1.3. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III—IV групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.1888—04

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны: Федеральным Центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Е. Н. Беляев, И. В. Брагина, С. Г. Домнин, М. В. Зароченцев, Э. Ф. Опочинский, Т. В. Воронцова); Центром по генной диагностике особо опасных инфекционных заболеваний Минздрава России на базе Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (А. Н. Куличенко, Н. А. Осина, И. Н. Шарова, М. Н. Ляпин, И. Г. Дроздов, В. В. Кутырев); Противочумным центром Минздрава России (В. Е. Безсмертный, С. М. Иванова, Ю. А. Панин); ООО «Биоком» (А. В. Сычев, А. Б. Комаров, Л. А. Сердобинский).

2. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 4 марта 2004 г.

3. С введением настоящих методических указаний теряют силу «Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденные заместителем Председателя Госкомсанэпиднадзора Г. Г. Онищенко 22.06.95.

Содержание

1. Область применения 133
2. Нормативные ссылки 133
3. Общие положения 134
4. Требования к организации работы с ПБА III—IV групп патогенности методом ПЦР 134
   4.1. Общие требования 134
   4.2. Требования к помещениям ПЦР-лаборатории 135
   4.3. Требования к лабораторному оборудованию 137
5. Требования к проведению работ 138
6. Требования к обработке помещений и обеззараживанию материала 139
7. Действия при возникновении контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами 139
8. Оценка и контроль качества работы ПЦР-лаборатории 140
   Приложение 1. Термины, определения и сокращения 141
   Приложение 2. Перечень оборудования ПЦР-лаборатории 142
   Приложение 3. Действия при контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами 144

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
4 марта 2004 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.3. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III—IV групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.1888—04

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают требования к помещениям лабораторий и порядку проведения в них работ с патогенными биологическими агентами (ПБА) III—IV групп патогенности с использованием методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.2. Методические указания регламентируют выполнение исследований методом ПЦР с применением оборудования и тест-систем, разрешенных к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке.

1.3. Методические указания определяют принципы организации работы лабораторий, использующих метод полимеразной цепной реакции, на этапах выполнения ПЦР-анализа.

2. Нормативные ссылки

2.1. СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами». Минздрав России, 1999.

2.2. СП 1.2.1318—03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I—IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами». Минздрав России, 2003.

2.3. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности». Госкомсанэпиднадзор России, 1995.

2.4. МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности». Минздрав России, 2003.

2.5. МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности при работе методом ПЦР». Минздрав России, 2001.

2.6. «Методические указания по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях» № 11-16/03-06 от 28.02.95. Минздравмедпром России, 1995.

3. Общие положения

3.1. Полимеразная цепная реакция представляет собой процесс многократного увеличения числа копий (амплификация) фрагмента ДНК-мишени (кДНК), катализируемый in vitro термостабильной ДНК-полимеразой, и позволяет обнаружить специфичный участок генома биологического агента.

3.2. ПЦР обладает высокой чувствительностью, специфичностью, обеспечивает возможность работы практически с любым видом биологического материала и объектами окружающей среды, позволяет выполнять анализ в течение 4—8 ч. Аналитическая чувствительность тест-систем для выявления ДНК (РНК) микроорганизмов методом ПЦР составляет 1×10^2—1×10^4 м.к. (геномэквивалент/мл), специфичность – 85—100 %.

3.3. По результатам анализа выдают предварительный ответ о наличии в пробе специфических участков (фрагментов) ДНК или РНК, имеющих гомологию с определенным участком генома возбудителя того или иного инфекционного заболевания, а также о наличии в исследуемом материале генетических маркеров или генетически модифицированных ДНК.

3.4. Проведение исследований методом ПЦР сопряжено с необходимостью обеспечения соблюдения правил биологической безопасности, а также определенных требований к организации и проведению анализа с целью предотвращения контаминации исследуемых проб нуклеиновыми кислотами и получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

4. Требования к организации работы с ПБА III—IV групп патогенности методом ПЦР

4.1. Общие требования

4.1.1. Работу с ПБА III—IV групп патогенности методом ПЦР проводят только при наличии в организации лицензии на деятельность, связанную с использованием возбудителей инфекционных заболеваний человека, и санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения соответствующих работ в лаборатории, выданных в установленном порядке.

4.1.2. Организацию работ на этапах приема, разбора и первичной обработки материала, подготовки проб и выделения нуклеиновых кислот, а также обеззараживания проб проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами». Работу на остальных этапах ПЦР-анализа проводят, как с обеззараженным материалом.

4.1.3. В лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с ПБА III группы патогенности, допускается проведение исследований методом ПЦР (без предварительного накопления возбудителя) с целью диагностики бруцеллеза, парентеральных вирусных гепатитов, ВИЧ-инфекции, возбудители которых относятся ко II группе патогенности.

4.2. Требования к помещениям ПЦР-лаборатории

4.2.1. Помещения ПЦР-лаборатории, проводящей работы с ПБА III—IV групп патогенности, должны соответствовать требованиям СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

4.2.2. Проведение исследований методом ПЦР с ПБА III—IV группы патогенности допускается на базе действующих микробиологических (бактериологических, вирусологических, иммунологических и др.) лабораторий при условии соблюдения требований СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами» и организации в лаборатории самостоятельных или выделенных в составе других функциональных помещений рабочих зон, соответствующих этапам ПЦР-анализа.

4.2.3. ПЦР-лаборатория должна включать следующий минимальный набор рабочих зон:

- приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала;
- выделения НК;
- приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР;
- детекции продуктов амплификации методом электрофореза или ГиФА.

