

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-463-470>



Поступила 31.05.2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Поступила после рецензирования 24.10.2023

Научная статья

Принята в печать 07.11.2023

Open access

© Юшина Ю. К., Семенова А. А., Кузнецова О. А., Сатабаева Д. М., Зайко Е. В., Велебит Б., 2023

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ВИРУСОВ ИЗ ПИЩЕВЫХ МАТРИЦ И ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ КОНТАМИНИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ В ТОРГОВОЙ СЕТИ

Юшина Ю. К.^{1,*}, Семенова А. А.¹, Кузнецова О. А.¹, Сатабаева Д. М.¹, Зайко Е. В.¹, Велебит Б.²

¹ Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Москва, Россия

² Институт гигиены и технологии мяса, Белград, Сербия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

норовирус, гепатит Е, пищевые вирусы, ОТ-ПЦР, ягоды, свиная печень

Экспресс-обнаружение вирусов, в частности норовируса (NoV) и вируса гепатита А (HAV), становится важнейшей задачей контроля безопасности пищевых продуктов. В данном исследовании были рассмотрены различные подходы к извлечению вирусных частиц и способы выделения РНК из пищевых матриц с целью оценки эффективности экстракции менговируса. Эффективность экстракции менговируса из малины составила 14,26%, из устриц — 7,99%, из свиной печени — 8,33%. Была проведена оценка экстракции РНК различными методами. Наибольшая эффективность экстракции менговируса из свиной печени наблюдалась при выделении РНК с помощью полуавтоматической системы eGene up и составила 19,37%. Наименьшая эффективность экстракции была достигнута при выделении РНК ручным способом — 5,31%. При экстракции РНК из устриц максимальная эффективность обеспечивалась с помощью станции для выделения НК AutoPure и набора NucliSENS — 33,35%, а минимальная эффективность наблюдалась при использовании системы eGene up и составила 9,78%. Проведенный мониторинг пищевых продуктов показал, что наибольшая встречаемость норовируса GII была зафиксирована в образцах устриц и составила 9,6% от исследуемых образцов; на втором месте находилась клубника, где встречаемость норовируса GII составила 6,8%. В образцах малины норовирус GII обнаружен не был.

Received 31.05.2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Accepted in revised 24.10.2023

Original scientific article

Accepted for publication 07.11.2023

Open access

© Yushina Yu. K., Semenova A. A., Kuznetsova O. A., Satabaeva D. M., Zaiko E. V., Velebit, B., 2023

ASSESSMENT OF THE EFFICIENCY OF VIRUS EXTRACTION FROM FOOD MATRICES AND THE FREQUENCY OF OCCURRENCE OF CONTAMINATED PRODUCTS IN THE RETAIL NETWORK

Yulia K. Yushina^{1,*}, Anastasia A. Semenova¹, Oksana A. Kuznetsova¹, Dagmara M. Satabaeva¹, Elena V. Zaiko¹, Branko Velebit²

¹ V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

² Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia

KEY WORDS:

Norovirus, hepatitis E, foodborne viruses, RT-PCR, berries, pork liver

ABSTRACT

Express detection of viruses, in particular, norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV), is becoming an extremely important task for food safety control. This study examines various approaches to recovery of viral particles and methods for RNA extraction from food matrices to assess mengovirus extraction efficiency. Efficiency of mengovirus extraction from raspberry was 14.26%, from oysters 7.99%, from pork liver 8.33%. Assessment of RNA extraction by various methods was carried out. The highest efficiency of mengovirus extraction from pork liver (19.37%) was observed when RNA was extracted using the eGene-up semi-automatic system. The lowest extraction efficiency (5.31%) was achieved upon manual RNA extraction. When RNA was extracted from oysters, the maximum efficiency (33.35%) was ensured by the AutoPure nucleic acid extraction station and NucliSens kit, while the minimum efficiency (9.78%) was observed when using the eGene-up system. The performed monitoring of food products showed that the highest occurrence of norovirus GII was recorded in oyster samples (9.6% of tested samples); the second place was occupied by strawberry, where occurrence of norovirus GII was 6.8%. In the raspberry samples, norovirus GII was not detected.

1. Введение

Долгое время основное внимание в области микробиологического контроля продуктов питания уделялось только бактериальным патогенам, в то время как вирусные возбудители заболеваний вызывали меньший интерес [1,2]. Причиной тому являлась не только сложность обнаружения вирусов, но и тот факт, что присутствие вирусов в пищевых продуктах обычно не связано с изменениями органолептических или сенсорных свойств продукта [3,4]. Меры, применяемые при микробиологическом контроле, не эффективны в случае вирусного заражения. В последнее время в мире растет обеспокоенность гигиенистов в связи с увеличением случаев пищевых отравлений, связанных с норовирусом (NoV) и гепатитом А (HAV), распространяющимися через загрязненную воду, моллюсков, овощи

и мягкие фрукты [5,6,7]. Как показал опыт пандемии ковид-19, не стоит исключать риска передачи через продукты питания даже тех вирусов, которые передаются от человека к человеку [8,9]. Предполагается, что постепенно вирусы могут стать основными возбудителями пищевых инфекций во всем мире [10]. В этой связи обнаружение вирусов в пищевых матрицах имеет важнейшее значение при изучении вспышек инфекций, переносимых через продукты питания.

Весь процесс идентификации пищевых вирусов в основном состоит из трех этапов. На первом этапе вирусные частицы отделяют и при необходимости концентрируют до необходимого объема. Затем проводят выделение генетического материала (РНК), за которым может следовать дополнительная очистка нуклеиновой кислоты. Заключительным этапом является молекулярное обнаружение генетического

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Юшина, Ю. К., Семенова А. А., Кузнецова О. А., Сатабаева, Д. М., Зайко, Е. В., Велебит, Б. (2023). Оценка эффективности экстракции вирусов из пищевых матриц и частоты встречаемости контаминированных продуктов в торговой сети. *Пищевые системы*, 6(4), 463-470. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-463-470>

FOR CITATION: Yushina, Yu. K., Semenova, A. A., Kuznetsova, O. A., Satabaeva, D. M., Zaiko, E. V., Velebit, B. (2023). Assessment of the efficiency of virus extraction from food matrices and the frequency of occurrence of contaminated products in the retail network. *Food Systems*, 6(4), 463-470. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-463-470>

материала вирусов. В некоторых случаях выделение генетического материала может быть выполнено непосредственно из пищевой матрицы, при этом первая стадия разделения и концентрации опускается.

Получение ложноотрицательных и ложноположительных образцов может представлять собой проблему выявления вирусов. Большинство ложноотрицательных результатов является следствием неэффективного выделения вируса/нуклеиновых кислот из анализируемых матриц или ингибирования обратной транскрипции (ОТ), полимеразной цепной реакции (ПЦР) и молекулярных методов в целом. Большинство ложноположительных результатов обусловлены перекрестным загрязнением, которое может произойти почти на любом этапе аналитической процедуры. Соответствующая система положительного и отрицательного контроля всей процедуры может обеспечить подходящее решение и поэтому должна быть использована при исследовании [11].

Первый этап аналитической процедуры обычно состоит из отделения вирусных частиц от матрицы и их концентрации. Это критический момент в большинстве протоколов по выявлению вирусных частиц в продуктах питания. Методы экстракции вирусов, как правило, могут быть классифицированы в соответствии с исследуемой матрицей. Их можно разделить на подходы, применимые к продуктам углеводной природы, которые содержат большое количество воды (в основном фрукты и овощи), и на подходы, подходящие для продуктов с высоким содержанием жира и белка (например, мясо и мясные продукты). Отдельная категория методов — это методы для контроля вирусов в моллюсках, которые представляют собой довольно специфическую матрицу из-за их способности концентрировать вирусные частицы.

