

3. Gevorkyan E.S., Minasyan S.M., Adamyan Ts.I., Dayan A.V., Ksadzhikeyan N.N. Dynamics of the integrated characteristics of heart rate variability and psychophysiological parameters of students under the conditions of daily and weekly academic loads. *Hum. Physiol.* 2006; 32 (4): 423–8.
4. Osadchaya E.A. Materials to adapt to the learning process and biological indicators of health of students of various psychophysiological groups. *Valeologiya.* 2003, (4): 16–21. (in Russian)
5. Nikolaevskiy V.V. *Aromoterapy [Aromaterapiya]*. Moscow: Meditsina; 2000. (in Russian)
6. Shutova S.V. *Non-pharmacological Optimization of Brain Function of Students in Adapting to the Conditions of Training in High School. Monograph [Nemedikamentoznaya optimizatsiya funktsiy mozga u studentov pri adaptatsii k usloviyam obucheniya v vuzе. Monografiya]*. Tambov: Biznes-Nauka-Obshchestvo; 2012. (in Russian)
7. Lee M.S., Choi J., Posadzki P., Ernst E. Aromatherapy for health care: an overview of systematic reviews. *Maturitas.* 2012; 71 (3): 257–60.
8. Butje A., Repede E., Shattell M.M. Healing scents: an overview of clinical aromatherapy for emotional distress. *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health. Serv.* 2008; 46 (10): 46–52.
9. Gorst V.R. *Functional Features Individually-Typological Differences of Students. Monograph [Funktsional'nye kharakteristiki individual'notipologicheskikh razlichiy studentov. Monografiya]*. Astrakhan': Astrakhanskiy universitet; 2009. (in Russian)
10. Braden R., Reichow S., Halm M.A. The use of the essential oil lavandin to reduce preoperative anxiety in surgical patients. *J. Perianesth. Nurs.* 2009; 24 (6): 348–55.
11. Holm L., Fitzmaurice L. Emergency department waiting room stress: can music or aromatherapy improve anxiety scores? *Pediatr. Emerg. Care.* 2008; 24 (12): 836–8.
12. Popov V.M., Sentyabrev N.N., Mandrikov V.B. Dynamics of the functional state of the organism and the characteristics of the anaerobic working capacity sprinter under the influence of essential oils. *Uchenye zapiski universiteta im. P.F. Lesgafta.* 2011; (5): 96–100. (in Russian)
13. Biryukova E.A., Chuyan E.N. Heart rate in subjects with type raznum autonomic regulation under the influence of controlled breathing with individually selected frequency. *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo.* 2010; 23 (62): 34–44. (in Russian)
14. Sentyabrev N.N., Karaulov V.V., Kaydalin V.S., Kamchatnikov A.G. *Essential Oils in Sports Practice. Monograph [Efirnye masla v sportivnoy praktike. Monografiya]*. Volgograd: VGAFK; 2009. (in Russian)
15. Bitko S.N., Okipnyak V.G. Effect of prolonged exposure to lavender essential oil on the performance of game activity and adaptation to physical activity in basketball. *Vestnik Cherkasskogo universiteta.* 2002; (39): 9–14. (in Russian)

Поступила 02.06.16
Принята к печати 04.10.16

Гигиена питания

© ЕФИМОЧКИНА Н.Р., 2017

УДК 614.31-078

Ефимочкина Н.Р.

ВИРУСНЫЕ КОНТАМИНАНТЫ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И МЕТОДЫ ИХ ОБНАРУЖЕНИЯ

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» ФАНО России, 109240, Москва

Обобщены данные об эпидемиологии и свойствах нескольких групп возбудителей вирусных заболеваний, фактически или потенциально способных к реализации пищевого пути передачи инфекции (норовирусы, вирусы гепатита А и Е, аденовирусы, астровирусы, ротавирусы, вирусы птичьего и свиного гриппа). Упомянуты наиболее известные массивные вспышки энтеровирусных инфекций в странах Юго-Восточной Азии, в Индии, Китае, в Европе и других регионах. Показана значимость продукции животного и растительного происхождения, а также водных биоресурсов в качестве факторов передачи инфекций вирусной этиологии. Анализ существующих методов детекции вирусных контаминантов пищи показывает, что проведение анализа требует подбора методов экстракции и концентрирования проб. Важным критерием пригодности используемого варианта экстракции должна быть его совместимость с требованиями молекулярных методов детекции вирусов – минимальное число этапов обработки проб химическими реагентами, нейтральный уровень pH, сохранение антигенных свойств и интактной вирусной РНК возбудителя. С учетом генетического многообразия пищевых вирусов для их обнаружения требуется подбор эффективных сочетаний нескольких видов праймеров, зондов и условий амплификации. Методы экспресс-контроля должны быть основаны на применении наиболее современных видов анализа, включая мультипраймерную ПЦР, гибридизацию на нуклеотидных микрочипах, иммунохроматографию и ИФА. До внедрения в практику должны быть проведены внутренние и внешние сравнительные испытания экспресс-методов для подтверждения их разрешающей способности и межлабораторной воспроизводимости. Применение комплексных методик анализа пищевых вирусов, создание на их базе системы контроля, включающей порядок и организацию исследований, сбор и обмен информацией компетентными организациями в режиме реального времени, способны значимо повысить эффективность расследования вспышек вирусных инфекций с пищевым путем передачи, снизить риск перекрестной контаминации на пищевых предприятиях, сократить вероятность использования в производственном процессе сырья, загрязненного вирусными патогенами, и повысить безопасность соответствующей продукции.

Ключевые слова: обзор; пищевые вирусные патогены; норовирусы; вирусы гепатита А и Е; аденовирусы; астровирусы; ротавирусы; ротавирусы; вирусы гриппа А/Н1N1; методы выделения и детекции.

Для цитирования: Ефимочкина Н.Р. Вирусные контаминанты пищевых продуктов и методы их обнаружения. *Гигиена и санитария.* 2017; 96(6): 576–584. DOI: <http://dx.doi.org/10.1882/0016-9900-2017-96-6-576-584>

Efimochkina N.R.

VIRAL CONTAMINANTS OF FOOD PRODUCTS AND METHODS OF THEIR DETECTION

Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety, Moscow, 109240, Russian Federation

There were summarized data on epidemiology and the properties of several groups of viral diseases, actually or potentially capable of implementation of the food route of transmission of infection (noroviruses, hepatitis viruses A and E, adenoviruses, astroviruses, rotaviruses, “avian” and “swine” flu viruses). There were mentioned most well-

known massive outbreaks of enterovirus infections in countries of South-East Asia, India, China, Europe and other regions. The importance of products of animal and vegetable origin, and also water biological resources as factors of transmission of viral infections are shown. The analysis of available methods of detection of foodborne viruses shows the execution of analysis to demand for matching of methods for extraction and concentration of samples. An important criterion of the suitability of the used variant of the extraction must be its compatibility with demands for molecular methods - the minimum number of stages of sample processing with chemical reagents, neutral pH, preservation of antigenic properties and the intact viral RNA of pathogen. With consideration of the genetic diversity of food viruses, their detection requires the assortment of effective combinations of several types of primers, probes and conditions for the amplification. The methods of the rapid control should be based on the use of most modern types of analysis, including multi-primer PCR, hybridization on nucleotide microchips, immunochromatography and ELISA. Prior to the introduction into the practice, internal and external comparative tests of express methods should be executed to confirm their resolution and interlaboratory reproducibility. The introduction of comprehensive methods for the analysis of food viruses, the creation of a monitoring system on their basis, including the order and organization of research, the collection and exchange of information by competent organizations in real time regimen, can significantly increase the effectiveness of investigating outbreaks of viral infections with food transmission, reduce the risk of cross contamination in food enterprises, reduce the likelihood of using raw materials contaminated with viral pathogens in the production process, and improve the safety of food products

Key words: review; foodborne viral pathogens; noroviruses; hepatitis A and E viruses; adenoviruses; astroviruses; sapoviruses; rotaviruses; viruses A/H1N1; methods of isolation and detection

For citation: Efimochkina N.R. Viral contaminants of food products and methods of their detection. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2017; 96(6): 576-584. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.1882/0016-9900-2017-96-6-576-584>

For correspondence: Natalya R. Efimochkina, MD, PhD, DSci., leading researcher of the Laboratory of biosafety and nutrimicrobiome analysis of the Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety, Moscow, 109240, Russian Federation. E-mail: karlikanova@ion.ru.

