**Занятие 12.**

**Тема: Контаминация.**

**Вопросы, рассматриваемые на занятии:**

1. Основные виды контаминации.
2. Основные правила предотвращения контаминации.
3. Способы борьбы с контаминацией.
4. Порядок проведения деконтаминации согласно МУ 1.3. 2569-09 (Приложение 7).

**1. Основные виды контаминации.**

Контаминация – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул нуклеиновых кислот, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Основными видами контаминации являются:

* Перекрестная контаминация – кросс-контаминация (от пробы к пробе) происходит в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси и приводит к появлению спорадических ложноположительных результатов
* Контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются продуктами для реамплификации.
* Контаминация следовыми количествами ампликонов лабораторной посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхностей лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории, что приводит к появлению систематических ложноположительных результатов.

**2. Основными правилами предотвращения контаминации** в лаборатории ПЦР являются:

* Разделение функциональных рабочих зон
* Соблюдение поточности и направления движения анализируемых образцов
* Отдельные лабораторные халаты в каждой рабочей зоне
* Одноразовые перчатки без талька
* Наконечники для дозаторов с фильтрами, защищающими от аэрозоля
* Одноразовые пластиковые пробирки, посуда, наконечники
* Химическая и УФ дезинфекция всех поверхностей рабочих зон.

**3. Существует несколько способов борьбы с контаминацией**.

Одним из этих способов является использование фермента N-урацил-гликозилазы (УГ). В основе этого метода лежит способность УГ расщеплять молекулы ДНК со встроенным урацилом. Реакцию амплификации проводят с использованием смеси дНТФ, в которой дТТФ заменен на дУТФ (урацил), и после термоциклирования все образующиеся в пробирке ампликоны будут содержать урацил. Если до амплификации в реакционную смесь добавить УГ, то попавшие в реакционную смесь ампликоны будут разрушены, тогда как нативная ДНК останется целой и будет в дальнейшем служить мишенью для амплификации. Другим способом инактивации ампликонов служит фотохимическое воздействие на молекулы ДНК. Для этого используют псорален или изопсорален, которые активируются кратковременным облучением ультрафиолетовым светом. Модифицированные этими соединениями молекулы ДНК не могут участвовать в реакции амплификации. Однако, как известно, ни одна биологическая или химическая реакция не идёт со 100%-ной эффективностью и, соответственно, после инактивации продуктов амплификации из миллиардов копий амплифицированного фрагмента хотя бы несколько останутся целыми, что существенноет ценность такого подхода. Кроме того, всегда остается риск кросс-контаминации от образца к образцу в процессе пробоподготовки. Таким образом, оба эти метода лишь в некоторой степени позволяют устранить источник контаминации и не гарантируют отсутствия ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Есть третий способ борьбы с результатами контаминации, рассматриваемый скорее как казусный – значительное уменьшение количества циклов реакции (до 25-30 циклов). Но даже при таком подходе риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов велик. Наиболее радикальным подходом для решения этой проблемы, является использование флуоресцентных методов детекции, которые позволяют регистрировать результаты анализа, не открывая пробирки. Тем самым исключается этап электрофореза – основной источник контаминации. Для уверенности в отсутствии контаминации необходимо каждую серию экспериментов сопровождать отрицательными контролями. В качестве отрицательных контролей рекомендуется использовать воду из комнаты пробоподготовки (после каждого десятого клинического образца желательно обрабатывать вместо биологического образца пробирку с водой). Все реактивы рекомендуется хранить отдельными порциями (аликвоты). Если, несмотря на принятые меры, обнаружены следы контаминации, то все используемые порции реактивов следует заменить на новые, а все поверхности помещения, оборудования, пипетки и пр. обработать дезинфицирующими препаратами.

**4. Порядок проведения деконтаминации согласно МУ 1.3. 2569-09 (Приложение 7).**

1. Сотрудников, проводящих мероприятия по деконтаминации, обеспечивают отдельными халатами (желательно одноразовыми), шапочками, одноразовыми бахилами и перчатками, одноразовой ветошью, емкостями для приготовления необходимых количеств моющих и дезинфицирующих растворов.

2. Каждую зону лаборатории обрабатывают сотрудники, работающие в ней.

3. Для обработки каждой зоны используют отдельный набор уборочного инвентаря, подвергаемый после уборки обработке регламентируемыми дезинфицирующими средствами.

4. Каждую зону лаборатории разбивают на участки уборки, например:

* участок 1 – бокс биологической безопасности и оборудование внутри него;
* участок 2 – внешние поверхности бокса биологической безопасности;
* участок 3 – шкафы для расходного материала;
* участок 4 – холодильники для хранения реактивов, образцов проб;
* участок 5 – оборудование, которое используют в работе, но стоит оно вне бокса биологической безопасности;
* участок 6 – поверхности помещения (стены, окна, батареи, потолок, двери и т. д.);
* участок 7 – пол.

5. Обработку проводят от участка к участку последовательно. Каждый участок обрабатывают отдельной ветошью. Перед обработкой готовят моющие и дезинфицирующие растворы.

6. Поверхности каждого участка вначале обрабатывают моющим раствором для удаления жировых загрязнений, после чего остатки моющего средства удаляются ветошью, смоченной водой.

7. Затем на поверхность наносят на 30 мин 0,2 %-й раствор
ДП-2Т или аналогичные ему растворы, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке. Остатки дезинфицирующего средства тщательно удаляют ветошью, смоченной водой.

8. После завершения указанной обработки проводят обеззараживание влажных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 45 мин.

9. Мероприятия, описанные в п.п. 7 и 8, повторяют еще раз.

10. По завершении деконтаминации берут повторные смывы, которые исследуют на наличие нуклеиновых кислот и (или) ампликонов возбудителей инфекционных заболеваний, диагностика которых наиболее часто осуществляется в данной лаборатории, с учетом длины специфических фрагментов амплификации нуклеиновых кислот возбудителей, указанных в инструкциях по применению к набору реагентов.

11. Для проведения смывов используют отдельные стерильные зонды с ватным тампоном, которые смачивают в 0,9 %-м растворе натрия хлорида или ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) и вращательными движениями протирают рабочие поверхности оборудования, мебели, дверных ручек, косяков, телефонов и т. п. в течение 10—15 с, особое внимание уделяя помещениям совместного посещения работников зоны детекции продуктов амплификации и других сотрудников лаборатории (столовая, санузел и т. п.). После взятия смыва зонд помещают в микропробирки объемом 1,5 мл с 300—400 мкл ТЕ-буфера или 0,9 %-м раствором натрия хлорида, вращают в течение 10—15 с, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удаляют. Полученные суспензии перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Для постановки реакции амплификации используют необходимый объем жидкости в соответствии с инструкцией по применению к набору реагентов. После получения результатов смывов оформляется протокол.

12. В случае получения в образцах смывов положительных результатов амплификации обработку повторяют.

13. Загрязненный расходный материал (пробирки, наконечники, реактивы и т. п.) и контаминированный рабочий исследуемый материал (кроме исходного материала) обеззараживают через автоклавирование в соответствии с п. 1. прилож. 6.

14. Случаи контаминации регистрируют в специальном журнале с указанием мероприятий по ее устранению и результатов внутрилабораторного контроля.

15. Проведение работ, связанных с амплификацией нуклеиновых кислот, до завершения деконтаминационных мероприятий в лаборатории не допускается.