Экстракция вирусов из ягод (малина, клубника и др.) является сложной задачей главным образом из-за их хрупкой текстуры и различных веществ в ягодном соке, которые препятствуют обнаружению вируса с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [12]. Фенолы и полифенолы (например, антоциан, флавонол, эллагитаннин, проантоцианидин, фенольные кислоты, дубильная кислота) могут связывать нуклеиновые кислоты (НК), тем самым ингибировать реакцию ОТ-ПЦР. Кроме того, первичная клеточная стенка растений содержит структурный гетерополисахарид, пектин, который также ингибирует реакцию ОТ-ПЦР [13]. Ингибиторы в сочетании с низкой эффективностью элюирования вируса из ягод часто снижают чувствительность обнаружения и могут привести к ложноотрицательным результатам [14]. В связи с этим важно использовать подходы, позволяющие минимизировать влияние ингибиторов, содержащихся в ягодах.

Свиная печень и продукты из свиной печени являются наиболее частыми источниками гепатита Е (HEV).

У свиней это заболевание передается в основном фекально-оральным путем. Они начинают выделять вирус с фекалиями в течение двух месяцев [15]. Инфицированные свиньи обычно не проявляют каких-либо явных клинических симптомов, хотя в некоторых случаях у них может развиваться острый самоограничивающийся гепатит легкой и средней степени тяжести [16]. Как следствие, свиньи, инфицированные HEV, поступают на бойню как здоровые животные, и, следовательно, их ткани и мясо могут представлять опасность для потребителей.

Большинство вирусов пищевого происхождения трудно или невозможно культивировать [17]. Для их обнаружения в образцах пищевых продуктов и окружающей среды используются чувствительные молекулярные методы. Сегодня ОТ-ПЦР широко применяется для обнаружения вирусов, поскольку она чувствительна, специфична, быстра и может предоставлять количественные данные. Тем не менее эффективность молекулярных методов сильно варьируется. Проблемы возникают в связи с различным матричным составом, с высокой вариабельностью последовательности вирусов и с наличием ингибиторов. При выборе подходящего метода необходимо учитывать характеристики как конкретной специфической матрицы, в которой выполняется обнаружение, так и потенциально присутствующих вирусных агентов [18].

Учитывая вышеописанную проблематику, цель работы состояла в оценке эффективности экстрагирования вирусных частиц из пищевых матриц и выделения РНК с использованием различных подходов, а также в предварительной оценке распространенности вирусов в пищевых продуктах российского производства.

2. Объекты и методы

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были взяты образцы малины, клубники, устриц и свиной печени. Образцы малины, клубники и свиной печени (в потребительской упаковке массой от 0,5 до 1,0 кг) были получены в точках розничной торговли Москвы и Московской

области. Устрицы были выращены в Приморском крае, Южно-Сахалинске, Владивостоке, Республике Крым и доставлены на исследования в вакуумных упаковках по 15–20 штук. Для оценки эффективности подходов по извлечению целевых вирусов из образцов и эффективности выделения РНК был взят менговирус, штамм VMCO (*Mengovirus Extraction Control kit KMG*, bioMérieux, Франция) (далее — контрольный вирус). Этот вирус обладает структурными, физико-химическими и другими аналогичными свойствами большинства кишечных вирусов, что делает его современной морфологической, физико-химической и генетической моделью для мониторинга вирусов [18,19].

2.2. Подготовка реактивов

Реактивы, использованные в работе, приведены в Таблице 1 и описаны ниже.

Таблица 1. Реактивы, используемые в работе

Table 1. Reagents used in the work

№	Наименование реактива	Составные компоненты	Производитель, страна
1	5 × полиэтиленгликоль/хлорид натрия (PEG/NaCl)	Полиэтиленгликоль (PEG) 8000	Sigma-Aldrich, Швейцария
		Хлорид натрия (NaCl)	ООО «МЗХР», Россия
2	Хлороформа/бутанола	Хлороформ	Scharlab, Испания
		n-Бутанол	neoFroxx, Германия
3	Буфер Трис/глицин/говяжий экстракт (TGBE)	Трис основа [tris(hydroxymethyl)aminomethane]	neoFroxx, Германия
		Глицин	neoFroxx, Германия
		Порошок экстракта говядины	Vecton, Dickinson, Франция
4	Буфер Трис/ЭДТА (TE)	Трис раствор (1 моль/л)	neoFroxx, Германия
		ЭДТА раствор (0,5 моль/л)	neoFroxx, Германия

2.2.1. Раствор 5 × полиэтиленгликоль/хлорид натрия (PEG/NaCl)

В 450 мл воды растворяли 500 г полиэтиленгликоля и 87 г хлорида натрия. Объем доводили до 1000 ± 10 мл воды и хорошо перемешивали. Полученный раствор стерилизовали в автоклаве при 120 °С в течение 15 минут.

2.2.2. Смесь хлороформа/бутанола

В лабораторной посуде смешивали 10 мл хлороформ и 10 мл n-Бутанол. Полученную смесь хранили в темном месте в бутылках из темного стекла.

2.2.3. Буфер Трис/глицин/говяжий экстракт (TGBE)

В 800 мл воды растворяли 12,1 г основы Трис [tris(hydroxymethyl)aminomethane], 3,8 г глицина, 10,0 г порошка экстракта говядины, при необходимости поднимали уровень pH до 9,5 ± 0,2 при 25 °С. Общий объем доводили до 1000 ± 10 мл воды и хорошо перемешивали. Полученный буфер стерилизовали в автоклаве (СПВА-75-1-нн, «Транс Сигнал», Россия) при 120 °С в течение 15 минут. Стерильный буфер хранили при температуре 5 ± 1 °С.

2.2.4. Буфер Трис/ЭДТА (TE) (10 ммоль/л Трис, 1 ммоль/л ЭДТА)

Для получения буфера TE, содержащего 10 ммоль/л Трис и 1 ммоль/л ЭДТА, смешивали 1000 мкл раствора Трис (1 моль/л) и раствора ЭДТА (0,5 моль/л). Буфер хранили при 5 °С.

2.3. Экстракция вируса

2.3.1. Экстракция вируса из ягод

25,0 г образца переносили в отделение для образцов сетчатого фильтровального пакета емкостью 400 мл. Затем к образцу добавляли 10 мкл контрольного вируса и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. По завершении инкубирования в образец вносили 40 мл TGBE. Далее добавляли к образцам не менее 30 Ед пектиназы из *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Швейцария). Образцы инкубировали на шейкере Multi Bio 3D (Biosan, Латвия) при комнатной температуре и 60 об/мин в течение 20 мин. Во время инкубирования образцов ягод тест-полосками (Merk, Германия) измеряли pH экстракта каждые 10 мин. При снижении уровня pH ниже 9,0 смесь подщелачивали до 9,5 ± 0,5 с использованием водного раствора NaOH (≥ 10 моль/л) (Millipore, Sigma-Aldrich, Германия)

и инкубировали еще 10 мин. Затем pH измеряли еще раз, при необходимости подщелачивали смесь и продолжали инкубирование. Экстракт из отделения для отфильтрованного материала переносили в центрифужные пробирки объемом 50 мл. Экстракт центрифугировали при 10 000 об/мин при температуре 5 °С в течение 15 мин в центрифуге Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия). Супернатант переносили в отдельные чистые фальконы и доводили pH до 7,0 с использованием водного раствора HCl (≥ 5 N) (Charlab, Испания). К полученному экстракту добавляли $\frac{1}{4}$ объема супернатанта PEG/NaCl 5X для получения конечной концентрации 1X (100 г/л PEG и 0,3 M NaCl). Смесь гомогенизировали встряхиванием в течение 60 с и инкубировали в шейкере Multi Bio 3D (Biosan, Латвия) при 60 об/мин и 5 °С в течение 60 мин. По окончании инкубирования смесь центрифугировали при 10 000 об/мин и температуре 4–5 °С в течение 30 мин. Затем удаляли осадок и проводили повторное центрифугирование при 10 000 об/мин и температуре 4–5 °С в течение 5 мин для уплотнения. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS, AppliChem, Германия) если объем осадка оказывался значительным, применялось до 1000 мкл фосфатно-солевого буфера. Полученный раствор переносили в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 500 мкл смеси хлороформ/бутанол (1:1), интенсивно встряхивали и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем образец центрифугировали при 10 000 об/мин и 4–5 °С в течение 15 мин и переносили водную фазу (400–500 мкл) в чистую пробирку. Полученный экстракт сразу же подвергали экстрагированию вирусной РНК.