Information about authors:

Efimochkina N.R., <http://orcid.org/0000-0002-9071-0326>

Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: 15 June 2016

Accepted: 04 October 2016

Среди огромного количества популяций микроорганизмов – контаминантов пищевых продуктов выделяют приоритетные по эпидемиологической значимости группы вирусных патогенов, которые на современном этапе приобретают особое значение и требуют пересмотра установленных представлений о структуре заболеваемости, свойствах возбудителей и мерах по предупреждению массовых инфекционных заболеваний.

Потенциальная опасность передачи вирусных инфекций через пищевые продукты лишь с недавних пор стала предметом пристального внимания во всем мире в связи с накоплением новых данных об этиологии и патогенезе острых кишечных заболеваний, созданием высокоинформативных методических подходов к изучению структуры и свойств вирусов, появлением широкомасштабных вспышек опасных инфекций с неустановленным возбудителем и выделением новых пандемических эмерджентных штаммов.

В отличие от бактериальных патогенов вирусные контаминанты не могут развиваться вне организма хозяина, а потому пищевые продукты принимают участие лишь в трансмиссии возбудителя. При эпидемиологических расследованиях инфекционных вирусных заболеваний пища длительное время не рассматривалась в качестве фактора передачи и не была объектом исследования на наличие вирусов. Ситуация кардинально изменилась в последние десятилетия в связи с развитием молекулярной диагностики и появлением новых научно обоснованных сведений о геноме и структуре вирусов, их роли в возникновении массовых вспышек заболеваний с пищевым путем передачи.

В настоящее время в группу пищевых вирусных патогенов включают норовирусы, вирусы гепатита А и Е, аденовирусы, астровирусы, саповирусы, ротавирусы, вирусы птичьего (*avian influenza virus*) и свиного гриппа (*A/H1N1*) и прионы (*slow viral diseases*).

В пищевой микробиологии наиболее изучены два вида патогенных вирусов, вызывающих заболевания у человека, – вирусы гепатита А и норовирусы (типа *Norwalk*). Оба они гаплоидные

и содержат одноцепочечную РНК. Вирусные частицы гепатита А представляют собой мелкие многогранные образования 30 нм в диаметре, нить РНК которых связана с белковой оболочкой капсидом. В целом изучение свойств вирусов – возбудителей пищевых инфекций базируется на определении размера и морфологии вириона, типа нуклеиновых кислот ДНК или РНК, их структуры, особенностей воспроизводства вирусного генома, наличия и типа капсида либо суперкапсида, антигенных свойств и др. (табл. 1).

Эти группы вирусов не имеют суперкапсидных оболочек, диаметр варьирует от 27 до 80 нм, геном большинства из них состоит из 6,8–7,7 тыс. нуклеотидов, наибольшим размером характеризуются аденовирусы и ротавирусы (36 и 18,5 kb соответственно). Они состоят в основном из одноцепочечной РНК и капсида с кубическим типом симметрии (икосаэдральным). Геном аденовирусов представлен двухспиральной линейной молекулой ДНК.

Ниже приведена краткая характеристика основных групп пищевых вирусов.

Норовирусы (Norwalk-like viruses)

Норовирусы (*NoVs*) признаны новым эмерджентным возбудителем заболеваний с пищевым путем передачи, который вызывает большее количество вспышек, чем все другие известные бактериальные, вирусные и протозойные возбудители вместе взятые [1]. В связи с высокой контагиозностью, низкой инфицирующей дозой и способностью персистировать во внешней среде они классифицируются как потенциальные биологические агенты (ПБА) – объекты биотерроризма группы Б.

Название норовирусов (*Norwalk virus*) произошло от вспышки гастроэнтерита 1968 г. в начальной школе г. Норволк штата Огайо в США. Штаммы, выделенные при этой вспышке, стали прототипом для целой группы под названием “*Norwalk-like viruses*”. Они также назывались по географической локализации вызываемых вспышек, например “Гавайи вирус”, “Бристоль вирус”, “Минерва вирус”. В дальнейшем норовирусы было предложено именовать по формальной схеме: вид инфекции/род вируса/геногруппа/наименование вируса/место выделения штамма/год детекции/страна.

В США считают, что норовирусы служат главной причиной вирусных гастроэнтеритов, при этом заболеваемость достига-

Для корреспонденции: Ефимочкина Наталья Рамазановна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биобезопасности и анализа нутримикробиома ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Москва. E-mail: karlikanova@ion.ru

Свойства некоторых родов вирусов – контаминантов пищи

Свойства	Аденовирусы	Астровирусы	Вирус гепатита А	Вирус гепатита Е	Норовирусы	Ротавирусы
Капсид	Икосаэдральный	Сферический	Икосаэдральный	Икосаэдральный	Икосаэдральный	Икосаэдральный
Диаметр, нм	65–80	28–30	27–32	27–34	27–40	70–75
Геном	ds ДНК	ss РНК	ss РНК	ss РНК	ss РНК	ds РНК
Размер, тыс. нуклеотидов	36	6,8	7,5	7,3	7,7	18,5
Структура	Линейная	Линейная	Линейная	Линейная	Линейная	Сегментированная
Полярность	Не применимо	Положительная	Положительная	Положительная	Положительная	Не применимо
Цитопатические эффекты	+	+	±	-	-	±
Репликация в клетках хозяина	Ядро	Цитоплазма	Цитоплазма	Цитоплазма	Цитоплазма	Цитоплазма
Инкубационный период	2–15 дней	2–4 дня	15–45 дней	2–8 нед	10–51 ч	11 ч – 6 дней
Длительность заболевания	–11 дней	< 4 дней	≤ 5 мес	≤ 8 нед	1–2 дня	5 дней
Выделение с фекалиями	Нет данных	1 нед	≤ 5 мес	≤ 50 дней	2 нед	≤ 2 нед

ет 23 млн случаев ежегодно [2]; в общей структуре пищевых инфекций удельный вес норовирусных вспышек составляет 30–50%. В 2000 г. на круизных судах было зарегистрировано несколько вспышек, при этом свыше 1700 человек пострадали [3]. В Англии и Уэльсе из 1,5 тыс. вспышек пищевых отравлений свыше 5% были вызваны норовирусами и преимущественно связаны с употреблением фруктов и овощей [4]. Более ранняя вспышка произошла в Австралии в 1978 г., пострадали 2 тыс. человек в результате поедания зараженных устриц [5].

Инфекции, вызываемые норовирусами (НВИ), характеризуются коротким инкубационным периодом и клиническими симптомами, свойственными для большинства кишечных вирусов: сильной рвотой, тошнотой, диареей, спазмами, ознобом, миалгией и головной болью.

НВИ передаются в первую очередь фекально-оральным путем или непосредственно от человека к человеку, а также через контаминированную пищу и воду. Вирус может существовать в течение нескольких дней на различных поверхностях, в том числе на одежде, кожных покровах, оборудовании и других предметах, контактирующих с носителями инфекта. Воздушно-капельный путь передачи связан с присутствием вируса в рвотных массах и играет существенную роль в загрязнении среды, особенно в замкнутых коллективах и помещениях, например на пассажирских судах, в отелях, клиниках, военных казармах, детских лагерях и др.

Норовирусные вспышки часто бывают связаны с употреблением инфицированной сырой пищи и готовых к употреблению продуктов, зараженных путем вторичной контаминации при контакте с персоналом предприятий, где готовится пища, или от случайных вирусоносителей. Из других источников инфицирования наиболее известны питьевая вода, ирригационные системы полива фруктов и овощей, а также зараженные в акваториях моллюски и другие морепродукты [6, 7].

