Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы санитарно-вирусологических исследований пищевых продуктов и смывов с объектов окружающей среды на предприятиях пищевой промышленности, общественного питания и торговли. Подготовка образцов для исследований с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК)

Методические указания
МУК 4.2.3591—19

Издание официальное

Москва • 2020

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы санитарно-вирусологических исследований пищевых продуктов и смывов с объектов окружающей среды на предприятиях пищевой промышленности, общественного питания и торговли. Подготовка образцов для исследований с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК)

Методические указания
МУК 4.2.3591—19

ББК 51.23
М54

М54 **Методы** санитарно-вирусологических исследований пищевых продуктов и смывов с объектов окружающей среды на предприятиях пищевой промышленности, общественного питания и торговли. Подготовка образцов для исследований с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК): Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020.—14 с.

ISBN 978–5–7508–1730–6

1. Разработаны ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (А. Т. Подколзин, О. А. Веселова, Г. А. Шипулин), ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, Л. П. Мипаева).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 18 декабря 2019 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978–5–7508–1730–6

© Роспотребнадзор, 2020

Содержание

I. Общие положения и область применения 4
II. Метод исследования 5
III. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства 6
3.1. Средства измерений 6
3.2. Вспомогательные устройства 6
3.3. Реактивы 7
IV. Требования безопасности и квалификации операторов 7
V. Подготовка к исследованию 8
VI. Проведение работ 10
VII. Хранение и транспортировка вируссодержащих водных концентратов 14

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
18 декабря 2019 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы санитарно-вирусологических исследований пищевых продуктов и смывов с объектов окружающей среды на предприятиях пищевой промышленности, общественного питания и торговли. Подготовка образцов для исследований с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК)

Методические указания
МУК 4.2.3591—19

I. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) устанавливают порядок применения методики подготовки образцов пищевых продуктов (кроме бутилированной воды[1]) и смывов с объектов окружающей среды на предприятиях пищевой промышленности, общественного питания и торговли (далее – предприятия) путём приготовления вируссодержащих водных концентратов для санитарно-вирусологических исследований с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот (далее – МАНК).

1.2. МУК распространяются на пищевые продукты и смывы с объектов окружающей среды, подлежащие исследованиям на наличие энтеровирусов человека, вирусов гепатита А, ротавирусов, норовирусов, для целей осуществления оперативных, плановых противоэпидемических мероприятий и оценки их эффективности.

[1] Выявление вирусных агентов в образцах бутилированной воды проводится в соответствии с МУК 4.2.2029—05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов».

1.3. МУК применяется для исследования следующих объектов:

а) пищевые продукты:

– овощи, фрукты, ягоды свежие непереработанные;

– молоко и молочная продукция жидкой консистенции (молоко, сливки, кисломолочные продукты, включая сметану);

– соки плодоовощные свежеотжатые или отпускаемые в розлив осветленные;

– напитки безалкогольные;

– продукты пищевые и блюда общественного питания плотной консистенции, в том числе многокомпонентные.

б) смывы:

– с тары и упаковки для пищевых продуктов, инвентаря и оборудования, контактных поверхностей (ручки дверей, краны) в производственных, складских, моечных помещениях, с рук и санитарной одежды персонала[2].

1.4. МУК предназначены для специалистов учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих оперативные противоэпидемические мероприятия, а также могут быть использованы лабораториями, аккредитованными на проведение соответствующих исследований в установленном порядке.

1.5. МУК носят рекомендательный характер.

II. Метод исследования

2.1. Метод представляет собой стандартизованный алгоритм подготовки проб пищевых продуктов и смывов, взятых с объектов окружающей среды на предприятиях, для проведения санитарно-вирусологических исследований, основанных на МАНК, с целью выявления энтеровирусов человека, вирусов гепатита А, ротавирусов, норовирусов.

Алгоритм включает последовательное выполнение операций по высвобождению вирусных частиц из пищевых матриц-носителей различного характера элюирующими растворами, переводу вирусов в очищенное состояние фильтрованием (фракционированием сепарацией/коагуляцией) и получение вируссодержащих концентратов воды путём преципитации раствором полиэтиленгликоля при контролируемых значениях pH.

---

[2] При расследовании вспышек инфекционных заболеваний вирусной природы, обусловленных энтеровирусами человека, вирусами гепатита А, ротавирусами, норовирусами, и мониторинге заболеваемости методика приготовления вируссодержащих водных концентратов может быть использована для смывов, отобранных в очагах инфекций, в том числе с поверхностей мебели, предметов интерьера, игрушек, изделий медицинского назначения, сантехнического оборудования и др.

III. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства

3.1. Средства измерений

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	
pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01	
Автоматические пипеточные дозаторы с переменным объемом дозирования:	
0,5—5 мкл с шагом 0,01 мкл, точностью ± 0,6 %;	
20—200 мкл с шагом 1 мкл, точностью ± 0,6 %;	
100—1000 мкл с шагом 5 мкл, точностью ± 0,6 %;	
2—10 мл с шагом 0,1 мл, точностью ± 1,0 %	
Одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до 10, 20, 200, 1000 мм^3; 10 см^3	
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1000 мл	
Шприцы инъекционные однократного применения стерильные на 20 мл	ГОСТ ISO 7886-1
Колбы стеклянные мерные вместимостью 25, 50, 100, 200, 1000 мл	ГОСТ 12738

Примечание. Допускается использование средств измерений и стандартных образцов утвержденных типов с аналогичными или лучшими метрологическими характеристиками.

3.2. Вспомогательные устройства

Стерилизаторы паровые медицинские (автоклавы)	
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709
Печь микроволновая (мощностью не менее 400 Вт)	
Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или фарфоровые ступки с пестиками)	

Центрифуга лабораторная с охлаждением (эффективность 10000 g—20000 g)	
Цифровой орбитальный шейкер	
Холодильник бытовой электрический	
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336
Колбы стеклянные плоскодонные конические вместимостью 25, 50, 100, 200, 1000 мл с резиновыми пробками	ГОСТ 12738
Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл	
Зонды одноразовые стерильные (коттон)	
Трафарет для отбора смывов площадью 100/50/25 $см^2$	
Вакуумный отсасыватель	

Примечание. Допускается применение оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

3.3. Реактивы

Кислота соляная, 1Н, хч	ГОСТ 3118—77
Натрия гидроокись, 10Н, чда	ГОСТ 4328—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Трис-(оксиметил)аминометан, хч	
Кислота аминоуксусная (глицин), хч	ГОСТ 5860
Мясной экстракт (биф-экстракт / Beef extract)	
Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 8000	
Калий хлористый, хч	ГОСТ 4234
Натрий фосфорнокислый двузамещенный 7-водный (гидрофосфат $Na_2HPO_4*7H_2O$), хч	ГОСТ 4172
Калий фосфорнокислый однозамещенный (дигидрофосфат KH_2PO_4), хч	ГОСТ 4198
Пектиназа микробого происхождения (из *Aspergillus niger* или *A. aculeatus*) с известной активностью	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709

Примечание. Допускается использование реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

IV. Требования безопасности и квалификации операторов

4.1. Исследования пищевых продуктов и объектов окружающей среды с использованием методики подготовки образцов пищевых продуктов и смывов путём приготовления вируссодержащих водных кон-

центратов проводят в соответствии с санитарными правилами[3], с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007).

4.2. При выполнении исследований согласно методике и при работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019.

4.3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям санитарных правил[4], пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.4. К выполнению исследований с применением методики допускаются лица с высшим и средним медицинским, биологическим, ветеринарным и иным образованием, окончившие соответствующие курсы специализации с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III—IV групп, не имеющие медицинских противопоказаний к вакцинации, лечению специфическими препаратами и к работе в средствах индивидуальной защиты.

V. Подготовка к исследованию

5.1. Растворы, необходимые для проведения исследования:

а) элюирующий раствор (ЭР), pH 9,1—9,5 ед.:

– ТРИС HCl [трис(гидроксиметил)аминометан] – 12,1 ± 0,2 г;

– кислота аминоуксусная (глицин) – 3,8 ± 0,1 г;

– мясной экстракт (Beef extract) – 20 ± 1,0 г;

– вода дистиллированная – 1000 ± 10 мл.

Приготовление: растворить твердые вещества в воде, при необходимости довести pH до 9,5 ± 0,2 ед. при 25 °С при помощи NaOH (гидроксид натрия). Стерилизовать путем автоклавирования.

Хранение: до 7 дней при +2—8 °С.

б) преципитирующий раствор (5 × PEG/NaCl раствор, 5 × ПР):

– полиэтиленгликоль (ПЭГ) 8000—500 ± 2 г;

– NaCl – 87 ± 1,0 г;

– вода дистиллированная – 1000 ± 10 мл.

Приготовление: растворить полиэтиленгликоль (ПЭГ) и NaCl в (450 ± 5) мл воды, при необходимости нагреть. Довести объем до (1 000 ± 10) мл водой, размешать. Стерилизовать автоклавированием, перед тем, как поместить на хранение, перемешать еще раз, доведя до гомогенного состояния.