2.3.2. Экстракция вируса из двусторчатых моллюсков

Для анализа отбирали не менее 10 моллюсков. Панцирь открывали стерильным ножом. Пищеварительные железы вырезали с использованием ножниц и пинцетов, и переносили в стерильные чашки Петри. Общая масса желез для исследования составляла не менее 2 г. Пищеварительные железы измельчали скальпелем до пастообразной консистенции. Затем 2 г полученного образца переносили в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Пищеварительные железы сразу же подвергали экстракции вируса. В каждую пробирку с образцом вносили 10 мкл контрольного вируса процесса и 2 мл раствора протеиназы К (neoFroxx, Германия), перемешивали и инкубировали в шейкере (320 оборотов/мин) при 37 °С в течение 60 мин. По окончании лизиса проводили повторное инкубирование при 60 °С в течение 15 мин, поместив пробирку в водяную баню WB-4MS (BioSan, Латвия). Полученный раствор центрифугировали на центрифуге Eppendorf MiniSpin, (Eppendorf, Германия) при 3000 об/мин и комнатной температуре в течение 5 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и измеряли его объем. Объем полученного раствора записывали. Полученный экстракт незамедлительно подвергали экстрагированию вирусной РНК.

2.3.3. Экстракция вируса из свиной печени

Образец свиной печени массой 100 мг вносили в пробирки с керамическими шариками (Bertin Technologies, Франция), добавляли 1 мл тризола (Invitrogen, США) и $10 \pm 0,5$ мкл вируса для контроля процесса. Пробирку помещали в гомогенизатор Minilys (Bertin Technologies, Франция) при 5000 об/мин на 3 минуты.

После деструкции образцов тризолом в пробирку вносили 200 мкл хлороформа (Scharlab, Испания). Затем незамедлительно перемешивали на вортексе MSV-3500 (Biosan, Латвия) и оставляли на 5 минут при комнатной температуре. По истечении времени центрифугировали при 13,5 тыс. оборотов в минуту в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отбирали в отдельные пробирки. Полученный экстракт подвергали экстрагированию вирусной РНК.

2.4. Экстракция РНК

Из образцов двусторчатых моллюсков экстрагировали РНК из 500 мкл полученного образца, во всех остальных случаях использовали всю экстрагированную жидкость.

Для каждой партии тестируемых образцов был включен отрицательный контроль экстракции РНК.

Для оценки эффективности экстракции РНК и с целью создания стандартной кривой для определения эффективности экстракции вируса для каждой партии исследуемых образцов было дополнительно взято 10 мкл контрольного вируса известной концентрации и добавлено 490 ± 10 мкл воды для молекулярных исследований. Также была проведена экстракция РНК, которая выполнялась тремя различными методами, описанными ниже.

2.4.1. Экстракция РНК с помощью реагентов NucliSENS ручным методом

Для экстракции РНК добавляли 2 мл буфера для лизиса NucliSENS (bioMérieux, Франция) в пробирку и кратковременно перемешивали встряхиванием, затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Добавляли 50 мкл предварительно перемешанного раствора магнитного диоксида кремния в пробирку, кратковременно перемешивали встряхиванием и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали в течение 120 с при 1500 об/мин или давали оксиду кремния отстояться с помощью магнитного штатива и осторожно удаляли супернатант. Убирали пробирки с магнитного штатива и добавляли 400 мкл буфера NucliSENS1 для экстракции, осадок ресуспендировали встряхиванием, стараясь избежать пенообразования. Пробирки с образцами помещали на магнитный штатив, затем ожидали полного оседания магнитных частиц и аккуратно удаляли супернатант. Этап очистки буфером NucliSENS1 для экстракции повторяли. Супернатант полностью удаляли. Пробирки снимали с магнитного штатива, добавляли 500 мкл буфера NucliSENS2 для экстракции и интенсивно встряхивали в течение 30 с. Затем давали оксиду кремния осесть с помощью магнитного штатива и аккуратно удаляли супернатант. Этап очистки буфером NucliSENS2 для экстракции повторяли еще раз. Супернатант полностью удаляли. Пробирки снимали с магнитного штатива и добавляли 500 мкл буфера NucliSENS3 для экстракции. Осадок ресуспендировали встряхиванием, стараясь избежать пенообразования. Пробирки с образцами помещали на магнитный штатив и давали осесть магнитным частицам, затем аккуратно удаляли супернатант. Пробирки убирали с магнитного штатива и вносили 100 мкл буфера NucliSENS3 для экстракции, предварительно нагретого до 60 °С. Образцы перемешивали 4–5 раз путем встряхивания. Полученные пробирки ставили на шейкер при 60 °С на 5 минут. По истечении времени инкубирования пробирки помещали на магнитный штатив, всю жидкость переносили в чистые пробирки. Полученную РНК использовали для проведения ПЦР.

Экстрагированную РНК использовали сразу же или хранили при 5 °С максимально 24 ч, при — 15 С или ниже — до 6 мес.

2.4.2. Экстракцию РНК с помощью полуавтоматической системы eGene up (bioMérieux, Франция) и с помощью наборов лабораторных реагентов для выделения РНК innuPREP RNA MiniKit 2.0 (AnalytikJena, Германия) проводили согласно инструкции производителя.

2.4.3. Экстракция РНК с помощью автоматической станции выделения РНК Auto-Pure 96.

Для экстракции РНК добавляли 2 мл буфера для лизиса NucliSENS в пробирку и кратковременно перемешивали встряхиванием, затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Далее вносили 50 мкл предварительно перемешанного раствора магнитного диоксида кремния в пробирку, кратковременно перемешивали встряхиванием и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали в течение 120 с при 1500 об/мин в центрифуге Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия) и добавляли по 2 мл в чистую пашку. В каждую пашку для каждого образца вносили по одной лунке буфера NucliSENS1 объемом 400 мкл для экстракции. Также во все пашки для всех образцов вливали по одной лунке буфера NucliSENS2 объемом 500 мкл для экстракции. Добавляли 500 мкл буфера NucliSENS3 в одну пашку. Также в отдельную чистую пашку вносили 100 мкл буфера NucliSENS3. Далее следовали инструкции производителя.

2.4.4. ОТ-ПЦР в реальном времени

Для идентификации вирусных геномов использовали одноэтапную ОТ-ПЦР на приборе Gene up (bioMérieux, Франция) в режиме реального времени с гидролизуемыми зондами. Для определения норовируса применяли набор для обнаружения норовируса генотипы II (NoVGII) (bioMérieux, Франция); для выявления вируса гепатита E использовали набор для обнаружения вируса гепатита E (HEV) (bioMérieux, Франция); для определения менговируса использовали набор для обнаружения менговируса (bioMérieux, Франция). Каждая постановка ПЦР включала положительный и отрицательный контроли, входящие в состав наборов.