Инфекции, вызываемые норовирусами, – это антропонозные острые заболевания с убиквитарным распространением и высокой естественной восприимчивостью людей всех возрастов; при вспышках заболевают от 20 до 90% людей, контактировавших с возбудителем и подвергшихся риску заражения. Учитывая высокую контагиозность норовирусов, санитарно-гигиенические меры следует осуществлять в строгом соответствии с действующими правилами для предупреждения распространения острых кишечных инфекций.

Официальная регистрация норовирусной инфекции в Российской Федерации введена с 2009 г. По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году», к 2014 г. показатели заболеваемости НВИ выросли в 10 раз (с 0,9 до 8,91 на 100 тыс. населения), прирост заболеваемости в сравнении с 2013 г. составил 21,4%, доля заболеваний среди детей до 14 лет в 2014 г. составила 80%.

Вирусы гепатита А и Е (Hepatitis A and E viruses)

Вирусные гепатиты представляют собой группу нозологически самостоятельных заболеваний печени, вызываемых вируса-

ми, которые, обладая избирательной гепатотропностью, инфицируют преимущественно гепатоциты печеночной паренхимы.

Вирус гепатита А (HAV) – единственный представитель рода *Hepatovirus* в составе семейства *Picornaviridae*. Гепатит А, известный в России как болезнь Боткина, – это антропонозная вирусная инфекция с фекально-оральным механизмом передачи. Возбудитель передается через зараженную воду, пищу и контактно-бытовым путем, чему способствуют устойчивость вируса во внешней среде и высокая восприимчивость к нему человека. HAV инактивируется при кипячении в течение 5 мин, под воздействием хлора в дозе 0,5–1 мг/л, при pH 7,0 выживает в течение 30 мин и более, что позволяет ему сохраняться определенное время в водопроводной воде; устойчив к воздействию низких температур, эфира, кислот и формальдегида.

В отличие от других энтеровирусов HAV не размножается в эпителиальных клетках слизистой оболочки кишечника, а сразу транспортируется с венозной кровью в печень, т. е. кишечная локализация вируса практически отсутствует, а пищеварительный тракт служит лишь резервуаром, куда он попадает после репликации в печени [8].

В странах с низким санитарным уровнем инфицирование населения происходит обычно в раннем детстве и протекает в основном бессимптомно, формируя пожизненный иммунитет. В социально благополучных зонах первичному инфицированию чаще подвергаются взрослые 15–25 лет, хотя гепатит А считается преимущественно «детской» инфекцией, поражая в большинстве случаев школьников начальных классов.

Заболевание может протекать как спорадически, так и в форме вспышек с охватом больших групп населения. Так, в 1988 г. в Шанхае (Китай) произошла массовая вспышка гепатита А с общим числом пострадавших более 300 тыс. человек. Фактором передачи вирусной инфекции были сырые моллюски. В США крупнейшая вспышка гепатита А была зарегистрирована в 2003 г., количество пострадавших 600 человек, с тремя летальными исходами. Источником отравления был импортный зеленый лук, используемый ресторанами фастфуда. В 2001 г. произошла вспышка в штате Массачусетс, связанная с употреблением сэндвичей, контаминированных работниками общественного питания (46 случаев). Всего в период с 1992 по 2001 г. в США зарегистрировано свыше 200 тыс. случаев гепатита А [9–11].

В России официальные данные о вирусных инфекциях с пищевым путем передачи, в том числе о гепатите А, традиционно включают в общий свод зарегистрированных заболеваний без указания источника инфекта (за исключением «водных» вспышек). По данным Роспотребнадзора, в 2013 г. в Российской Федерации наблюдался рост заболеваемости гепатитом А – с 5,46 на 100 тыс. населения в 2012 г. до 5,77 на 100 тыс. населения в 2013 г.; в 2014 г. этот показатель составил 7,19 на 100 тыс., было зарегистрировано 42 вспышки, пострадавших 570 человек, в том числе детей 56% [12].

Вирус гепатита Е (HEV) широко распространен во многих тропических и субтропических регионах, где санитарная инфраструктура не соответствует современным требованиям. Подобно

Заболевания, ассоциированные с аденовирусной инфекцией

Заболевания	Группы риска	Серотипы
Острые фибриллярные фарингиты	Дети, подростки	1–3, 5–7
Острые респираторные заболевания	Военнослужащие	3, 4, 7, 14, 16, 21
Пневмонии	Дети, подростки, военнослужащие	1–3, 4, 6, 7, 14, 16
Эпидемические кератоконъюнктивиты	Все группы	8–11, 13, 15, 17, 19, 20, 22–29, 37
Фолликулярные конъюнктивиты	Дети, подростки	3, 7
Гастроэнтериты, диареи	Дети, подростки	18, 31, 40, 41
Уринарные инфекции		34, 35
Заболевания кишечника	Больные после трансплантаций, ВИЧ-инфицированные	42–49
Гепатиты	Заклученные, иммунокомпромиссные	1, 2, 5

гепатиту А, инфекции *HEV* имеют типичные симптомы, включая желтуху, гепатомегалию, потемнение мочи, анорексию, диарею и рвоту. Обычно заболевают люди в возрасте 15–40 лет, дети болеют значительно реже, с латентно протекающей инфекцией. Отмечается повышенная чувствительность к *HEV* у беременных женщин, заболевание протекает с осложнениями, и частота летальных исходов достигает 20% [13, 14].

Вспышки гепатита Е зарегистрированы в Индии, Пакистане, Юго-Восточной Азии, Африке, Мексике, в среднеазиатских республиках и др. Первая вспышка гепатита Е с 30 тыс. пострадавших была зарегистрирована в Индии в 1955–1956 гг. Наиболее вероятный источник *HEV* – загрязненная фекалиями вода, особенно в периоды наводнений и сезонных ливневых дождей. В развитых странах вспышки гепатита Е, как правило, не возникают.

Механизм передачи гепатита Е в основном фекально-оральный, а также значительно реже – контактно-бытовой, рассматриваемый как самостоятельный фактор риска. Имеются сведения о том, что *HEV* – зоонозный вирус; он был обнаружен в печени и фекалиях свиней, в мясе лосей и диких кабанов, а потому трансмиссия от животных человеку признается в настоящее время потенциально возможной [15].

Ротавирусы (Rotaviruses)

Ротавирусная инфекция – это антропонозное острое инфекционное заболевание, которое характеризуется поражением пищеварительного тракта, общей интоксикацией, дегидратацией. Основные симптомы заболевания – тошнота, рвота, водная диарея. Большинство взрослых людей не чувствительны к ротавирусам. Болеют преимущественно дети в возрасте до 2 лет, пожилые и иммунокомпромиссные группы населения; летальность при ротавирусной инфекции не превышает 4%. Механизм передачи возбудителя фекально-оральный, пути передачи – водный, пищевой, бытовой [16].

Род *Rotavirus* входит в группу безоболочечных вирусов с сегментированной dsРНК, входящих в семейство *Reoviridae*. Будучи сферическими частицами размером 72 нм, ротавирусы названы так, потому что их икосаэдральный капсид при электронной микроскопии напоминает обод колеса (лат. *rota* – колесо). Ротавирусный капсид состоит из 3 концентрических белковых слоев, окружающих геном из 11 сегментов РНК общим размером 16–21 kb, в котором каждый сегмент кодирует один структурный или неструктурный белок.

Ротавирусы содержат гемагглютинины, в реакции связывания комплемента (РСК) они разделяются на несколько антигенных вариантов (G1–G4), устойчивы при кислых значениях pH к жирорастворителям, в объектах внешней среды сохраняют жизнеспособность от 10–15 дней до 1 мес, в фекалиях – до 7 мес.

Ротавирусы вследствие специфического строения РНК обладают высоким потенциалом к мутациям за счет обмена геномными сегментами (интрагенной рекомбинации) с другими близкородственными человеческими или животными штаммами. Мутантные штаммы и реассортанты образуют новые вирусные серотипы, генотипы или виды.

