

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения  
Главный государственный санитарный  
врач Республики Беларусь

  
Н.П. Жукова

« 12 » августа 201 8 г.

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

**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: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. В. А. Горбунов, канд. биол. наук Е. Г. Фомина,  
канд. биол. наук Е. Е. Григорьева, канд. мед. наук, доц. В. Г. Гудков,  
Ю. С. Карамышева, В. В. Пугач, Ю. А. Шишпорёнок

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**

- 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**

Отсутствуют.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

*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 до +8 °С) с морозильной камерой (–20 °С);

- термостат твердотельный;

- дозаторы пипеточные механические переменного объема, 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 x 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 HCl; 10 мМ ЭДТА, рН 8,0; 1% ДСН) (в 80 мл воды добавить 1 мл Трис HCl 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 % растворе 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 объемами 0,9 % растворе NaCl, осаждая при 8000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, добавляют к осадку 200 мкл 0,9 % растворе 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 трех повторах).

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

Рекомендуемый объем образца на одно исследование — 30 мкл.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 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 трех повторах) с экспериментальными образцами. Обработанные образцы, а также положительный и отрицательный образцы (не подвергавшиеся обработке) центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин, 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 охлажденного 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 объеме 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

Учет результатов проводят путем сравнения циклов пересечения с пороговой линией кривых флюоресцентного сигнала положительного, отрицательного и экспериментальных образцов после обработки дезинфицирующими и антисептическими средствами. Результаты учитывают при наличии четко детектируемого сигнала флюоресценции в положительном образце и отсутствии его в отрицательном.

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

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ 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.