2.5. Интерпретация результатов

Сигнал флуоресценции для внутреннего контроля исследуемого образца считывался по каналу VIC, а сигнал для обнаружения РНК вируса для контроля процесса, положительного и отрицательного

контролей ПЦР, а также РНК искомым вирусом определялся по каналу FAM. Значение порогового цикла (Ct) меньше 40 циклов считалось положительным результатом.

Для оценки параметров качества проведенных исследований строили калибровочный график. Для этого использовали результаты ПЦР для серий разведений РНК контрольного вируса. Построение калибровочного графика и оценку его параметров проводили с помощью программного обеспечения прибора Gene up (bioMérieux, Франция). С целью определения силы взаимосвязи между переменными (степени прямолинейности) использовали коэффициент корреляции Пирсона (r^2), за допустимые значения которого принимали значения от 0,98 и выше. В качестве другого параметра оценки калибровочного графика использовали значение наклона кривой (m), показатели которого должны находиться в пределах от $-3,1$ до $-3,6$, что соответствует эффективности амплификации от 90% до 110%.

Эффективность экстракции вируса считали успешной при его экстракции более 1%. Экстракцию контрольного вируса (p ,%) в общем случае рассчитывали по формуле:

$$p = 10(\Delta Ct/m) \times 100,$$

где ΔCt — разность пороговых циклов амплификаций (Ct) исследуемой и неразведенной концентрации РНК контрольного вируса;
 m — наклон калибровочного графика РНК контрольного вируса.

В случаях, когда пищевой матрицей были образцы устриц, окончательный расчет эффективности экстракции вируса проводили следующим образом:

$$E = (p/0,5) \times v,$$

где p — экстракция контрольного вируса;
 v — общий измеренный объем супернатанта в мл.

2.6. Статистическая обработка

Данные были выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение. При оценке эффективности экстрагирования вирусов эксперимент проводили в трех повторах. Анализ значимости полученных результатов проводили с использованием критерия хи-квадрат Пирсона. Различия считались значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$. Для статистической обработки данных применяли программное обеспечение STATISTICA 12.0.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Оценка эффективности экстрагирования вирусов и способов выделения РНК

Оценку эффективности экстрагирования вирусов при использовании ручного, полуавтоматического и автоматического способов выделения РНК начинали с построения калибровочных графиков. С этой целью были получены значения порогового цикла амплификаций (Ct) для серии концентраций контрольного вируса (Таблица 2). Также были построены калибровочные графики для расчета параметров прямой (Рисунок 1), соответствующие трем способам выделения РНК.

Таблица 2. Пороговый цикл амплификации (Ct) менговируса в зависимости от способа выделения РНК

Table 2. Threshold cycle (Ct) of amplification of mengovirus depending on the method for RNA extraction

Объекты	Значение Ct		
	Ручной способ с набором innuPREP RNA MiniKit 2.0 (а)	Станция AutoPure и набор NucliSENS (б)	eGene up (в)
Менговирус 100%	25,15 \pm 0,40	25,55 \pm 0,29	24,19 \pm 0,03 ^{аб}
Менговирус 10%	28,39 \pm 0,37	29,32 \pm 0,15 ^а	27,24 \pm 0,21 ^{ааб}
Менговирус 1%	32,48 \pm 0,31	32,40 \pm 0,27	30,60 \pm 0,16 ^{ааб}
Менговирус 0,1%	35,49 \pm 0,23	35,62 \pm 0,34	34,54 \pm 0,36

Примечание: * — различия статистически значимые, $p < 0,05$.

Как видно из Таблицы 2, пороговый цикл амплификаций менговируса зависел от способа выделения РНК, при этом достоверные различия наблюдались для средних значений, полученных при концентрациях 1%, 10% и 100%, главным образом при автоматическом способе выделения РНК. На основе данных калибровочных графиков (Рисунок 1) были рассчитаны их параметры для оценки приемлемости результатов. Данные представлены в Таблице 3.

При использовании автоматического способа калибровки значение коэффициента r^2 , характеризующего прямолинейность калибровочного графика, было немного выше, чем для ручного и полуавтоматического методов выделения РНК.

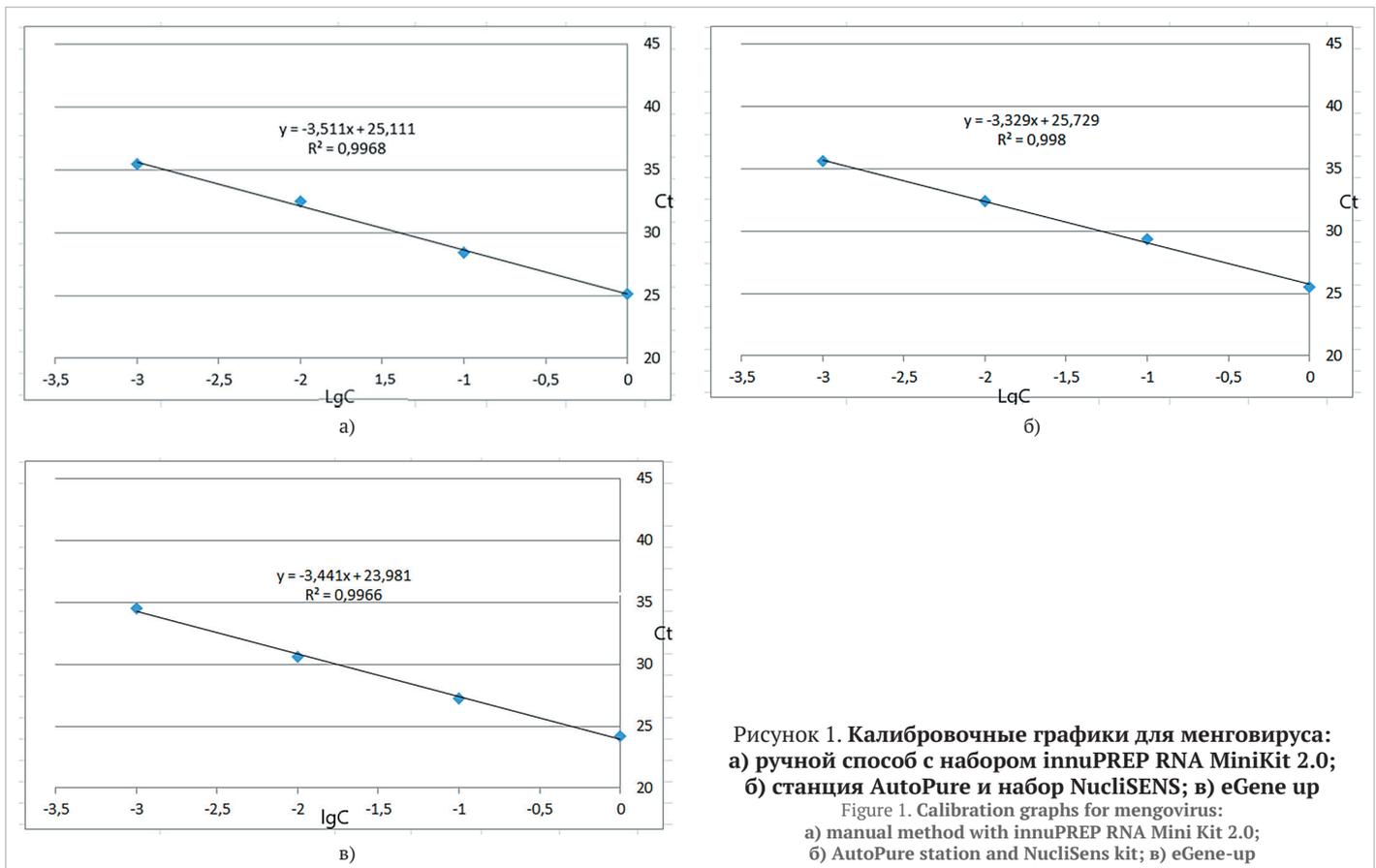


Таблица 3. Оценка параметров калибровочных графиков в зависимости от способа выделения РНК

Table 3. Assessment of parameters of calibration graphs depending on the method for RNA extraction

Способ выделения РНК менговируса	Коэффициент корреляции Пирсона (r^2)	Наклон (m)
Приемлемые значения	$>0,980$	От $-3,10$ до $-3,60$
Ручной способ с набором innuPREP RNA MiniKit 2.0	0,996	$-3,51$
Станция AutoPure и набор NucliSENS	0,998	$-3,33$
eGene up	0,996	$-3,44$

Полученные данные по корреляции между двумя переменными (r^2) показали высокие положительные линейные связи — от 0,996 до 0,998 в зависимости от способа выделения РНК. Наклон кривой находился в пределах от $-3,33$ до $-3,51$, что соответствовало приемлемым требованиям.