Основные пищевые объекты, в которых обнаруживают ротавирусы, – это мидии, устрицы, овощные салаты, ягоды и фрук-

ты, для исследования которых применяют в основном молекулярные методы RT-ПЦР, мультиплексной RT-ПЦР и RT-ПЦР в реальном времени.

Аденовирусы (Adenoviruses)

Частота возникновения аденовирусных гастроэнтеритов во всем мире колеблется от 1,5 до 12%, их считают 2-й по значимости группой возбудителей детских диарей (после ротавирусов). За возникновение пищевых гастроэнтеритов ответственны отдельные серотипы аденовирусов; всего насчитывают свыше 50 серотипов, объединенных в 6 серогрупп (А, В, С, D, Е, F). В этиологии детских гастроэнтеритов наибольшую роль играют серотипы 31, 40 и 41. С двумя последними связывают от 5 до 20% госпитализаций больных диареей в развивающихся странах [17]. Наряду с гастроэнтеритами аденовирусы ассоциируются с возникновением респираторных инфекций, конъюнктивитов, циститов и других заболеваний (табл. 2 [18]).

При гастроэнтеритах основной путь передачи аденовирусов водный, возбудитель попадает в организм человека при купании в бассейнах, с недостаточно очищенной питьевой водой, с морепродуктами, контаминированными в акваториях, где они обитают или культивируются. В Европе зарегистрировано 3 вспышки мультивирусной этиологии при употреблении хлорированной питьевой воды, в которой были обнаружены несколько групп вирусов, включая аденовирусы [19].

Возможность трансмиссии аденовирусов через пищевые продукты установлена сравнительно недавно в связи с отравлениями морепродуктами. Оценка эпидемиологической роли аденовирусов в возникновении массовых заболеваний была затруднена в связи с асимптоматическим патогенезом инфекции и трудностями детекции возбудителя в пище и воде.

Исследования мидий и устриц в Испании показали высокую частоту контаминации моллюсков аденовирусами, которых обнаружили в 47% проб, наряду с возбудителями гепатита А (24% проб), другие энтеровирусы выявили в 19% образцов [20]. Поскольку данных об аденовирусных пищевых вспышках недостаточно, присутствие их в морепродуктах обычно считают индикатором контаминации другими кишечными вирусами. Высокая частота обнаружения аденовирусов связана с их устойчивостью к неблагоприятным воздействиям внешней среды, позволяющей сохраняться вне организма хозяина в течение длительного времени.

Астровирусы (Astroviruses)

Впервые были идентифицированы в 1975 г. при исследовании фекалий госпитализированных детей с диареей. Название они получили после проведенной криоэлектронной микроскопии, показавшей характерное строение вируса с 5–6-конечными звездоподобными выростами на поверхности (греч. *astron* – звезда). Такая особенность морфологии отличает астровирусы от других мелких округлых вирусных частиц, например калицивирусов.

Астровирусы относятся к числу наиболее устойчивых, они резистентны к физическим и химическим агентам, к воздействию хлороформа, поверхностно-активным детергентам, сохраняют инфицирующие свойства после нагрева при 60 °C в течение 5–10 мин, при глубоком замораживании (–85 °C) на протяжении 6–10 лет, частицы устойчивы в диапазоне pH от 3,0 до 10,0.

Экстремальная стабильность астровирусов к воздействию внешних факторов позволяет предположить, что общепринятые режимы пастеризации не полностью инактивируют вирусы. Более того, астровирусы способны персистировать в неблагоприятных условиях, сохраняясь на кожных покровах рук человека, в сухих фекальных массах животных и человека, в воде, на поверхности оборудования и инвентаря пищеблоков предприятий общественного питания, больниц, круизных судов и др. Крайне недостаточно информации о способности этих вирусов выживать в пищевых продуктах, а также об эффективности мойки и дезинфекции зараженных объектов.

Астровирусы передаются фекально-оральным или контактно-бытовым путем, через контаминированные пищевые продукты, при нарушении правил личной гигиены; возможно аэрозольное инфицирование пищи или контактирующих с ней поверхностей (посуда, инструментарий, оборудование), при рвоте и слюнотечении. Вода также важный источник передачи инфекции.

При возникновении заболевания астровирусы инфицируют слизистую тонкого кишечника, апоптоз эпителиальных клеток индуцирует диарею, при этом воспалительный ответ не является характерным для патогенеза астровирусных инфекций.

Астровирусная инфекция имеет убиквитарное распространение, вызывая около 10% спорадических диарейных заболеваний, и нередко протекает в виде вспышек. Наиболее подвержены риску заболевания дети до 4 лет, пожилые и иммунокомпromисные люди. Описаны массивные вспышки в Японии, Египте, Испании [21]. Тяжесть заболевания зависит от иммунного состояния организма, генетической предрасположенности и инфицирующей дозы возбудителя.

Саповирусы (*Sapporo viruses*)

Род *Sapovirus* входит в семейство *Caliciviridae* наряду с *Norovirus*, *Lagovirus* и *Vesivirus*. Саповирусы – этиологические агенты гастроэнтеритов, которые получили свое название после вспышки в Саппоро, Япония, в 1977 г. Они имеют типичную для калицивирусов морфологию, звездную структуру с размером частиц 41–46 нм в диаметре. Геном саповирусов представлен положительно заряженной одноцепочечной молекулой РНК размером 7,5 kb. Их делят на 5 геногрупп (GI–GY), среди которых GI, GII, GIY и GY известны как возбудители заболеваний человека, а саповирусы GIII обнаруживают при инфекциях свиней.

Желудочно-кишечные заболевания, вызываемые саповирусами, характеризуются острым началом, некровавой диареей или рвотой, могут сопровождаться тошнотой, абдоминальными болями, ознобом, лихорадкой, головной болью. Саповирусные инфекции регистрируют чаще у детей до 5 лет, реже у взрослых, наиболее часто заражение происходит в детских коллективах, начальных школах, садах, яслях. Дети раннего возраста (до 6 мес) особенно подвержены гастроэнтеритам саповирусной этиологии. Заболевания возникают спорадически и могут протекать бессимптомно или в тяжелой форме, требующей госпитализации.

Эпидемиологические исследования были проведены в Австралии, Канаде, Финляндии, Франции, Японии, Мексике, Монголии, Испании, Швеции, на Тайване, в Великобритании, США и Вьетнаме. Уровни заболеваемости в разных странах значительно варьировали и в основном зависели от условий обследования, точности и специфичности методов диагностики [22].

Вирусы птичьего гриппа (*Avian Influenza Virus*)

Вспышки эпидемий *avian influenza* (атипичной пневмонии, SARS), происходившие в Юго-Восточной Азии в 2003–2006 гг., вызванные так называемым вирусом птичьего гриппа, привлекли внимание мировой научной и медицинской общественности к проблеме появления эмерджентных и реэмерджентных вирусных штаммов и подтвердили особую эпидемиологическую опасность для человека новых зоонозных возбудителей вирусных инфекций.

Вирусы *influenza A* (AI) широко распространены в природе, до недавнего времени их обнаруживали более чем у 100 видов диких птиц 26 семейств, многие из них являются природным резервуаром AI. Инфекции домашней птицы вызывают 2 группы вирусов – малопатогенные (*LPAI*) и высокопатогенные (*HPAI*). *LPAI* поражают респираторные пути и кишечный тракт, при этом у большинства птиц заболевание протекает субклинически и сопровождается респираторными заболеваниями сред-

ней тяжести, снижением яйценоскости. *HPAI*-вирусы не только реплицируются в дыхательном и кишечном отделах, но проникают в эндотелиальные клетки и поражают расположенные рядом паренхиматозные ткани. Инфекция охватывает ряд других органов, включая центральную нервную систему; повреждения характеризуются множественными геморрагиями висцеральных органов и кожи, уровень летальности достигает 100%.

