3.5.5. ДЕЗИНФЕКЦИОННЫЕ СРЕДСТВА И ТЕХНОЛОГИИ

Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР

Методические указания
МУ 3.5.5.1034—01

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.9
О13

О13 **Обеззараживание** исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001.—8 с.

1. Разработаны Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» (Куличенко А. Н., Касьян И. А., Гаранина С. Б., Майоров Н. В., Тучков И. В., Еремин С. А., Дроздов И. Г., Кутырев В. В.).

2. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 23.05.01.

3. Введены впервые.

Редакторы Кожока Н. В., Акопова Н. Е.
Технический редактор Климова Г. И.

Подписано в печать 19.11.01

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,5

Тираж 3000 экз. Заказ 46

ЛР № 021232 от 23.06.97 г.
Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован Издательским отделом Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11. Отделение реализации, тел. 198-61-01

© Минздрав России, 2001
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001

Содержание

1. Область применения 4
2. Введение 4
3. Нормативные ссылки 5
4. Описание метода 5
5. Способы обеззараживания материала, исследуемого методом ПЦР 7

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации – Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
23 мая 2001 г.
МУ 3.5.5.1034—01
Дата введения: 1 октября 2001 г.

3.5.5. ДЕЗИНФЕКЦИОННЫЕ СРЕДСТВА И ТЕХНОЛОГИИ

Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР

Методические указания

1. Область применения

В настоящих указаниях предложены способы обеззараживания материала, зараженного или подозрительного на зараженность бактериями I—IV групп патогенности, при проведении генодиагностических исследований методом ПЦР.

Указания предназначены для специалистов санитарно-гигиенических, лечебно-профилактических учреждений, генодиагностических центров и лабораторий, применяющих метод ПЦР для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний.

2. Введение

Внедрение в практику лабораторной диагностики инфекционных болезней полимеразной цепной реакции (ПЦР) должно быть обеспечено соответствующими методами подготовки проб, предусматривающими обеззараживание исследуемого материала.

Используемые обычно в практике табельные средства стерилизации (растворы формалина, хлорамина, перекиси водорода и др.) не могут быть применены при ПЦР-анализе вследствие повреждающего действия на ДНК или ингибирования реакции.

В существующих СП 1.2.011—94 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности» не предусмотрено выполнение современных генетических методов, в т. ч. полимеразной цепной реакции, которая в настоящее время широко используется для обнаружения

различных микроорганизмов, включая и возбудителей опасных инфекций.

В настоящих методических указаниях для работы с не образующими споры бактериями I—II групп патогенности предлагается обработка объектов мертиолятом натрия и затем лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом. При работе с возбудителем холеры может быть использован метод прогревания при 100 °С в течение 30 мин.

Для инактивации не образующих споры микроорганизмов III—IV групп патогенности может быть использован метод термической обработки при 100 °С в течение 30 мин или лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом.

Для обеззараживания материала, содержащего спорообразующие микроорганизмы, в т. ч. *Bacillus anthracis* применяют методический подход, заключающийся в герминации спор с последующей обработкой пенициллином, прогреванием при 100 °С и обработкой лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом.

Разработанные способы инактивации приводят к полному обеззараживанию материала, не повреждают ДНК и не ингибируют ПЦР.

3. Нормативные ссылки

СП 1.2.011—94 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности» (М., 1994).

СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами» (М., 1999).

Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов (Саратов, 1982).

Временная фармакопейная статья (ВФС) 42—62-ВС-86 для диагностикума бруцеллезного жидкого для реакции агглютинации.

Методические указания «Современные методы микробиологической диагностики туберкулеза» (М., 1975).

Руководство по профилактике чумы (Саратов, 1992).

4. Описание метода

Формула метода

Рекомендуемые средства стерилизации материала при ПЦР-анализе имеют следующие механизмы антимикробного действия. Мертиолят натрия необратимо связывается с SH-, NH_2- и COOH-группами белковых молекул с дальнейшим ингибированием дыхательной цепи микроорганизма.

Инактивирующий эффект лизирующего буфера обусловлен действием хаотропного агента – гуанидинтиоцианата, обеспечивающего разрушение клеточных мембран и лизис клеток с последующим выходом ДНК.

Метод обеззараживания содержащих споры микроорганизмов основан на прорастании споры в вегетативные клетки при культивировании в благоприятных для герминации условиях. Далее под воздействием температуры (для сибиреязвенного микроба еще и пенициллина) происходит разрушение клеточной мембраны и выход ДНК.

Материально-техническое обеспечение

Средства измерения[*]

- Весы PG 203 – прецизионные одночашечковые электронные цифровые с функцией обнуления тары и другими вспомогательными функциями, стандартного уровня, максимальная загрузка – 210 г, погрешность при измерении – 0,001 г, (Mettler, Швейцария);
- иономер pH-150 (pH-метр-милливольтметр); используется для определения pH буферных растворов, диапазон pH от 1 до 14, точность 0,01 pH, температура анализируемой среды от 10 до 100 °С (Белоруссия).