С использованием калибровочных графиков, полученных для серии разведений менговируса (Рисунок 1), были проведены дальнейшие исследования и оценена эффективность экстракции менговируса из различных пищевых матриц (малины, устриц и свиной печени) (Рисунок 2).

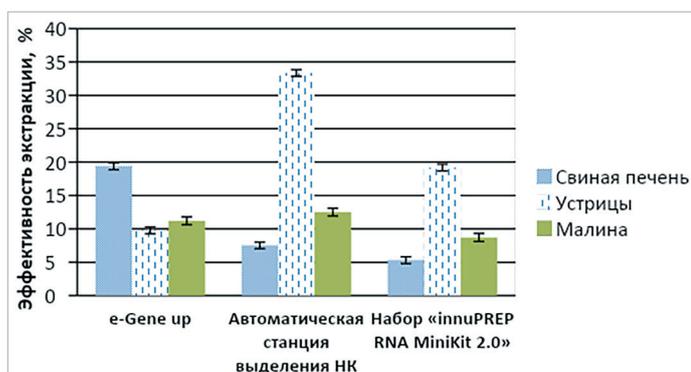


Рисунок 2. Эффективность экстракции менговируса из различных пищевых матриц

Figure 2. Efficiency of mengovirus extraction from various food matrices

Наибольшая эффективность экстракции менговируса из свиной печени наблюдалась при выделении РНК с помощью системы eGene up и составила 19,37%. Наименьшая эффективность экстракции наблюдалась при выделении РНК ручным способом — 5,31%. При экстракции РНК из устриц наибольшая эффективность была достигнута с использованием станции для выделения НК AutoPure и набора NucliSENS и составила 33,35%, а наименьшая экстракция наблюдалась при использовании системы eGene up и составила 9,78%. Эффективность экстракции вируса из малины находилась в пределах от 8,7% до 12,5%, где наименьшее значение было получено при экстракции РНК с помощью автоматической станции выделения НК.

Отмечена зависимость эффективности экстракции РНК от пищевой матрицы. Полуавтоматическая станция выделения НК eGene up показала наилучшую эффективность при экстрагировании РНК из свиной печени. Эффективность экстракции РНК автоматической станцией выделения из устриц была выше более чем в два раза по сравнению с другими матрицами. Такая же ситуация наблюдалась и при использовании ручного набора для получения НК, где эффективность экстракции РНК из устриц также была выше. Тем не менее следует отметить, что, согласно принятым стандартам, эффективность более 1% считается удовлетворительной, и все методы выделения РНК из пищевых матриц показали свою работоспособность.

Как отмечалось выше, выявление вирусов в пищевых продуктах является сложным и поэтапным процессом [18]. Примененный в настоящей работе полиэтиленгликоль (ПЭГ) для концентрирования вируса и удаления ингибиторов из ягод широко применяется в подобных исследованиях [14,20,21]. Ранее было показано, что метод прямой экстракции вирусов из малины позволил достичь значительно более высокой эффективности экстракции норовируса (46,2%) и F-специфического РНК-бактериофага GA, чем метод на основе осаждения ПЭГ [22]. Однако в другом сравнительном исследовании именно способ с однократной обработкой ПЭГ образцов малины показал наилучший результат по экстрагированию вирусов

и позволил обнаружить норовирус в концентрации 10^2 копий на 50 г замороженной малины [23]. Наше исследование также продемонстрировало, что подходы с использованием ПЭГ для извлечения вирусов из малины дают эффективный результат.

В связи с тем, что фрукты и ягоды содержат ингибиторы реакций, в том числе прямой цепной реакции (ПЦР), многие исследователи настаивают на необходимости дополнительной очистки экстрактов от ингибиторов. Так, Bartsch и соавторы [24] использовали колонки Mobispin S400 для очистки РНК, выделенной из клубники. Однако наши результаты показали, что малина как пищевая матрица для определения вирусов не представляет значительных трудностей. Выбранные подходы позволили провести достаточно успешную экстракцию вируса.

Для экстракции вируса из устриц был применен метод, основанный на расщеплении белков протеиназой К и высвобождении вирусных частиц в раствор. Мы получили эффективности экстракции контрольного вируса из этой пищевой матрицы от 9,78 до 33,35% в зависимости от способа экстракции РНК. В ряде других исследований показано, что в зависимости от выбранного подхода эффективность экстракции вируса из устриц может значительно варьироваться и составлять до 13,2% [25,26]. Среди предлагаемых методов извлечения вирусных частиц рассматриваются такие подходы, как прямое выделение нуклеиновых кислот из пищеварительных желез устриц, элюирование и концентрирование вируса, с различной чувствительностью и эффективностью извлечения [27,28,29]. Le и др. [30] разработали метод экстракции и количественного определения норовируса из моллюсков, основанный на экстракции РНК тризолом с последующей стадией очистки с применением цетилтриметиламмония бромидом и осаждения хлоридом лития. Этот метод обеспечил значительно более высокую эффективность по сравнению с методом экстракции протеиназой К, используемым в нашем исследовании. Тризол обладает превосходной способностью к лизису для экстракции вирусной РНК из моллюсков [30]. Однако этап разделения фаз и дополнительные этапы очистки делают метод более трудозатратным для аналитиков. Кроме того, дополнительные этапы потенциально могут приводить к потере вирусной РНК в процессе выделения. В рамках контроля безопасности приоритетными являются простые и доступные подходы по извлечению вирусов, позволяющие получить быстрый и достоверный результат о возможной контаминации.

Подбор эффективных методов извлечения генетического материала является первоочередной задачей для успешного выявления пищевых вирусов. Различные способы выделения нуклеиновых кислот по-разному эффективны, по этой причине их выбор для данной цели должен быть тщательно продуман [31,32]. Оценки и сравнения различных методов экстракции проводятся постоянно с различными типами образцов и вирусами-мишенями [33,34,35]. Считается, что ручная экстракция нуклеиновых кислот (НК) из образцов является наиболее трудоемкой среди современных методов экстракции НК. Ранее было показано, что использование автоматизированных способов экстракции НК считается приемлемым. Возможно, такой подход является превосходной заменой ручных методов: автоматизация позволяет сокращать рабочее время специалистов и снижать риск допущения ошибок, связанных с человеческим фактором [36,37]. Ручные методы извлечения НК по-прежнему остаются хорошей альтернативой для получения качественного генетического материала. Однако, например, при выделении РНК вируса из свиной печени автоматизированные системы показали более эффективный результат.