Среди высокопатогенных вариантов вирусов птичьего гриппа встречаются только субтипы *H5* и *H7*, хотя не все они относятся ко второй группе *HPAI*-вирусов. Считают, что они произошли из группы низкопатогенных *LPAI* в результате мутаций при размножении в организме домашней птицы. Факторы, вызвавшие мутации геномов от *LPAI* к *HPAI*, точно не определены, поскольку в отдельных случаях это происходило непосредственно после контакта диких птиц с домашними; в то же время низкопатогенные вирусы могли длительное время циркулировать среди домашних птиц без мутаций.

Выделение вирусов из организма птиц происходит через респираторный тракт или с фекалиями, заражение происходит на птицефермах и зависит от свойств штамма, восприимчивости птиц и ряда внешних факторов. Человек может заразиться как при прямом контакте с инфицированными птицами, так и воздушно-капельным путем, вдыхая загрязненные частицы пыли, соприкасаясь с кожей, перьями, фекалиями и кровью больных птиц [23].

Пищевой путь заражения людей достоверно не установлен, хотя он считается потенциально возможным при употреблении контаминированного мяса птицы.

Сообщения о вспышках атипичной пневмонии у людей появились начиная с 1997 г., когда в Гонконге заболели 18 человек, заразившись от кур высокопатогенным вирусом *A/H5N1* контактным путем, при этом 6 человек – с летальным исходом [24]. В 2003 г. вирусы того же антигенного субтипа вновь появились в Юго-Восточном Китае; циркулируя среди диких и домашних птиц, они начали распространяться в другие регионы Азии, попав к 2005–2006 гг. в Европу и Африку [25, 26]. Заболевание регистрировали в 32 странах Азии, Америки, Европы, Африки и Австралии. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщила о 8437 подтвержденных случаях SARS, в том числе 916 (10,9%) с летальным исходом. В 7 странах произошла местная передача возбудителя с формированием вторичных эпидемических очагов [27]. Особую опасность представлял факт преодоления вирусом межвидового барьера при передаче инфекции от птиц человеку.

Вирусы свиного гриппа (*A/H1N1*)

Возбудитель вируса гриппа *A/H1N1* (гриппа свиней) относится к вирусам семейства *Orthomyxoviridae*, роду *Influenzavirus A*, виду *Influenza A virus*. Внутри вида *Influenza A virus* выделяют 16 антигенных вариантов (субтипов) вируса по гемагглютинину (H) и 9 субтипов по нейраминидазе (N). Вирусы типа А имеют широкий круг хозяев среди птиц и млекопитающих, однако их естественными носителями и основным резервуаром в природе считаются различные перелетные птицы, у которых можно обнаружить вирусы гриппа А всех известных субтипов: из 144 комбинаций пар гемагглютинина и нейраминидазы в природе найдены 86 вариантов, из них 83 определены у птиц и животных и 3 – у человека: *H1N1*, *H2N2* и *H3N2*.

В соответствии с зооантропонозной теорией происхождения пандемических вирусов гриппа типа А новые высокопатогенные подтипы по своей структуре являются либо реассортантами вирусов гриппа человека и птиц (*H2N2*, *H3N2*), либо адаптированными к человеку зоонозными вирусами (в том числе вирус субтипа *H1N1*). Ретроспективный анализ подтверждает, что появление новых вариантов вируса гриппа А у человека вызывало пандемическое распространение инфекций в предыдущие годы. Самая сильная из известных пандемий, вызванная вирусом *H1N1*, произошла в 1918–1920 гг. В 1957–1958 гг. зарегистрирована пандемия, которая получила название «азиатский грипп» (*H2N2*), поскольку началась на Дальнем Востоке и быстро распространилась по всему миру. В 1968–1969 гг. возник средний по тяжести «гонконгский грипп», вызванный вирусом *H3N2*. Наиболее часто от вируса страдали пожилые люди старше 65 лет. В 1977–1978 гг. произошла относительно легкая по степени тяжести пандемия, названная «русским» гриппом, которая также

была вызвана вирусом субтипа *H1N1*. Эпидемия «гриппа свиной», начавшаяся в Мексике и США в апреле 2009 г., также была вызвана вирусом гриппа субтипа *H1N1*.

«Гриппом свиной» традиционно называют широко распространенное респираторное заболевание свиней, вызываемое вирусом субтипа *H1N1*, близким по антигенной структуре возбудителю гриппа человека. Вирусы *A/H1N1* впервые были выделены у свиней в 1930 г. [28]. После 1930 г. и до конца 90-х годов прошлого века этот возбудитель обнаруживался в основном в США у свиней и оставался относительно стабильным, при этом антигенные различия между классическим свиным гриппом и сезонным человеческим гриппом *H1* оставались весьма существенными. Однако наблюдавшееся в период 1990–1998 гг. постепенное распространение (дрейф) субтипа *H1* среди людей привело к тому, что свиньи стали для человека резервуаром этой группы вирусов, потенциально способных вызывать тяжелые респираторные заболевания и даже приводить к пандемии [29].

Спорадические случаи передачи вирусов свиного и птичьего гриппа людям неоднократно регистрировались в последние десятилетия. Несмотря на способность вызывать острый респираторный синдром и пневмонию, эти штаммы не обладали достаточными инфицирующими свойствами, для того чтобы передаваться далее от человека к человеку [30, 31].

Передача инфекции в основном осуществляется от других свиней, однако доказана возможность заражения животных от птиц и людей, при этом межвидовое распространение вирусов гриппа может приводить к появлению новых субтипов вируса гриппа А. Предполагают, что в организме свиней вирус также может периодически подвергаться мутациям (в частности, при перекрестном заражении свиней гриппом птиц), в результате чего становится возможной передача вируса от свиньи к человеку. Эта передача совершается, по-видимому, воздушно-капельным путем в условиях свиноферм, на которых не соблюдаются надлежащие санитарные нормы содержания животных, причем людьми, первично подвергаемыми заражению, становятся сотрудники этих свиноферм.

Однако в апреле 2009 г. впервые идентифицирован пандемический штамм вируса субтипа *A/H1N1*, содержащий уникальную комбинацию сегментов генов как от североамериканских, так и европейских линий свиного гриппа и ставший причиной распространения нового типа вируса в большинстве стран мира [29, 32]. Сравнительный анализ нового штамма *A/H1N1* и генетических близких к нему вариантов показал, что данный возбудитель мог циркулировать и до 2009 г. [33].

Научно подтвержденные данные о возможности передачи возбудителя *swine influenza A (H1N1)* через пищевые продукты и сырье, полученные от инфицированных свиней, в настоящее время отсутствуют. Однако результаты экспериментального заражения свиней показали, что интраназальное введение опытным животным нового штамма *A/H1N1/2009* на уровне 10^6 TCID₅₀ приводит к экскреции культуры (в назальных пробах обнаруживали через 1 сут после инфицирования), появлению типичных клинических признаков гриппа, активации клеточно- и гуморального иммунного ответа и передаче вируса другим животным при контакте [34]. Кроме того, у зараженных животных наблюдали обусловленную инфекцией диарею, чего не происходило при экспериментальном воспроизведении заболевания у свиней другими штаммами *A/H1N1* [35]. Показано, что животные были очень восприимчивы к новому штамму: признаки заболевания выявляли через 3 сут после введения у 75% инфицированных свиней и через 4–5 сут – у 100% инфицированных и стольких же контактных животных, что свидетельствует о высокой вероятности быстрого распространения нового варианта *A/H1N1* на свиноводческих фермах и соответственно потенциальной возможности загрязнения мясного сырья.

Быстрое и массивное распространение вирусов гриппа воздушно-капельным путем среди восприимчивого населения обусловлена в первую очередь свойствами возбудителя и его высокой концентрацией в аэрозольных каплях жидкости. Заражающие дозы вируса могут составлять от десятков до нескольких тысяч вирусных частиц.