---

[3] СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (далее – СП 1.3.2322—08).

[4] СП 1.3.2322—08.

Хранение: до 7 дней при 25 °С, до 30 дней при +2—8 °С (при выпадении осадка перед использованием прогреть).

в) фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,3 ± 0,2 ед. при 25 °С:

– NaCl – 8,0 ± 0,1 г;

– KCl – 0,2 ± 0,01 г;

– $Na_2HPO_4 \times 7\ H_2O$ – 1,15 ± 0,01 г;

– KH_2PO_4 – 0,2 ± 0,01 г;

– вода дистиллированная – 1000 ± 10 мл;

– стерилизовать путем автоклавирования.

Хранение: до 30 дней при +2—8 °С.

Приготовление: растворить твердые вещества в воде, при необходимости довести pH до 7,3 ± 0,2 ед. при 25 °С при помощи HCl (соляной кислоты) или NaOH (гидроксида натрия). Стерилизовать путем автоклавирования.

Отбор и подготовка проб

5.2. Отбор проб пищевой продукции проводят с учетом требований нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта. Масса (объем) образцов для анализа составляет для продуктов массового потребления не менее 25 г (25 $см^3$), для продуктов детского и диетического питания – не менее 50 г (50 $см^3$), если иные требования не регламентированы действующей нормативной документацией. До начала анализа пробы хранят в холодильнике.

5.3. Взятие смывов с объектов окружающей среды на предприятиях, тары, упаковки пищевых продуктов проводят в соответствии с методическими указаниями[5], используя стерильные зонды (коттоны). Зонд осторожно смачивают в фосфатно-солевом буфере (PBS), налитом в микроцентрифужные пробирки по 490 ± 5 мкл, отжимают о край пробирки для удаления излишков фосфатно-солевого буфера (PBS) и отбирают смыв с обследуемой поверхности площадью 100 $см^2$, используя один или несколько трафаретов, слегка нажимая на зонд для лучшего сбора вирусных частиц. Сразу после забора смыва зонд помещают обратно в пробирку, интенсивно вращают в пробирке и вновь отжимают об её край для максимального удаления раствора из зонда. Данная процедура повторяется трехкратно.

С пищевых продуктов смывы отбирают таким же образом, при этом протирают зондом всю доступную поверхность образца. Для продуктов, имеющих сложную или шероховатую форму поверхности, допускается использовать нескольких зондов.

---

[5] МУ 2657—82 «Методические указания по санитарно-бактериологическому контролю на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами».

Доставку смывов в лабораторию осуществляют в соответствии с требованиями санитарных правил[6].

VI. Проведение работ

Алгоритм проведения работ

6.1. Получение вируссодержащих водных концентратов из образцов пищевых продуктов проводят в максимально короткие сроки, но не позднее 24 часов после отбора проб пищевых продуктов.

6.2. Смывы в микроцентрифужных пробирках с фосфатно-солевом буфере (PBS), отобранные по п. 5.3, готовы для экстракции рибонуклеиновой кислоты (РНК) (выделение из 200 мкл образца). Доставленные в лабораторию смывы хранению не подлежат и сразу направляются на санитарно-вирусологический анализ с использованием МАНК.

6.3. Алгоритм проведения работ получения вируссодержащих водных концентратов из образцов продуктов питания и смывов с объектов окружающей среды для исследований с применением МАНК представлен на рис. 1.