Так, Perrin и соавторы [22] установили, что применение автоматизированной системы вместо полуавтоматической системы NucliSENS MiniMAG, аналога eGene up, используемого в данном исследовании, позволило получить концентрацию вируса в среднем в 1,3 раза больше. В связи с этим можно предположить, что автоматизированная система извлекает вирусную РНК более эффективно, чем NucliSENS MiniMAG.

Экстракция с помощью автоматических систем является улучшением по сравнению с экстракцией ручными или полуавтоматическими методами с точки зрения удобства применения, хотя полученные результаты свидетельствуют о приемлемости использования и тех и других систем, согласно полученным результатам исследования эффективности экстракции с точки зрения извлечения РНК. Все три метода позволили эффективно провести выделение и очистку вируса (на примере менговируса). Полученные результаты показали, что все выбранные способы подходят для выделения и очистки РНК из пищевых продуктов. А возможность использования автоматической экстракции РНК может привести к значительному сокращению общего времени исследования.

Результаты оценки эффективности разных методов важны для определения эффективности экстракции нуклеиновых кислот и удаления ферментов ингибиторов, поскольку они оказывают непосредственное влияние на результат анализа амплификации.

Для проведения дальнейших исследований нами был сделан выбор в пользу автоматической станции выделения НК, так как полученные данные сравнительных исследований позволяют сделать вывод о ряде преимуществ автоматического метода.

3.2. Оценка распространенности вирусов в пищевых продуктах

Распространенность норовируса и гепатита Е оценивали в образцах продуктов, представленных на внутреннем рынке и выбранных с учетом распространенности пищевых вирусов в продовольствии [2,6,47]. Были исследованы: на норовирус — 52 образца устриц, 44 образца клубники и 31 образец малины; на гепатит Е — 82 образца свиной печени. Все образцы устриц, клубники и малины были проанализированы на наличие норовируса геногруппы GII, а образцы устриц дополнительно проверялись на наличие норовируса геногруппы GI. Для всех образцов в качестве контрольного вируса использовали менговирус. Учет результатов проводили только в тех образцах, где эффективность экстракции менговируса составляла более 1%.

В качестве примера ниже представлены кривые амплификации для положительных образцов (образец 9 при исследовании клубники (Рисунок 3а); образцы 6, 9, 11 и 12 при исследовании устриц (Рисунки 3б и 3в)). Значения Ct для положительных образцов находились в пределах до 40 циклов.

Наибольшая встречаемость норовируса GII была зафиксирована в устрицах и составила 7,7% от общего количества исследуемых образцов; на втором месте находилась клубника, где встречаемость норовируса GII составила 4,5% от исследуемых образцов. В образцах малины норовирус GII обнаружен не был. Также в образцах свиной печени не было выявлено гепатита Е (Таблица 4).

Таблица 4. Оценка выявляемости пищевых вирусов в продуктах питания

Table 4. Assessment of detection rate of foodborne viruses in food products

Вирус	Количество исследованных образцов, шт (% положительных к общему количеству исследованных образцов)				Общая
	Устрица (а)	Малина (б)	Клубника (в)	Свиная печень (г)	
Норовирус GI	45(0%)	–	–	–	45(0%)
Норовирус GII	52(9,6%)* [†]	31(0%)	44(6,8%)* [†]	–	127 (7,21%)
Гепатит Е	–	–	–	82(0%)	82(0%)

Примечание: * — различия статистически значимые, p < 0,05.

По результатам исследования образцов устриц было установлено, что среднее значение Ct в положительных образцах составляло $35,07 \pm 1,30$ циклов, в то время как минимальное значение Ct было 32,39, а максимальное — 39,88 циклов (Таблица 5). Для кривых амплификации при исследовании клубники значение Ct положительных образцов было установлено на более поздних циклах амплификации и находилось в пределах от 35,80 до 39,36 циклов, при этом среднее значение составило $37,13 \pm 1,12$ циклов. Чем меньше значение показателя Ct, тем выше нагрузка вирусной РНК в образце. Полученные данные свидетельствуют о различном количестве генетического материала в исследованных образцах.

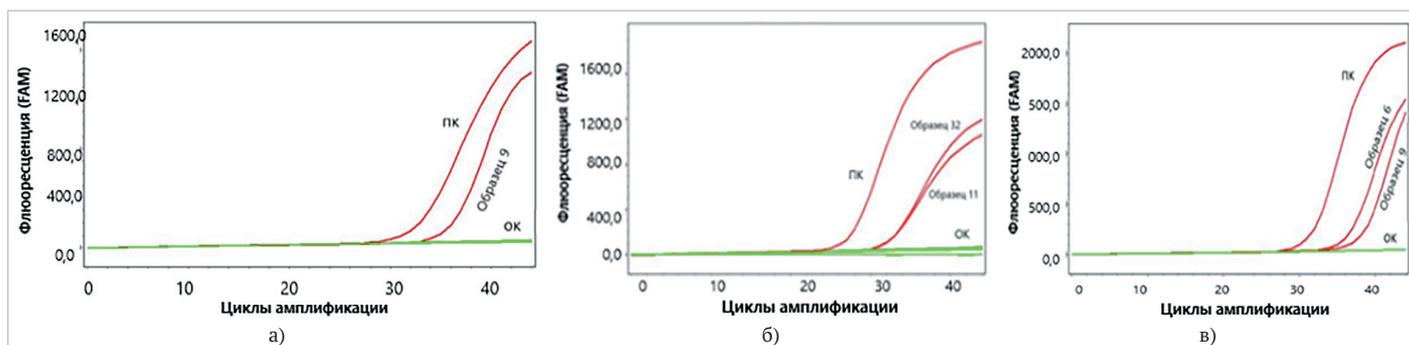


Рисунок 3. Кривые амплификации положительных образцов при исследовании на норовирус GII (ПК – положительный контроль, ОК – отрицательный контроль): а) клубника; б) и в) устрицы
Figure 3. Amplification curves of positive samples upon analysis for norovirus GII (ПК – positive control, ОК – negative control): а) strawberry; б) and в) oysters

Таблица 5. Значения Ct для образцов, положительных на норовирус GII

Table 5. Ct values for the samples positive for norovirus GII

Значение Ct	Устрицы	Клубника
Среднее ± стандартное отклонение	$35,07 \pm 1,30$	$37,13 \pm 1,12$
Минимальное	32,39	35,80
Максимальное	39,88	39,36

Моллюски и ягоды были установлены в качестве основных источников заражения человека норовирусом во многих зарубежных исследованиях [38,39,40]. Полученные результаты по исследованию устриц и клубники подтверждают актуальность мониторинга на норовирус этих продуктов на внутреннем рынке от отечественных производителей.

В нашей работе именно устрицы в большей степени были контаминированы норовирусом. Это может быть связано с тем, что устрицы способны биоаккумулировать вирусы в своих пищеварительных тканях из-за присутствия антигенов, подобных человеческой гистогруппе крови (HBGA-подобные антигены) [7,41]. Такая ситуация представляет опасность для здоровья населения, поскольку устрицы и мидии часто употребляются в сыром или недоваренном виде. В трудах зарубежных ученых количество инфицированных норовирусом устриц превышает показатели, приведенные в нашей работе. Так, в исследовании [41] 53,1% образцов мидий дали положительный результат на РНК норовируса, при этом 31,6% всех образцов показали одновременное присутствие как норовируса GI, так и норовируса GII. В устрицах РНК норовируса была обнаружена в 31,6% образцов с одновременным присутствием РНК норовируса GI и GII в 10,2% образцов [41]. Генотип норовируса GI в нашем исследовании обнаружен не был, хотя норовирус GII признан вирусом, наиболее часто выявляемым в образцах пищевых продуктов [37].