Поэтому инфицирование человека через пищевые продукты может происходить в основном при контакте с аэрозольно-контаминированными поверхностями (столы, инвентарь, посуда,

разделочные доски и т.д.), а также при употреблении инфицированных контактным путем продуктов без достаточной термической обработки. Вирус гриппа свиной может сохранять жизнеспособность в течение 2 ч и более при поверхностной локализации, вирусы гриппа типа А могут выживать при температуре не выше 4 °С в течение 35 дней, при температуре 37 °С в течение 6 дней, замораживание и оттаивание не снижают вирулентности вируса.

По данным Центра контроля за заболеваемостью США (CDC), вирус гриппа А (*H1N1*) не передается через готовые продукты (в том числе изготовленные из свинины), подвергнутые термическому воздействию с применением традиционных способов приготовления пищи. Гибель возбудителя обеспечивается при достижении температуры во всех частях продукта не ниже 70 °С, т. е. при обычно применяемых способах термической обработки пищи.

Наиболее эффективными мерами предупреждения передачи инфекции через пищевые продукты на сегодняшний день признаются регулярная обработка (мытьё) рук, соблюдение правил санитарии и гигиены, в первую очередь на предприятиях общественного питания, обеспечение необходимых термических режимов обработки продуктов в процессе их приготовления.

Таким образом, мясо и продукты убоя, полученные от сельскохозяйственных животных (особенно свиней), зараженных высокопатогенным вирусом гриппа А, не прошедшие термическую обработку, могут представлять потенциальную опасность инфицирования как для людей, входящих в группу риска по заболеваемости (работники, связанные с производством и оборотом сырых мяса и продуктов из него), так и для потребителей.

Методы выявления вирусных контаминантов в пищевых продуктах

Для организации системы надзора за загрязненностью пищевыми вирусами продукции животного происхождения необходимы подбор и адаптация адекватных методов исследования.

В настоящее время изучение молекулярных и генетических характеристик эпидемических штаммов вирусов, циркулирующих во всем мире, служит основным звеном системы мониторинга эволюционных изменений в геноме вируса. Эти данные позволяют не только идентифицировать конкретные штаммы, но и изучить их вирулентные и репродуктивные свойства. Для оценки продуктов животноводства на загрязненность потенциально вирулентными для человека вирусами в первую очередь должны быть разработаны и апробированы методы экспресс-детекции антигенов и специфических РНК-последовательностей вирусов в продуктах, смывах и в биоматериалах.

Возможность прямого обнаружения вирусов в пищевых продуктах и сырье в значительной степени определяется эффективностью используемых методов выделения и концентрирования вирусных частиц, их пригодностью для анализа пищевых субстратов с различным физико-химическим составом, а также условиями отбора, хранения и доставки проб для исследования. Большинство применяемых для выявления пищевых вирусов методов разработано для тестирования инфицированных материалов от больных людей или животных, в первую очередь носоглоточных смывов, аспиратов, ректальных проб. Анализ существующих немногочисленных методов детекции вирусных контаминантов пищи (аденовирусы, астровирусы, норовирусы, вирусы гепатита А и Е, ротавирусы) показывает, что проведение таких исследований требует подбора методов экстракции и применения обязательных процедур концентрирования проб, без которых обнаружение возбудителя, зависящее от исходного количества вирусных единиц, может быть затруднительным или невозможным [21]. Наиболее часто используемые методики выделения вирусов из инфицированных пищевых продуктов и способы концентрирования представлены в табл. 3.

Один из наиболее важных критериев пригодности используемого варианта экстракции вирусов – его совместимость с требованиями молекулярно-генетических и иммунологических методов анализа, используемых для обнаружения и идентификации вирусов – минимальное число этапов обработки проб химическими реагентами или органическими растворителями, нейтральный уровень pH, возможность введения этапа иммуномагнитной сепарации, сохранение специфических антигенных свойств и интактной вирусной РНК возбудителя.

Методы выделения вирусного материала из пищевых продуктов

Метод	Реагенты, оборудование и принцип метода		Преимущества/ограничения методов
Гидроэкстракция	Гомогенизация пробы, диализ гомогенизированной пробы в пакете, погруженном в полиэтиленгликоль	Условия: выдержка при 4 °С в течение 18–24 ч, вирусные частицы остаются внутри пакета	Низкая открываемость проб; вирусы могут абсорбироваться на диализной мембране; токсичные вещества, присутствующие в пищевом субстрате, могут инактивировать вирусы при 24-часовом инкубировании
Ультрацентрифугирование	Гомогенизация пробы в глициновом буфере	Центрифугирование при 50000 rpm	Высокая стоимость ультрацентрифуги
Ультрафильтрация	Гомогенизация пробы, мембраны	Проба под давлением продавливается через мембрану, вирусы и макромолекулы остаются на фильтре	Хорошая открываемость проб; невозможно анализировать пробы густой и вязкой консистенции, засорение фильтра
Адсорбция на мембранных фильтрах	Гомогенизация пробы	Вирусные частицы остаются на положительно заряженном мембранном фильтре	Засорение фильтра
Осаждение (преципитация)	Гомогенизация пробы, ПЭГ	Добавление 8% ПЭГ, центрифугирование	Доступный недорогой метод, хорошая открываемость проб
Экстракция хлороформом + осаждение	Добавление смеси 10% триптон-соевого бульона и 0,05 М раствора глицина (pH 9,0); ПЭГ 6000	Гомогенизация в соотношении 1:7, осаждение ПЭГ	Проба после осаждения пригодна для исследования методом ОТ-ПЦР и на клеточных культурах

Примечание. ПЭГ – полиэтиленгликоль.

В Российской Федерации с 2015 г. проводится разработка ускоренных методов санитарно-вирусологических исследований пищевых продуктов и смывов с объектов окружающей среды на предприятиях пищевой промышленности, общественного питания и торговли. ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора при участии ФИЦ питания и биотехнологии подготовили проект методических указаний «Методика получения вирусосодержащих водных концентратов из образцов продуктов питания и смывов с предметов окружающей среды для исследований с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК)».

Методы прямого выделения и типирования вирусных культур сложны и многообразны, определяются целью проводимых исследований, спецификой вирусных частиц и областью применения результатов тестирования.

Классические методы выделения вирусных культур путем инокуляции стерильных куриных эмбрионов на сегодняшний день не признаны полностью адекватными для обнаружения большинства пищевых вирусов. Использование клеточных культур считается более эффективным для накопления определенных групп вирусов, таких как аденовирусы, астровирусы, ротавирусы и др. Обычно применяют линии клеток HeLa, HEp-2, CaCo2 и PLC/PRF/5, MA104, MDBK, PK-15 и ряд других систем, которые различаются между собой по чувствительности, специфичности и способности супрессировать близкие группы энтеровирусов. Клеточное культивирование проводится при исследовании как клинических образцов, так и других биологических объектов, в том числе пищевых продуктов, воды и смывов с оборудования, инвентаря, рук обслуживающего персонала. Тестирование некоторых пищевых продуктов имеет ограничения вследствие токсического действия ряда ингредиентов, входящих в их состав. Например, моллюски или загрязненная вода угнетают рост клеточных культур при исследовании на наличие астровирусов.

Для тестирования вирусов свиного гриппа используют преимущественно культуры красных кровяных клеток индейки, кур, морских свинок, поскольку они агглютинируют с *H1N1/2009*-субтипом [36]. Некоторые вирусы, например норовирусы, до сих пор не удается наращивать на культурах клеток, а потому они требуют других, более эффективных методов диагностики, включая иммуноферментный анализ, электронную микроскопию и генотипирование.

Среди недостатков культуральных методов – их длительность, трудоемкость, отсутствие в диагностических лабораториях специальных изолированных помещений и соответствующего оборудования для обеспечения биозащиты персонала.

К фенотипическим методам детекции вирусов относятся электронная микроскопия, PAGE-электрофенотипирование, иммуноферментный анализ, дот-иммуноблоттинг, иммунофлюоресцентные и иммунопероксидазные тесты, пассивная гемагглютинация, латексная агглютинация, дот-блот-гибридизация и др. Для конкретных групп и видов пищевых вирусов используют различные варианты и сочетания иммунологических методов в зависимости от свойств возбудителя, характера иммунного ответа и концентрации вирусных частиц в исследуемых образцах того или иного объекта.

