке и молочном продукте, соответственно, являются довольно новыми для нашей страны. Впервые они были зарегистрированы на территории нашей страны в 2016 году у пациентов с ОКИ и явились этиологическими агентами вспышек норовирусной инфекции в закрытом коллективе.

Анализируя полученные результаты с позиции оценки вирусологического риска, можно утверждать, что данные образцы ПП представляли потенциальную эпидемическую опасность для здоровья их потребителей. Учитывая крайне низкую инфицирующую дозу НоВ и их высокую устойчивость в среде технологического окружения, в этом случае очевиден реальный риск реализации пищевого пути передачи возбудителя.

Итогом проведенной работы стала разработка инструкции по применению, содержащей алгоритм индикации вирусной контаминации и оценки вирусологической безопасности пищевой продукции [12]. Данный алгоритм может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику инфекций с пищевым путем передачи.

Заключение. В результате проведенных исследований разработан современный алгоритм индикации вирусной контаминации и оценки безопасности ПП в отношении вирусных инфекций человека, который в ходе апробации в полевых условиях показал свою высокую результативность и эффективность использования. Его дальнейшее широкое внедрение в практику будет способствовать профилактике пищевых вирусных инфекций и улучшению эпидемиологического благополучия населения страны в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koopmans, M. Foodborne viruses: an emerging problem / M. Koopmans, E. Duizer // *Int. J. Food Microbiol.* — 2004. — Vol. 90. — P. 23–41.
2. Appleton, H. Control of food-borne viruses. Health and the food-chain / H. Appleton // *Br. Med. Bull.* — 2000. — Vol. 56. — P. 172–183.
3. Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature / P. Vasickova [et al.] // *Vet. Med. Czech.* — 2005. — Vol. 50, N 3. — P. 89–104.
4. Carter, M. J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection / M. J. Carter // *J. Appl. Microbiol.* — 2005. — Vol. 98. — P. 1354–1380.
5. CDC. Vital signs: foodborne norovirus outbreaks — United States, 2009–2012 / A. J. Hall [et al.] // *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* — 2014. — Vol. 63. — P. 491–495.

6. Disease burden of foodborne pathogens in The Netherlands, 2009 / A. H. Havelaar [et al.] // *Int. J. Food Microbiol.* — 2012. — Vol.156. — P. 231–238.
7. Todd, E. C. Viruses of foodborne origin: a review / E. C. Todd, J. D. Greig // *Virus Adaptation and Treatment.* — 2015. — Vol. 7. — P. 25-45. DOI: <https://doi.org/10.2147/VAAT.S50108>.
8. Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.02.2009, рег. № 166-1208. — Минск, 2009. — 21 с.
9. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* — 2013. — Vol. 30. — P. 2725–2729. DOI: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197).
10. Sources of calicivirus contamination in foodborne outbreaks in Denmark, 2005–2011 — the role of the asymptomatic food handler / K. T. Franck [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2015. — Vol. 211. — P. 563–570.
11. Современные методические подходы и технологии в области санитарной вирусологии пищевых продуктов для индикации эпидемических рисков здоровью человека / Т. В. Амвросьева [и др.] // *Донозология.* — 2018. — № 2. — С.15–18.
12. Алгоритм индикации и оценки вирусологической безопасности пищевой продукции: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 19.12.2018, рег. № 010-1118 [Электронный ресурс]. — Минск: РНПЦЭМ, 2019. — Режим доступа: <http://med.by/methods/pdf/010-1118>. — Дата доступа: 23.07.2019.