

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

Н.П.Жукова

12.06.2018

Регистрационный № 002-0318

МЕТОД ОЦЕНКИ ПРОТОЗООЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ И АНТИСЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ – РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Горбунов В.А.; к.б.н. Фомина Е.Г.; к.б.н. Григорьева Е.Е.;
к.м.н., доцент Гудков В.Г.; Карамышева Ю.С.; Пугач В.В.;
Шишпорёнок Ю.А.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки протозооцидной активности дезинфицирующих и антисептических средств, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику паразитарных заболеваний протозойной этиологии.

Настоящая инструкция предназначена для применения в организациях здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, и иных организациях, проводящих оценку протозооцидной активности дезинфицирующих и антисептических средств на этапе их разработки и государственной регистрации.

Показания к применению метода:

проведение комплекса санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение возникновения и распространения паразитарных заболеваний протозойной этиологии;

реализация мероприятий по разработке, государственной регистрации и применению дезинфицирующих и антисептических средств.

Противопоказания для применения метода отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И РЕАКТИВОВ

Медицинская техника:

термоциклер с оптическим модулем для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР);

ПЦР – бокс с УФ – рециркулятором воздуха;

микроскоп медицинский;

центрифуга настольная лабораторная;

микроцентрифуга;

камера Горяева;
весы лабораторные электронные;
миницентрифуга – вортекс;
холодильник (от +2 °С до +8 °С) с морозильной камерой (–20 °С);
термостат твёрдотельный;
дозаторы пипеточные механические переменного объёма, комплект
(2 – 20 мкл; 5 – 50 мкл; 20 – 200 мкл; 100 – 1000 мкл).

Изделия медицинского назначения:
стекла предметные;
пробирки пластиковые типа «Фальконе» (10 мл, 50 мл);
пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл);
микропробирки для проведения ПЦР, соответствующие типу
используемого термоциклера (0,2 мл);
наконечники полимерные для дозаторов пипеточных;
штативы для пробирок;
набор реагентов для выявления цист простейших в копроматериале
на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального
времени;
ПЦР – смесь 2 х SYBR Green;
набор реагентов для проведения обратной транскрипции.

Реактивы:
олигонуклеотиды синтетические (AG4F 5'–AGCTTTTGAATGGC
TAA–3'; AG8R 5'–GGGTAATTAGATGATTAATAC–3');
протеиназа К (20 мкг/мл);
ДНКаза I с буфером;
вода деионизированная, стерильная, свободная от нуклеаз;

натрия хлорид (NaCl);
натрия додецилсульфат (ДСН);
трис(гидроксиметил)аминометан (Трис);
этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА);
фенол;
хлороформ;
изопропанол;
этиловый спирт.

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-биологических исследований.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление растворов.

Натрия хлорид 0,9 % (0,9 г NaCl растворить в 100 мл воды).

Натрия хлорид 5 М (29,2 г NaCl растворить в 89,4 мл воды).

Натрия додецилсульфат 10 % (10 г ДСН растворить в 91,8 мл воды).

Трис HCl 1 М рН 8,0 (12,11 г Трис растворить в 80 мл воды, довести рН до 8,0 концентрированной соляной кислотой, добавить воду до 100 мл, профильтровать через фильтр 0,22 мкм, хранить при +4 °С).

ЭДТА 0,5 М рН 8,0 (18,61 г ЭДТА растворить в 80 мл воды, подогреть раствор до 65 °С, довести рН до 8,0 концентрированной щёлочью, добавить воду до 100 мл, профильтровать через фильтр 0,22 мкм, хранить при +4 °С).

ТЕ буфер (10 мМ Трис HCl, 1 мМ ЭДТА рН 8,0) (в 80 мл воды добавить 1 мл Трис HCl 1 М рН 8,0; 200 мкл ЭДТА 0,5 М рН 8,0; довести объём водой до 100 мл, профильтровать через фильтр 0,22 мкм, хранить при +4 °С).

Буфер А (10 мМ Трис НСl; 10 мМ ЭДТА рН 8,0; 1% ДСН) (в 80 мл воды добавить 1 мл Tris НСl 1 М рН 8,0; 2 мл ЭДТА 0,5 М рН 8,0; 10 мл 10 % раствора ДСН; довести объём водой до 100 мл, готовить перед применением).

Приготовление образцов для исследования.

Отбор положительных / отрицательных образцов копроматериала, содержащих / не содержащих ооцисты *Cryptosporidium parvum*, проводят с использованием набора реагентов для выявления цист простейших в копроматериале на основе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени согласно инструкции производителя.

Из положительной и отрицательной пробы копроматериала готовят 10 % фекальную суспензию (1 г фекалий тщательно ресуспендируют в 10 мл 0,9 % NaCl). На суспензию аккуратно наслаивают равный объём насыщенного 5 М раствора NaCl. Пробу центрифугируют при 8000 об/мин в течение 10 мин. Материал, находящийся в области разделения сред по плотности, собирают и дважды промывают равными объёмами 0,9 % NaCl, осаждая при 8000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, добавляют к осадку 200 мкл 0,9 % NaCl и оценивают наличие или отсутствие ооцист микроскопированием с использованием камеры Горяева, в соответствии с инструкцией по ее применению, методом световой микроскопии (объектив – 10×, окуляр – 10×). Расчет количества ооцист в единице объема (мл) проводят по формуле: $X = a \times 4000 \times b / c$, где X – концентрация ооцист простейших, шт/мл; a – количество подсчитанных ооцист простейших, шт; 4000 – коэффициент пересчета количества ооцист на 1 мкл; b – кратность разведения жидкости; c – количество малых квадратов сетки камеры Горяева, в которых осуществляется подсчет ооцист простейших, шт.