Чувствительность и специфичность быстрых методов диагностики, основанных на иммунохроматографическом обнаружении антигенов и предназначенных для прямого выявления различных вирусов, детально изучают во многих научных центрах во всем мире. Для исследования контаминации вирусами пищевых продуктов эти методы должны быть адаптированы к различным биологическим объектам; их эффективность нужно оценивать с учетом возможности присутствия низкого количества вирусов на поверхности пищевых продуктов и в тканях животных.

Методы молекулярной диагностики

Основной инструмент детекции возбудителей вирусных инфекций в различных биологических объектах – методы молекулярной диагностики на основе применения ПЦР и технологий секвенирования генетического аппарата вирусов.

Для выявления и дифференциации пандемического штамма вируса гриппа *A (H1N1)A/Калифорния/4-2009* и близких ему вариантов в настоящее время в основном используют методы ПЦР-анализа. ВОЗ разработаны рекомендации по проведению диагностики вируса гриппа *A (H1N1)* с использованием нескольких вариантов на основе традиционной или *real-time* ПЦР [36], при этом важным условием достоверной идентификации признается необходимость детекции не менее 2 целевых последовательностей генома вируса. К ним относят в первую очередь консервативный сегмент, кодирующий матриксный белок вируса типа А, а также последовательности фрагментов генов гемагглютинина, специфичного для пандемического вируса *A (H1N1)/2009* и сезонного гриппа (*A H1/H3*).

В соответствии с рекомендациями ВОЗ и CDC алгоритм исследования на наличие пандемического вируса *A (H1N1)/2009* включает: проведение традиционной одношаговой или *real-time* ПЦР с обратной транскрипцией и флюоресцентной детекцией для обнаружения матриксного гена любых вирусов типа А; выявление гена пандемического субтипа (*H1N1)/2009* с помощью традиционной или *real-time* ОТ – ПЦР; проведение *real-time*

Методы выделения и детекции вирусов из пищевых продуктов

Продукты	Способ элюции	Концентрирование	Экстракция РНК	Чувствительность метода
Овощи	Триптон-соевый бульон	Фильтрация	QiAamp	50 ед. <i>HAV</i>
Устрицы	Глициновый буфер	Полиэтиленгликоль	QiAamp	1,2 ед. EV/г
	Хлороформ – бутанол	Полиэтиленгликоль	Протеиназа К, СТАВ	100 РТ-ПЦР ед. NoVs
	Хлороформ – бутанол	Ультрацентрифугирование	QiAamp	< 10 ² геномных копий
Мидии	Глициновый буфер	Ультрацентрифугирование	Гуанидинтиоцианат	–
Салат-латук	Щелочная среда	Полиэтиленгликоль	Trizol QIAshredder	50 РТ-ПЦР ед. NoVs
	Глицин – хлороформ – бутанол	Полиэтиленгликоль	RNEasy kit	10 РТ-ПЦР ед. NoVs
Зеленый лук	Щелочной триптон – фосфат-глициновый буфер	Полиэтиленгликоль	Тризол-хлороформ, магнитная сепарация	1 РТ-ПЦР ед. NoVs
Малина	Щелочной трис-глицин-мясной экстракт	Полиэтиленгликоль	RNEasy kit	10 ² РТ-ПЦР ед. NoVs
Земляника	Мясной экстракт	Ультрафильтрация	miniMAG	12 РТ-ПЦР ед. <i>HAV</i>

Примечание. ПЭГ – полиэтиленгликоль; СТАВ – цетилтриметиламмония бромид; *HAV* – вирус гепатита А; *NoVs* – норовирус.

ОТ-ПЦР на наличие генов сезонного гриппа А (*H1N1* и *H3N1*), а также гриппа птиц субтипов Н5, Н7 и Н9 (*avian influenza A*); секвенирование ПЦР-продуктов амплификации матричного гена типа А для дифференциации генов М пандемического и сезонного *H1N1* вирусов, а также для подтверждения происхождения нетипируемых штаммов.

В качестве рекомендуемых для использования коммерческих комплектов праймеров, реагентов и оборудования указаны QiAmp Viral RNA Mini kit, QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN), Invitrogen (NIMR), TaqMan Influenza A (H1N1) Assay Sets, детекторные системы для амплификации 7500 Real-time PCR (Applied Biosystems), Invitrogen SuperScript III Platinum one-step qRT-PCR System, LightCycler и ряд др.

Высокая дискриминационная способность молекулярных методов в отношении нового пандемического вируса гриппа подтверждена исследованиями *in vivo*. Сопоставление результатов ПЦР-анализа 65 образцов из респираторных органов заболевших, полученных в апреле-мае 2009 г. и выявившее 45 положительных проб, содержащих вирус А (*H1N1*)/2009, с данными культуральных методов показали высокую специфичность ОТ-ПЦР (92,3%) при дифференциации от сезонного гриппа А [37]. Количественная оценка метода ОТ-ПЦР в сравнении с прямым выделением культуры также подтвердила ее высокую чувствительность: число положительных ответов совпадало в 99,3% случаев как при больших исходных уровнях вирусной культуры в пробе (при числе циклов $Ct < 20$), так и при малых ($Ct > 30$).

Учитывая генетическое многообразие пищевых вирусов в составе отдельных групп (норовирусов, вирусов гепатита, свиного и птичьего гриппа), для обнаружения большинства из них требуется комплексный подход к выбору способов концентрирования, подбор эффективных сочетаний нескольких видов праймеров и условий амплификации. Характеристики нескольких модификаций метода РТ-ПЦР для детекции вирусов в пищевых продуктах приведены в табл. 4.

Кроме того, на примере норовирусов показаны некоторые сочетания эффективных праймеров и зондов для постановки ОТ-ПЦР в реальном времени (табл. 5).

С 2013 г. действует международный стандарт ISO/TS 15216-1¹, регламентирующий общие подходы к выделению и идентификации вирусов гепатита А и норовирусов в пищевых продуктах с использованием метода РТ-ПЦР.

¹ ISO/TS 15216-1 Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR. Part 1: Method for quantification.

Принимая во внимание существующую потенциальную угрозу передачи человеку вирусных инфекций через пищевые продукты или контактным путем через контаминированные поверхности оборудования, инвентаря и других объектов, необходимо создать систему контроля за загрязненностью этими возбудителями продукции животного происхождения на всех этапах оборота (ввоз из-за рубежа, производство и переработка, перевозка, хранение, реализация и утилизация, места сбыта продукции непромышленного изготовления), а также при осуществлении производственного контроля на предприятиях пищевой отрасли.

Внедрение комплексных методик анализа пищевых вирусов, создание на их базе системы контроля, включающей порядок и организацию исследований, сбор и обмен информацией компетентными организациями в режиме реального времени, может значительно повысить эффективность расследования вспышек вирусных инфекций с пищевым путем передачи, снизить риск перекрестной контаминации на пищевых предприятиях, сократить вероятность использования в производственном процессе сырья, загрязненного вирусными патогенами, и соответственно повысить безопасность готовой пищевой продукции.