Оборудование[*]

- Дистиллятор А1013 – производительность 7,6 л/ч (Barustead, США);
- термостат ЕВ – объем от 18 до 1000 л с регулируемым диапазоном температур от 5 до 80 °С (Jouan, Франция);
- встряхиватель V-4 типа вортекс-регулируемый (Elmi, Латвия);
- микроцентрифуга для пробирок типа «Eppendorf» – СМ-50 – 12 х 1,5 (0,5) мл, до 12000 об/мин, ротор – угловой (Elmi, Латвия);
- баня водяная J-l2 (18,30) с корпусом из нержавеющей стали с термометром, на 12, 18, 30 л, вместимостью соответственно 72, 108 и 192, пробирки диаметром 16 мм; максимальная температура 100 °С (Jouan, Франция).

Вспомогательные изделия и материалы

Вата медицинская	ГОСТ 5556—81
Микроцентрифужные пробирки-виалы типа «Eppendorf» 0,5—1,5 мл	
Колбы мерные 50, 100, 200 мл	ГОСТ 12738—77
Лабораторный штатив	ТУ 64—17—07—72

[*] Указанные средства измерения и оборудование могут быть заменены на аналогичные по характеристикам производства других фирм.

Микродозаторы «Ленпипет» Россия, 1—20, 20—200, 200—1000 мкл;	
Наконечники для микродозаторов «Ленпипет», Россия	
Пробирки	ГОСТ 10515—75
Пипетки мерные	ГОСТ 20292—74
Цилиндры мерные 1—25, 1—100, 1—1000 мл.	ГОСТ 1770—74

Реактивы и растворы

Вода деионизованная стерильная	ГОСТ 6709—72
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)	ГОСТ10652—73
Натрия гидроокись	ГОСТ4328—77
Гуанидинтиоцианат «Serva», Германия	
Дитиотрейтол «Sigma», США	
Соляная кислота, хч	ГОСТ 3118—67
Спирт этиловый (ректификат)	ГОСТ 183000—87
Мертиолят натрия «Sigma», США	
Бензилпенициллина натриевая соль	

5. Способы обеззараживания материала, исследуемого методом ПЦР

Вся работа с исследуемым материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами I—II групп патогенности, проводится в соответствии с СП 1.2.011—94 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности».

Отобранные для исследования пробы могут быть инактивированы следующими способами.

5. 1. Материал (кровь, другие биологические жидкости, экстракты органов, смывы с поверхностей, фильтраты почвы), подозрительный на зараженность не содержащими споры бактериями I—II групп патогенности

Обработка мертиолятом натрия с прогреванием при температуре 56 °С: к исследуемым образцам добавляют мертиолят натрия, проверенный на бактерицидное действие, до концентрации 1 : 10000 (0,01 %) с последующим прогреванием их при 56 °С в течение 30 мин.

Обработка лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом и прогреванием при температуре 65 °С: к 100 мкл обработанных мертиолятом натрия образцов (п. 1.1), разлитым в микроцентрифужные пробирки типа

«Eppendorf», добавляют 300 мкл лизирующего буфера и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным. Далее для выделения ДНК используют метод нуклеосорбции на силикагеле или другом нуклеосорбенте, начиная с этапа добавления сорбента.

ПЦР выполняют по общепринятой методике в соответствии с указаниями к ПЦР-наборам изготовителя.

Приготовление лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом

Гуанидинтиоцианат (конечная концентрация 6М) – 18 г, дитиотрейтол (0,2М) – 95 мг и ЭДТА (0,5М) 1мг растворяют в 30 мл дистиллированной воды. Готовый раствор, проверенный на бактерицидное действие, хранится в темной посуде в холодильнике до 6 месяцев.

5.2. Материал, подозрительный на зараженность не содержащими споры бактериями III—IV групп патогенности

Прогревание при 100 °С в течение 30 мин (кроме ПЦР-анализа крови).

Обработка лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом и прогреванием при 65 °С в течение 15 мин, как описано в п. 1.2: исследуемые образцы в количестве 100 мкл помещают в микроцентрифужные пробирки типа «Eppendorf», смешивают с 300 мкл лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом и прогревают при 65 °С в течение 15 мин.

После лизиса гуанидинтиоцианатом для выделения ДНК используют метод нуклеосорбции на силикагеле, начиная с этапа добавления сорбента.

ПЦР выполняют по общепринятой методике в соответствии с указаниями к ПЦР-наборам изготовителя.

5.3. Материал, подозрительный на зараженность содержащими споры бактериями II—IV групп патогенности

Герминация спор с обработкой пенициллином и прогреванием при 100 °С в течение 10 мин: исследуемый материал в количестве 0,1 мл засевают в пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера рН 7,6 и инкубируют с аэрацией при температуре 37 °С в течение 2,5 ч. Добавляют пенициллин (1000 ед/мл) и инкубируют при 37 °С 15 мин. Затем прогревают на водяной бане при температуре 100 °С в течение 10 мин.

Обработка лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом и прогреванием при температуре 65 °С: к 100 мкл обработанных, как описано в п. 3.1, образцов, разлитых в микроцентрифужные пробирки типа «Eppendorf», добавляют 300 мкл лизирующего буфера и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С. После выполнения данного этапа материал считается

обеззараженным. Далее для выделения ДНК используют метод нуклеосорбции, начиная с этапа добавления сорбента.

ПЦР выполняют в соответстствии с указаниями к ПЦР-наборам изготовителя.

После инактивации проб любым из вышеописанных способов дальнейшие исследования проводятся, как с обеззараженным материалом.

gost.e-ecolog.ru