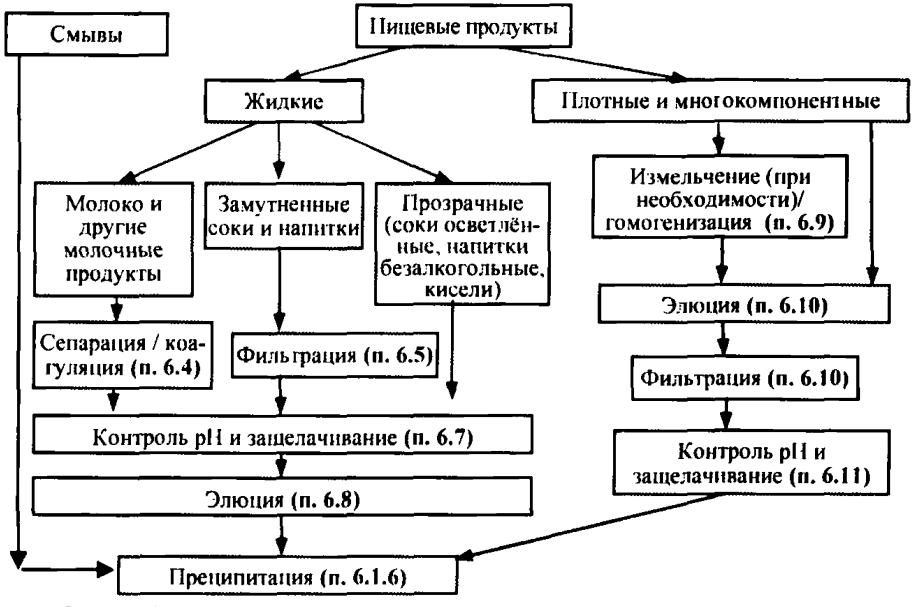

Рис. 1. Алгоритм получения вируссодержащих водных концентратов из образцов пищевых продуктов и смывов для исследований с применением МАНК

[6] СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

Алгоритм исследования продуктов жидкой консистенции

6.4. Сепарация и коагуляция молока и молочных продуктов.

Исходные образцы молока или молочных продуктов (например, кефир, ряженка, йогурт) с содержанием жира не более 6 % сепарируют, применяя любую из двух нижеописанных методик:

– центрифугирование при 13 000 g в течение 5 минут;

– коагуляция путём добавления 0,1 М HCl из расчета 10 мкл на 1 мл исследуемого образца с последующим перемешиванием и центрифугированием при 3 000 g в течение 5 минут.

Жидкие молочные и кисломолочные продукты с более высоким содержанием жира (сливки, сметана) сепарируют центрифугированием при 13 000 g в течение 5 минут.

6.5. Обработка и фильтрация замутненных напитков и других продуктов жидкой консистенции.

Замутнённые напитки, соки с мякотью и прочие продукты-суспензии жидкой консистенции фильтруют под давлением через ватный фильтр. Для этой процедуры используют одноразовые шприцы объемом 20 мл. На дно рабочей части шприца помещают стерильный ватный фильтр, на который наносят весь объём исследуемого образца. Фильтрация осуществляется под давлением с достижением максимального выхода жидкой фазы из образца. После фильтрации осветленную жидкую фазу центрифугируют при 13 000 g в течение 5 минут. Для контроля pH и дальнейшей работы отбирают среднюю часть центрифугата (не содержащую жира и плотного осадка).

Для обработки фруктовых и овощных соков с мякотью используют пектиназу, которую добавляют из расчёта на 1 мл сока 0,75 ед пектиназы из *A. niger* или 28,5 ед. пектиназы из *A. aculeatus*. Образец помещают на качалку (ротатор) и ферментируют при комнатной температуре в течение 20 минут при скорости встряхивания около 60 раз в минуту.

6.6. Обработка незамутненных напитков и других прозрачных продуктов жидкой консистенции.

Незамутненные напитки и другие прозрачные продукты жидкой консистенции (соки осветлённые, напитки безалкогольные), отобранные по п. 5.2, допускается направлять на элюцию без предварительного центрифугирования, сразу после контроля показателя pH и нейтрализации.

6.7. Контроль pH и защелачивание пробы.

Условием эффективной преципитации вирусных патогенов является обеспечение высокощелочной реакции пробы и доведение в ней pH перед проведением этапа преципитации до значения 9,5 ед. при помощи NaOH (гидроксида натрия).

6.8. Элюция вирусных частиц из жидких образцов.

Для проведения элюции вирусных частиц к 10 мл защелоченных образцов жидких продуктов, подготовленных по пп. 6.4—6.6, добавляют 30 мл элюирующего раствора. Элюция вирусных частиц проводится при температуре 18—25 °С в течение 20 минут при регулярном помешивании (используют шейкер), после чего элюат готов к стадии преципитации.

Оптимальный объем для проведения элюции вирусных частиц 40 мл.

Алгоритм исследования продуктов плотной консистенции

6.9. Гомогенизация и измельчение образцов ягод, фруктов, плотных, жиросодержащих и многокомпонентных продуктов.

В связи с тем, что невозможно эндогенное инфицирование антропонозными патогенами, к которым относятся вирусы гепатита А, энтеровирусы, ротавирусы и норовирусы человека, продуктов животного и большей части продуктов растительного происхождения для их анализа достаточной является гомогенизация продукта путём перемешивания или нарезания, повышающая эффективность смывания вирусных частиц с поверхности для выявления экзогенного загрязнения. Максимальный размер кусочков измельченных или перемешанных многокомпонентных продуктов не должен превышать 2,5 см в длину. При исследовании фруктов и овощей с кожистой оболочкой допускается готовить пробу путём отбора смыва с поверхности по п. 5.3 с ее дальнейшей обработкой по п. 6.2.