Таблица 5

Некоторые real-time RT-ПЦР праймеры и зонды для детекции норовирусов в пище

Геногруппы	Праймеры и зонды	Последовательности 5'-3'	Библиография	
<i>NoV GI</i>	QNIF4(+)	CGCTGGATGCGATTCCAT	[38, 39]	
	NVILCR(-)	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC		
	NVGGIp(+)	FAM-TGGACAGGAGACCGCTACTC-TAMRA	[40]	
	JJVIF(+)	GCCATGTTCCGTTGGATG		
	JJVIR(-)	TCCTTAGACGCCATCATCAT		
	JJVIP(+)	FAM-TGTGGACAGGAGATCGCAATCTC-BHQ		
<i>NoV GII</i>	QNIF2(+)	ATGTTACGRITGGATGAGRTTCTCAGA	[41, 42]	
	COG2R(-)	TCGACGCCATCTTCATTCACA	[39]	
	QNIFs(+)	FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA		
	NV2LCF(+)	GAACCTATGTTTCAGATGGATG		
	NV2LCR(-)	TCGACGCCATCTTCATTCAC		
	NV2LCPr(+)	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA		
	JJV2F(+)	CAAGAGTCAATGTTTAGTGGATGAG		[40]
	COG2R(-)	TCGACGCATCTTCATTCACA		
RING2-TP(+)	FAM-AGCACGTGGGAGGGCCGATCG-TAMRA			
<i>NoV IY</i>	Mon 4F(+)	TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGC	[43]	
	Mon 4r(-)	TCGACGCCATCTTCATTCACA		
	Ring 4(+)	FAM-TGGGAGGGGATCGATCT-BHQ		

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Литература

(пп. 1–7, 9–11, 13–15, 17–25, 28–43 см. References)

8. Маянский А.Н. *Микробиология для врачей*. Нижний Новгород: НГМА; 1999.
12. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году». М.; 2015.
16. Черкасский Б.Л. *Инфекционные и паразитарные болезни человека. Справочник эпидемиолога*. М.: Медицинская газета; 1994.
26. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Топорков В.П., Куличенко А.Н., Караваева Т.Б., Шиянова А.Е. и др. Атипичная пневмония (SARS, ТОРС) и санитарная охрана территории. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2003; (1): 3–19.
27. Пяташина М.А. *Научные основы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия международных массовых мероприятий и их реализация на примере XXVII Всемирной летней универсиады в городе Казани*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. Саратов; 2015.

References

1. Schultz A.C., Vinje J., Nørring B. Noroviruses. In: Dongyou L., ed. *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2010: 75–90.
2. Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C. et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5 (5): 607–25.
3. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Outbreaks of gastroenteritis associated with noroviruses on en ships – United States. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2002; 51 (49): 1112–4.
4. Seymour I.J., Appleton H. Foodborne viruses and fresh produce. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91: 759–73.
5. Murphy A.M., Grohmann G.S., Christopher P.J. An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. *Med. J. Austr.* 1979; 2 (7): 329–33.
6. Hewitt J., Bell D., Simmons G.C., Rivera-Aban M., Wolf S., Greening G.E. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at a New Zealand ski resort. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (24): 7853–7.
7. Maunula L., Miettinen I.T., von Bonsdorff C.H. Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11 (11): 1716–21.
8. Mayanskiy A.N. *Microbiology for Physicians [Mikrobiologiya dlya vrachej]*. Nizhny Novgorod: NGMA; 1999. (in Russian)
9. Halliday M.L., Kang L.Y., Zhou T.K., Hu M.-D., Pan Q.-C., Fu T.-Y. et al. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.* 1991; 164 (5): 852–9.
10. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Foodborne transmission of hepatitis A – Massachusetts, 2001. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2003; 52 (24): 565–7.
11. Chancellor D.D., Tyagi S., Bazaco M.C. Bacvinskas S., Chancellor M.B., Dato V.M. et al. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. *J. Food Prot.* 2006; 69 (6): 1468–72.
12. State report “On the state sanitary and epidemiological well being of the population in the Russian Federation in 2014”. Moscow; 2015. (in Russian)
13. Kamar N., Dalton H.R., Abravanel F., Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27 (1): 116–38.
14. Fujiwara S., Yokokawa Y., Morino K., Hayasaka K., Kawabata M., Shimizu M. Chronic hepatitis E: a review of the literature. *J. Viral. Hepat.* 2014; 21 (2): 78–89.
15. Feagins A.R., Opiressing T., Guenette D.K., Halbur P.G., Meng X.-J. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J. Gen. Virol.* 2007; 88 (Pt. 3): 912–7.
16. Cherkasskiy B.L. *Infectious and Parasitic Human Diseases. Handbook of Epidemiology [Infektsionnye i parazitarnye bolezni cheloveka. Spravochnik epidemiologa]*. Moscow: Meditsinskaya gazeta; 1994. (in Russian)
17. Shinozaki T., Araki K., Fujita Y. Epidemiology of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children in the Tokyo area. *Scand. J. Infect. Dis.* 1991; 23 (5): 543–7.
18. Gerba C.P., Rodrigues R.A. Adenoviruses. In: Dongyou L., ed. *Molecular Detection of Foodborne Pathogen*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2010: 23–32.
19. Villena C., Gabrieli R., Pinto R.M., Guix S., Donia D., Buonomo E. et al. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiol. Infect.* 2003; 131 (3): 1105–10.
20. Muniain-Mujika I., Calvo M., Lucena F., Girones R. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 2003; 83 (1): 75–85.
21. Meleg E., Jakab F. Asrtoviruses. In: Dongyou L., ed. *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2010: 33–48.
22. Lopman B.A., Reacher M.H., Van Duinhoven Y., Hanon F.-X., Brown D., Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9 (1): 90–6.
23. Mumford E., Bishop J., Hendrickx S., Embarek P.B., Perdue M. Avian influenza H5N1: risks at the human-animal interface. *Food Nutr. Bull.* 2007; 28 (2, Suppl.): S357–63.
24. Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*. 1998; 279 (5349): 393–6.
25. Peiris J.S., Yu W.C., Leung C.W., Cheung C.Y., Ng W.F., Nicholls J.M. et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet*. 2004; 363 (9409): 617–9.
26. Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Toporkov V.P., Kulichenko A.N., Karavaeva T.B., Shiyanova A.E. et al. Atypical pneumonia (SARS) and sanitary protection of the territory. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2003; (1): 3–19. (in Russian)
27. Pityashina M.A. *The scientific basis of sanitary and epidemiological well-being of international events and their implementation on the example of the XXVII world summer Universiade in Kazan*: Diss. Saratov; 2015. (in Russian)
28. Shope R.E. Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology. *J. Exp. Med.* 1931; 54 (3): 373–85.
29. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu Bo, Lindstrom S., Balish A. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325 (5937): 197–201.
30. van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res.* 2007; 38 (2): 243–60.
31. Irvine R.M., Brown I.H. Novel H1N1 influenza in people: global spread from an animal source? *Vet. Res.* 2009; 164 (19): 577–8.
32. Cohen J. Swine flu outbreak: new details on virus’s promiscuous past. *Science*. 2009; 324: 1127.
33. Smith G.J., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S.J., Worobey M., Pybus O.G. et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009; 459 (7250): 1122–5.
34. Lange E., Kalthoff D., Blohm U., Teifke J. P., Breithaupt A., Maresch C. et al. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (9): 2119–23.
35. Brookes S.M., Irvine R.M., Nunez V.M. Influenza A (H1N1) infection in pigs. *Vet. Res.* 2009; 164: 760–1.
36. WHO information for laboratory diagnostics of pandemic (H1N1)2009 virus in humans – revised. Nov. 2009. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/diagnostic_recommendations/en/index.html
37. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Evaluation of Rapid Influenza Diagnostic tests for detection of novel Influenza A (H1N1) virus – United States, 2009. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2009; 58 (30): 826–9.
38. da Silva A.K., Le Saux J.C., Parnaudeau S., Pommepuy M., Elimelch M., Le Guyader F.S. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (24): 7891–7.
39. Svraka S., Duizer E., Vennema H., de Bruin E.n, van der Veer B., Dorresteyn B. et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (5): 1389–94.
40. Jothikumar N., Lowther J.A., Henshilwood K., Lees D.N., Hill V.R., Vinje J. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71 (4): 1870–5.
41. Loisy F., Atmar R.L., Guillon P., Cann P., Le Pommepuy M., Le Guyader F.S. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Meth.* 2005; 123 (1): 1–7.
42. Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B. et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (4): 1548–57.
43. Trujillo A.A., McCaustland K.A., Zheng D.P., Hadley L.A., Vaughn G., Adams S.M. et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44 (4): 1405–12.