Положительный образец – взвесь ооцист криптоспоридий с концентрацией не менее 10^5 ооцист/мл в 0,9 % растворе NaCl, не подвергается обработке исследуемыми дезинфицирующими и антисептическими средствами.

Экспериментальный образец – аликвота положительного образца, подвергающаяся на соответствующем этапе обработке исследуемыми дезинфицирующими и антисептическими средствами (исследования проводят в трёх повторах).

Отрицательный образец – проба, которая не содержит ооцист криптоспоридий, основой для её получения служит заведомо отрицательная проба фекалий, которая проходит все стадии пробоподготовки.

Рекомендуемый объём образца на одно исследование – 30 мкл.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ МЕТОДА

Реализация метода, изложенного в инструкции, осуществляется в три этапа.

1. Обработка экспериментальных образцов дезинфицирующими и антисептическими средствами.

В соответствии с концентрацией раствора и временем воздействия, указанными в инструкции по применению дезинфицирующих и антисептических средств, проводят в пробирке их экспозицию (в трёх повторах) с экспериментальными образцами. Обработанные образцы, а также положительный и отрицательный образцы (не подвергавшиеся обработке) центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут, осадок промывают дважды в 1 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают с 200 мкл ТЕ буфера.

2. Выделение генетического материала (РНК).

Выделение РНК проводится из положительного, отрицательного и экспериментальных образцов, согласно следующей методике:

к 200 мкл образца добавляют 500 мкл буфера А и прогревают 60 мин при 65 °С, периодически встряхивая на вортексе;

к полученной смеси прибавляют 5 мкл протеиназы К (20 мкг/мл), инкубируют 120 мин при 65 °С, периодически встряхивая на вортексе;

пробу переносят в ледяную баню (+4 °С) на 15 мин;

в пробирку вносят 500 мкл смеси фенол-хлороформ (1:1), встряхивают на вортексе 20 с, центрифугируют при 12000 x g в течение 5 мин;

верхнюю фазу переносят в новую пробирку, добавляют 500 мкл хлороформа, встряхивают на вортексе 20 с, центрифугируют при 12000 x g в течение 5 мин;

верхнюю фазу переносят в новую пробирку и добавляют 500 мкл охлаждённого до – 20 °С изопропанола, встряхивают на вортексе 20 с, центрифугируют при 12000 x g в течение 15 мин;

осадок РНК растворяют в 200 мкл 1x буфера для ДНКазы I. В раствор вносят 20 мкл (20 единиц активности) ДНКазы I, инкубируют 10 мин при комнатной температуре. Повторяют обработку фенол-хлороформом и промывают РНК в 1 мл 75 % этанола, центрифугируют при 12000 x g в течение 5 мин, надосадок удаляют, РНК подсушивают и растворяют в 50 мкл воды или TE буфера.

3. Постановка обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Реакцию обратной транскрипции проводят со специфическим олигонуклеотидом AG8R с использованием набора реагентов для

постановки обратной транскрипции согласно прилагаемой к набору инструкции.

Полимеразную цепную реакцию проводят при следующих условиях: 95 °С – 2 мин, 1 цикл; 94 °С – 0:30 мин, 50 °С – 0:30 мин, 72 °С – 1 мин, 40 циклов; 72 °С – 5 мин, 1 цикл.

Реакционная смесь на одно исследование в объёме 25 мкл содержит следующие компоненты:

Вода	9 мкл
ПЦР – смесь 2 x SYBR Green	12,5 мкл
Олигонуклеотид AG4F 15pM	0,5 мкл
Олигонуклеотид AG8R 15pM	0,5 мкл
кДНК	2,5 мкл

Учёт результатов проводят сравнением циклов пересечения с пороговой линией кривых флюоресцентного сигнала положительного, отрицательного и экспериментальных образцов, после обработки дезинфицирующими и антисептическими средствами. Результаты учитывают при наличии чётко детектируемого сигнала флюоресценции положительного образца и отсутствии его у отрицательного образца.

Протозооцидной активностью обладают вещества, экспозиция взвеси цист с которыми приводит к отсутствию детектируемого сигнала флюоресценции (кривая флюоресценции не пересекает пороговую линию или пересекает её позже отрицательного контрольного образца).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Использование метода ПЦР подразумевает строгое следование всем правилам организации и проведения исследований в ПЦР-лаборатории. При определении протозооцидной активности дезинфицирующих и

антисептических средств с помощью настоящего метода возможны следующие осложнения и/или ошибки:

отсутствует сигнал амплификации в положительных пробах – отсутствие специфического сигнала в препарате положительного контроля может быть следствием деградации ДНК/РНК на одном из этапов исследования и/или внесения в реакционную смесь ингибиторов реакции. Пути устранения: выделить ДНК/РНК повторно, строго следуя инструкции, соблюдая холодовую цепь; на всех этапах исследования необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции;

присутствует сигнал амплификации в отрицательных пробах – наличие специфического сигнала в препарате отрицательного контроля свидетельствует о контаминации проб. Пути устранения: соблюдение пространственного разделения рабочих зон; работа только в одноразовых перчатках и их смена при переходе из одной зоны в другую; использование отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон;

большая разбежка (более одного цикла) в пробах-дублях экспериментальных образцов – следует проверить совместимость дозаторов и применяемых наконечников.