Распространенность норовируса GII в клубнике отечественного производства была ниже, чем в других странах, при мониторинге различных ягод на наличие вируса. Так, исследование 900 образцов замороженных и 900 образцов свежих ягод, используемых для внутреннего потребления в Китае в 2016–2017 годах, показало, что РНК норовируса была обнаружена в 109 образцах свежих ягод (12,1%) [42]. В Соединенном Королевстве в ходе анализа 310 образцов свежей малины и 274 образцов замороженной малины семь образцов свежей малины (2,3%) и 10 образцов замороженной малины (3,6%) дали положительный результат на РНК норовируса [43]. Возможно, такие небольшие значения присутствия норовируса в нашем исследовании связаны с относительно небольшой выборкой образцов.

Инфицирование гепатитом Е может происходить несколькими путями. В развивающихся странах основным способом передачи по-прежнему остается употребление фекально загрязненной воды. Однако в промышленно развитых странах основным путем заражения является потребление загрязненных пищевых продуктов [44,45]. Гепатит Е не был обнаружен ни в одном из исследованных образцов. Схожие результаты были получены в Словении при мониторинге распространенности гепатита Е в продуктах убоя свиней в возрасте старше 6 месяцев, где его распространенность составила всего 0,25% [46]. Однако опубликованные данные из других европейских стран показывают высокую распространенность гепатита Е среди продуктов переработки свиной печени. Например, при исследовании, проведенном во Франции, было выявлено 17,3% продуктов, содержащих свиную печень и имеющих положительный результат на гепатит Е

[47]. Авторами Di Bartolo с соавторами [48] гепатит Е был обнаружен в сосисках, продаваемых в Испании и Италии, а также в печени и сосисках, продаваемых в Германии [48]. Кроме того, вирус также был выявлен в 59 образцах свиной печени из 345 образцов (17,1%), полученных и протестированных из трех различных округов Сербии [49].

Еще раз подчеркнем, что в отечественных образцах свиной печени вирус гепатита Е обнаружен не был. Возможно, это связано с практикой уоя свиней в возрасте старше 6 месяцев. Согласно литературным данным, наибольший риск присутствия гепатита Е установлен для продуктов уоя свиней младше 6 месяцев [46]. Тем не менее, несмотря на то, что мы не получили положительных результатов по гепатиту Е, мониторинг свиной печени на наличие вируса и других групп пищевых продуктов, имеющих риск контаминации гепатитом Е, целесообразно продолжить для обеспечения безопасности и здоровья людей.

4. Выводы

Проведенные исследования позволили установить эффективность различных подходов к экстракции вирусов из пищевых матриц. Наиболее высокая эффективность (33,35%) наблюдалась при экстракции менговируса из устриц с использованием автоматической станции выделения НК. При этом минимальные значения эффективности экстракции менговируса во всех случаях были выше критического значения (1%), что свидетельствовало о возможности использования исследованных подходов при контроле пищевых продуктов высокого риска. Проведенный мониторинг образцов продуктов показал высокую распространенность норовируса ГII в образцах устриц и клубники — 9,6% и 6,8% соответственно. Таким образом, полученные данные показывают возможность и необходимость постоянного мониторинга распространения пищевых вирусов в ряде пищевых продуктов, представленных на внутреннем рынке.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Bachofen, C. (2018). Selected viruses detected on and in our food. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 143–153. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0087-9>
- Predmore, A., Li, J. (2011). Enhanced removal of a human norovirus surrogate from fresh vegetables and fruits by a combination of surfactants and sanitizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4829–4838. <https://doi.org/10.1128/AEM.00174-11>
- King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabaraz, D., Fox, E. M. et al. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 68, 160–175. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.014>
- Widén, F., Vågsholm, I., Belák, S., Muradrasoli, S. (2011). Achievement V—Methods for breaking the transmission of pathogens along the food chain: Detection of viruses in food. *Trends in Food Science and Technology*, 22 (Suppl 1), S49–S57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.008>
- Chen, J., Wu, X., Sanchez, G., Randazzo, W. (2020). Viability RT-qPCR to detect potentially infectious enteric viruses on heat-processed berries. *Food Control*, 107, Article 106818. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106818>
- Le Guyader, F. S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K. O., Alsterlund, R., Pommepuy, M. et al. (2004). Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.018>
- Le Guyader, F. S., Atmar, R. L., Le Pendu, J. (2012). Transmission of viruses through shellfish: When specific ligands come into play. *Current Opinion in Virology*, 2(1), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029>
- Yekta, R., Vahid-Dastjerdi, L., Norouzbeigi, S., Mortazavian, A. M. (2021). Food products as potential carriers of SARS-CoV-2. *Food Control*, 123, Article 107754. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107754>
- Djekic, I., Nikolić, A., Uzunović, M., Marijke, A., Liu, A., Han, J. et al. (2021). Covid-19 pandemic effects on food safety — Multi-country survey study. *Food Control*, 122, Article 107800. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107800>
- Miranda, R. C., Schaffner, D. W. (2019). Virus risk in the food supply chain. *Current Opinion in Food Science*, 30, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.002>
- Hrdy, J., Vasickova, P. (2022). Virus detection methods for different kinds of food and water samples—The importance of molecular techniques. *Food Control*, 134, Article 108764. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108764>
- Sun, B., Bosch, A., Myrnel, M. (2019). Extended direct lysis method for virus detection on berries including droplet digital RT-PCR or real time RT-PCR with reduced influence from inhibitors. *Journal of Virological Methods*, 271, Article 115638. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.004>
- Wei, T., Lu, G., Clover, G. (2008). Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. *Journal of Virological Methods*, 151(1), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.003>
- Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R. (2013). Detection and typing of norovirus from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany. *Food and Environmental Virology*, 5, 162–168. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9118-0>
- Widén, F. (2016). Hepatitis E as a zoonosis. Chapter in a book: *Hepatitis E Virus. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Dordrecht, 2016. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0942-0_4
- Meng, X. J. (2010). Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.017>
- Hamza, I. A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M. (2011). Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 424–436. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.07.014>
- Teixeira, P., Costa, S., Brown, B., Silva, S., Rodrigues, R., Valerio, E. (2020). Quantitative PCR detection of enteric viruses in wastewater and environmental water sources by the Lisbon municipality: A case study. *Water*, 12(2), Article 544. <https://doi.org/10.3390/w12020544>
- Farkas, K., Cooper, D. M., McDonald, J. E., Malham, S. K., de Rougemont, A., Jones, D. L. (2018). Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Science of the Total Environment*, 654, 1174–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.038>
- Butot, S., Putallaz, T., Sanchez, G. (2007). Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 186–192. <https://doi.org/10.1128/AEM.01248-06>
- Scherer, K., Johne, R., Schrader, C., Ellerbroek, L., Schulenburg, J., Klein, G. (2010). Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. *Journal of Virological Methods*, 169(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.06.008>
- Perrin, A., Loutreuil, J., Boudaud, N., Bertrand, I., Gantzer, C. (2015). Rapid, simple and efficient method for detection of viral genomes on raspberries. *Journal of Virological Methods*, 224, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.005>
- Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J. (2008). Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.020>
- Bartsch, C., Szabo, K., Dinh-Thanh, M., Schrader, C., Trojnar, E., Johne, R. (2016). Comparison and optimization of detection methods for noroviruses in frozen strawberries containing different amounts of RT-PCR inhibitors. *Food Microbiology*, 60, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.005>
- Lowther, J. A., Bosch, A., Butot, S., Ollivier, J., Mäde, D., Rutjes, S. A. et al. (2019). Validation of EN ISO method 15216 — Part 1 — Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 288, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.014>
- Suffredini, E., Magnabosco, C., Civettini, M., Rossetti, E., Arcangeli, G., Croci, L. (2012). Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 686–692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05356.x>
- Gyawali, P., Kc, S., Beale, D. J., Hewitt, J. (2019). Current and emerging technologies for the detection of norovirus from shellfish. *Foods*, 8(6), Article 187. <https://doi.org/10.3390/foods8060187>
- Chung, S. H., Baek, C., Cong, V. T., Min, J. (2015). The microfluidic chip module for the detection of murine norovirus in oysters using charge switchable micro-bead beating. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.083>
- Kingsley, D. H. (2014). High pressure processing of bivalve shellfish and HPP's use as a virus intervention. *Foods*, 3(2), 336–350. <https://doi.org/10.3390/foods3020336>
- Le, H. Q., Suffredini, E., Pham, D. T., To, A. K., Medici, D. D. (2018). Development of a method for direct extraction of viral RNA from bivalve molluscs. *Letters in Applied Microbiology*, 67(5), 426–434. <https://doi.org/10.1111/lam.13065>
- Ambrosi, C., Prezioso, C., Checconi, P., Scribano, D., Sarshar, M., Capannari, M. et al. (2021). SARS-CoV-2: Comparative analysis of different RNA extraction methods. *Journal of Virological Methods*, 287, Article 114008. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114008>
- Griffin, D. W., Donaldson, K. A., Paul, J. H., Rose, J. B. (2005). Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 129–143. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.1.129-143.2003>
- Rajjuddin, S. M., Jensen, T., Hansen, T. B., Schultz, A. C. (2020). An optimised direct lysis method for viral RNA extraction and detection of foodborne viruses on fruits and vegetables. *Food and Environmental Virology*, 12(3), 226–239. <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09437-x>
- Hennechart-Collette, C., Dehan, O., Fraise, A., Martin-Latil, S., Perelle, S. (2023). Development of an extraction method to detect hepatitis A Virus, hepatitis E Virus, and noroviruses in fish products. *Microorganisms*, 11(3), Article 624. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030624>
- Greene, S. R., Moe, C. L., Jaykus, L. A., Cronin, M., Grosso, L., van Aarle, P. (2003). Evaluation of the NucliSens basic kit assay for detection of Norwalk virus RNA in stool specimens. *Journal of Virological Methods*, 108(1), 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00286-0)
- Persson, S., Nybögård, L., Simonsson, M., Eriksson, R. (2020). Optimisation and evaluation of an automated system for extraction of viral RNA from oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 315, Article 108386. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108386>
- Steele, M., Lambert, D., Bissonnette, R., Yamamoto, E., Hardie, K., Locas, A. (2022). Norovirus GI and GII and hepatitis A virus in berries and pomegranate arils in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 379, Article 109840. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109840>
- Bernard, H., Faber, M., Wilking, H., Haller, S., Höhle, M., Schielke, A. et al. (2014). Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *Eurosurveillance*, 19(8), Article 20719. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.8.20719>

