Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии РЦГЭиОЗ

Международная научно-практическая конференция «Здоровье и окружающая среда», приуроченная к 100-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь, 19-20.11.2026

Сателлитная конференция «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии»

Сравнительная оценка методов экстракции вируса клещевого энцефалита из молочной продукции

Климович О.В., Семенов С.Ф., Лютина Я.В., Змушко А.С.

Алиментарные случаи заражения вирусом клещевого энцефалита (далее – ВКЭ) рассматриваются как значимый фактор, способствующий общему росту заболеваемости. Для алиментарного пути заражения характерны семейные случаи и небольшие вспышки, связанные с употреблением сырых молочных продуктов от инфицированных животных , таких как козы, овцы и коровы. Обнаружение вирусов в сложных многокомпонентных жидкостях, таких как молоко, является сложной задачей и не всегда дает успешный результат, в связи с чем требует оптимизации.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить эффективность различных методов экстракции РНК ВКЭ из сырого козьего молока, искусственно контаминированого ВКЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментальном исследовании использовали образцы сырого козьего молока, искусственно контаминированные серией десятикратных разведений ВКЭ.

Вирусная РНК из всех образцов была экстрагирована с использованием трех различных методов: метод магнитной сорбции, метод преципитации, колоночная технология.

Образцы анализировали на наличие РНК ВКЭ методом ОТ-ПЦР-РВ. Использовали два вида контроля: внутренний контроль амплификации (ВК) и контроль процесса (КП). Для оценки влияния ингибиторов на результаты ПЦР использовали коммерческий экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО STI-87-rec), в качестве контроля процесса использовали штамм ВКЭ «TBEV/168/2025» с исходным титром 7,5 $lgТЦД_{50}$/мл.

Степень извлечения (recovery rate, RR) вируса рассчитывали в соответствии со стандартом ISO 15216-2:2019 по формуле $RR = 10^{(\Delta Cq/m)}*100\%$, где $\Delta Cq = Cq_{матрицы} - Cq_{инокулята}$ ($Cq_{матрицы}$ – значение Cq для РНК ВКЭ, выделенной из матрицы; $Cq_{инокулята}$ – значение Cq для РНК ВКЭ, выделенной из инокулята), m — наклон стандартной кривой, построенной для РНК ВКЭ в контрольном инокуляте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показана возможность применения стандарта ISO 15216-2:2019, как математического инструмента, для оценки эффективности различных методов экстракции РНК ВКЭ из сложных многокомпонентных матриц, таких как молоко и молочная продукция.

Метод магнитной сорбции может быть рекомендован в качестве оптимального метода для экстракции РНК ВКЭ из молока и молочной продукции, так как демонстрирует достаточную эффективность извлечения РНК и отсутствие влияния ингибиторов на результаты ПЦР-РВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основе результатов ПЦР-РВ для серии десятикратных разведений РНК, выделенной из вирусных суспензий, построена стандартная кривая (рисунок). Рассчитанное значение наклона стандартной кривой (m) составило -4,18.

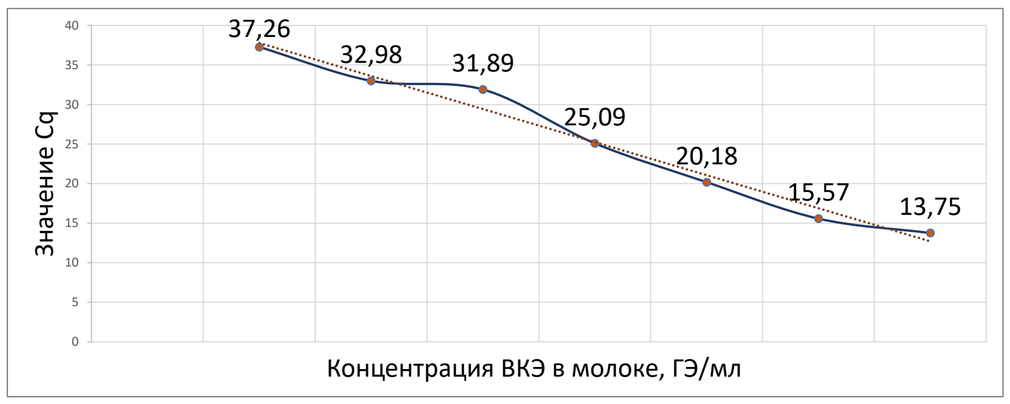


Рисунок – Стандартная кривая для серии десятикратных разведений ВКЭ

В таблице представлены значения Cq, полученные по результатам ПЦР-РВ для каждого экспериментального условия.

Таблица. Сравнительное ПЦР-исследование серии экспериментальных условий

Образец	Разведение ВКЭ	Концентрация ВКЭ в молоке, ГЭ/мл	Значения Cq					
			Метод магнитной сорбции		Метод преципитации		Колоночная технология	
			ВК	**КП**	**ВК**	**КП**	**ВК**	**КП**
1	10^{-1}	$3,16*10^{7}$	27,91	18,37	28,81	33,42	н/о	29,94
2	10^{-2}	$3,16*10^{6}$	28,12	21,31	н/о	37,71	н/о	32,14
3	10^{-3}	$3,16*10^{5}$	27,77	24,29	н/о	н/о	н/о	33,62
4	10^{-4}	$3,16*10^{4}$	27,89	27,65	35,72	н/о	н/о	36,57
5	10^{-5}	$3,16*10^{3}$	27,92	32,88	н/о	н/о	н/о	36,96
6	10^{-6}	$3,16*10^{2}$	28,04	34,06	н/о	н/о	н/о	н/о
7	10^{-7}	31,6	27,74	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

Показатели выхода (RR) для РНК ВКЭ при использовании метода магнитной сорбции составили 7,8%, при использовании метода преципитации – 0,002%, колоночной технологии – 0,01%.

Предел обнаружения установлен на уровне:

- $3,16*10^{2}$ ГЭ/мл для метода магнитной сорбции;
- $3,16*10^{6}$ ГЭ/мл для метода преципитации;
- $3,16*10^{3}$ ГЭ/мл для колоночной технологии.



rcpba@belriem.by