При наличии в сопроводительной документации указаний на выращивание исследуемых образцов листовой зелени на полях орошения, образцы таких продуктов перед проведением анализа гомогенизируют с использованием гомогенизаторов до получения однородной массы (суспензии) без добавления каких-либо растворов.

6.10. Элюция вирусных частиц из образцов гомогенизированных и измельченных продуктов.

К стерильно отобранной навеске образца измельченных или гомогенизированных продуктов массой (25 ± 0,3) г добавляется элюирующий раствор (ЭР) в объеме (40 ± 1) мл. К пробам измельчённых фруктов и овощей в элюирующий раствор добавляют пектиназу из расчёта на 25 г пробы 30 ед. пектиназы из *A. niger* или 1 140 ед. пектиназы из *A. aculeatus*.

Образец помещают на цифровой орбитальный шейкер и ферментируют при комнатной температуре в течение 20 минут при скорости встряхивания около 60 раз в минуту.

В процессе элюции pH образца продукта с элюирующим раствором поддерживается в диапазоне 9,0—9,5 ед. с контролем каждые 10 мин. Жидкую фазу отфильтровывают в центрифужные пробирки и центрифугируют при 10 000 g в течение (30 ± 5) мин при температуре (5 ± 3) °С. Для преципитации отбирают среднюю часть центрифугата (не содержащую жира и плотного осадка) в объеме 40 мл.

6.11. Контроль pH и защелачивание элюата.

Непосредственно перед проведением этапа преципитации в элюате повторно контролируют показатель pH, в случае необходимости доводят до значения 9,5 ед. при помощи NaOH (гидроксида натрия).

Проведение преципитации

6.12. К исследуемому объему защелоченного элюата (40 мл), полученному по пп. 6.8 или 6.10, добавляют охлажденный до температуры не выше 4 °С 5× концентрат ПЭГ\NaCl раствора (5 × ПР) в объеме ¼ от объема элюата – до получения конечной концентрации полиэтиленгликоль (ПЭГ) – 100 г/л и NaCl – 17,4 г/л. Смесь тщательно перемешивают (до гомогенного состояния) и помещают в холодильник при температуре (4 ± 1) °С на 60 минут для преципитации.

После преципитации, в условиях, не допускающих нагревания смеси выше +10 °С, её переносят в микроцентрифужные пробирки (по 2 мл в пробирку), которые загружают в предварительно охлажденную до (4 ± 1)°С центрифугу. Центрифугирование проводят при температуре +4 °С, не допуская подъема температуры из-за риска растворения осаждённых вирусных частиц, в течение 30 мин при 10 000 g.

По завершении центрифугирования в условиях, не допускающих нагревания центрифугата выше +10 °С, вакуумным отсасывателем со стерильным наконечником аккуратно удаляют супернатант, не задевая осадок (седимент). Осадок из нескольких пробирок соединяют вместе, ресуспендируя его в фосфатно-солевом буфере (PBS).

Примечание: если в ходе подготовки образцов к центрифугированию или при его проведении было допущено повышение температуры образца до +10 °С и более, необходимо повторное проведение этапа преципитации. Рекомендуется использование штативов с охлаждением.

Полученный преципитат растворяют/ресуспендируют в 300 мкл фосфатно-солевого буфера и используют для экстракции вирусных нуклеиновых кислот.

6.13. Проведение экстракции рибонуклеиновой кислоты (РНК), реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляется в соответствии с инструкцией производителей наборов реагентов, используемых для проведения исследований. Предпочтение должно отдаваться наборам реагентов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

VII. Хранение и транспортировка вируссодержащих водных концентратов

7.1. Полученные по п. 6.12 вируссодержащие водные концентраты допускается хранить до начала санитарно-вирусологических исследований с использованием МАНК в соответствии с требованиями СП 1.2.036—95:

– при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;

– при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;

– при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

Методы санитарно-вирусологических исследований пищевых продуктов и смывов с объектов окружающей среды на предприятиях пищевой промышленности, общественного питания и торговли. Подготовка образцов для исследований с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК)

Методические указания
МУК 4.2.3591—19

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 13.04.2020

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 100 экз. Заказ 15

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19А
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 633-86-59

gost.e-ecolog.ru