38. Bozkurt, H., Phan-Thien, K.-Y., van Ogtrop, F., Bell, T., McConchie, R. (2021). Outbreaks, occurrence, and control of norovirus and hepatitis A virus contamination in berries: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(1), 116–138. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1719383>
39. Pouillot, R., Smith, M., Van Doren, J. M., Catford, A., Holtzman, J., Calci, K. R. et al. (2022). Risk assessment of norovirus illness from consumption of raw oysters in the United States and in Canada. *Risk Analysis*, 42(2), 344–369. <https://doi.org/10.1111/risa.13755>
40. Dirks, R. A. M., Jansen, C. C. C., Hägele, G., Zwartkruis-Nahuis, A. J. T., Tijssma, A. S. L., Boxman, I. L. A. (2021). Quantitative levels of norovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs collected along the food chain in the Netherlands, 2013–2017. *International Journal of Food Microbiology*, 344, Article 109089. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109089>
41. Gao, X., Wang, Z., Wang, Y., Liu, Z., Guan, X., Ma, Y. et al. (2019). Surveillance of norovirus contamination in commercial fresh/frozen berries from Heilongjiang Province, China, using a TaqMan real-time RT-PCR assay. *Food Microbiology*, 82, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.017>
42. Cook, N., Williams, L., D'Agostino, M. (2019). Prevalence of Norovirus in produce sold at retail in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 79, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.005>
43. Moor, D., Liniger, M., Baumgartner, A., Felleisen, R. (2018). Screening of ready-to-eat meat products for hepatitis E virus in Switzerland. *Food and Environmental Virology*, 10(3), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9340-x>
44. Park, W.-J., Park, B.-J., Ahn, H.-S., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Song, C.-S. et al. (2016). Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. *Journal of Veterinary Science*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.1.1>
45. Lainšček, P. R., Toplak, I., Kirbiš, A. (2017). A comprehensive study of hepatitis E virus infection in pigs entering a slaughterhouse in Slovenia. *Veterinary Microbiology*, 212, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.002>
46. Pavio, N., Merbah, T., Thébault, A. (2014). Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1925–1927. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140891>
47. Di Bartolo, I., Angeloni, G., Ponterio, E., Ostanello, F., Ruggeri, F. M. (2015). Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.005>
48. Milojević, L., Velebit, B., Teodorović, V., Kirbiš, A., Petrović, T., Karabasil, N. et al. (2019). Screening and molecular characterization of hepatitis E virus in slaughter pigs in Serbia. *Food and Environmental Virology*, 11(4), 410–419. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09393-1>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
<p>Юшина Юлия Константиновна — доктор технических наук, руководитель лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 402) E-mail: yu.yushina@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9265-5511 * автор для контактов</p>	<p>Yuliya K. Yushina, Doctor of Technical Sciences, Head of laboratory of Hygiene of Production and Microbiology, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str. 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (402) E-mail: yu.yushina@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9265-5511 * corresponding author</p>
<p>Семенова Анастасия Артуровна — доктор технических наук, профессор, заместитель директора, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 105) E-mail: a.semenova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4372-6448</p>	<p>Anastasia A. Semenova, Doctor of Technical Sciences, Professor, Deputy Director, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems. 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (105) E-mail: a.semenova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4372-6448</p>
<p>Кузнецова Оксана Александровна — доктор технических наук, директор, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 106) E-mail: o.kuznecova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7474-485X</p>	<p>Oksana A. Kuznecova, Doctor of Technical Sciences, Director, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (106) E-mail: o.kuznecova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7474-485X</p>
<p>Сатабаева Дагмара Мухмадовна — инженер исследователь, лаборатория «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 405) E-mail: d.satabaeva@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-2306-7772</p>	<p>Dagmara M. Satabaeva, Research Engineer, laboratory of Hygiene of Production and Microbiology, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (405) E-mail: d.satabaeva@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-2306-7772</p>
<p>Зайко Елена Викторовна — кандидат технических наук, младший научный сотрудник, лаборатория «Гигиена производства и микробиологии», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 407) E-mail: e.zaiko@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5048-9321</p>	<p>Elena V. Zaiko, Candidate of Technical Sciences, Junior Research Assistant, Laboratory of Hygiene of Production and Microbiology, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (407) E-mail: e.zaiko@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5048-9321</p>
<p>Велебит Бранко — магистр медицинских наук, главный научный сотрудник, Руководитель отдела микробиологии и молекулярной биологии, Институт гигиены и технологии мяса 11040, Сербия, Белград, ул. Kačanskog, 13 Тел.: +381-11-2650-722 E-mail: branko.velebit@inmes.rs ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7577-8074</p>	<p>Branko Velebit, M. Sc. DVM, Principal Research Fellow, Head of Department of Microbiology and Molecular Biology, Institute of meat hygiene and technology Kačanskog 13, 11040 Belgrade, Serbia Tel.: +381-11-2650-722 E-mail: branko.velebit@inmes.rs ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7577-8074</p>
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.