4.2.4. В ПЦР-лабораториях необходимо также предусмотреть наличие вспомогательных помещений: комнаты ведения учетных документов или ординаторской (комнаты персонала)*; кабинета заведующего лабораторией*; раздевалки для сотрудников**; комнаты приема пищи**; туалета**; подсобных (складских) помещений**.

4.2.5. Необходимо наличие автоклавной комнаты для обеззараживания исследуемого материала. Она может быть общей с другими подразделениями учреждения при условии соблюдения требований биологической безопасности.

4.2.6. Помещения для выполнения работ на этапах ПЦР-анализа должны быть боксированными (боксы с предбоксами).

4.2.7. В зоне приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала проводят прием ПБА, пробоподготовку (сортировку, маркировку, центрифугирование и др.), хранение и первичную инактивацию остатков биоматериала дезинфицирующими средствами. Зону приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала располагают в комнате приема материала или в отдельном боксированном помещении. Здесь же можно проводить прием и обработку проб для исследования другими методами (бактериологическими, вирусологическими, иммунологическими и т. д.), при условии выделения отдельного оборудованного рабочего места для ПЦР-анализа.

4.2.8. Зону выделения нуклеиновых кислот размещают в отдельном помещении. При организации ПЦР-лаборатории на базе действующей микробиологической лаборатории допускается выделение НК в помещениях, в которых проводят другие виды исследований, кроме генно-инженерных работ и работ по накоплению ПБА. В этом случае в помещении организуют рабочую зону для выделения нуклеиновых кислот (НК), в которой располагают ПЦР-бокс или бокс биологической безопасности. В ПЦР-боксе (или боксе биологической безопасности) для выделения НК не допускается проведение других работ.

4.2.9. В зоне приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР производят приготовление ПЦР-смеси, внесение в пробирку для ПЦР выделенных препаратов ДНК или кДНК, обратную транскрипцию РНК и амплификацию ДНК или кДНК. Помеще-

---

* Помещения могут быть объединены.

** Помещения могут быть общими с другими подразделениями учреждения.

ние для приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР должно быть отдельным. Приготовление реакционных ПЦР-смесей проводят в ПЦР-боксе.

4.2.10. При необходимости этап выделения НК может быть совмещен в одном помещении с этапом приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР при наличии в нем отдельных ПЦР-боксов (боксов биологической безопасности) – для подготовки реакционных ПЦР-смесей и для выделения НК.

4.2.11. Зону детекции продуктов амплификации располагают в отдельном помещении, по возможности оснащенном ПЦР-боксом.

4.2.12. При необходимости одновременного использования для детекции продуктов амплификации метода электрофореза и метода гибридизационного анализа следует выделить в помещении детекции отдельную рабочую зону для проведения гибридизационного анализа. В этом случае оборудование и принадлежности для каждого вида детекции маркируют применительно к каждой зоне. Не допускается использовать для проведения гибридизационного анализа пипетки и посуду, предназначенные для электрофореза.

4.2.13. Планировочные решения и размещение оборудования должны обеспечивать поточность движения исследуемого материала. Следует полностью исключить воздухообмен между помещением детекции продуктов амплификации и другими помещениями.

4.2.14. Лабораторию оборудуют водопроводом, канализацией, электричеством и отоплением в соответствии с СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами». Все помещения лаборатории обеспечивают достаточным естественным и искусственным освещением.

4.2.15. При строительстве новых или реконструкции имеющихся ПЦР-лабораторий помещения оборудуют приточно-вытяжной или вытяжной вентиляцией. Разница в давлении воздуха в помещениях ПЦР-лаборатории достигается за счет различий в кратности воздухообмена в них. Кратность воздухообмена должна соответствовать значениям, приведенным в таблице.

Наименование помещения	Кратность воздухообмена ($м^3/ч$)	
	приток	вытяжка
Зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала	5	6
Зона выделения нуклеиновых кислот (НК)	5	6
Зона приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР	5	5
Зона детекции продуктов амплификации	5	7

4.2.16. При необходимости в ПЦР-лаборатории могут быть установлены кондиционеры в соответствии с СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

4.2.17. Внутреннюю отделку помещений выполняют в соответствии с их функциональным назначением. Поверхности стен, пола и потолка в лабораторных помещениях должны быть гладкими, без щелей, легко обрабатываемыми, устойчивыми к действию моющих и дезинфицирующих средств. Полы не должны быть скользкими.

4.2.18. Лабораторная мебель должна иметь покрытие, устойчивое к действию моющих и дезинфицирующих средств. Поверхность столов не должна иметь трещин и швов.

4.2.19. Помещения на всех этапах ПЦР-анализа оборудуют бактерицидными лампами в соответствии с «Методическими указаниями по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях» № 11-16/03-06 от 28.02.95. Бактерицидные лампы в помещениях ПЦР-лаборатории устанавливают из расчета 2,5 Вт/м^3.

4.2.20. Помещения лаборатории должны быть непроницаемы для грызунов и насекомых.

4.2.21. ПЦР-лабораторию обеспечивают средствами пожаротушения.

4.3. Требования к лабораторному оборудованию

4.3.1. Комплект лабораторного оборудования определяют с учетом используемых наборов реагентов для выделения НК, амплификации и детекции результатов исследований. Помещение для каждого этапа проведения ПЦР обеспечивают своим набором лабораторного оборудования (прилож. 2).

4.3.2. Приборы, оборудование и средства измерения, используемые в работе лаборатории, должны быть технически исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации. Средства измерения регулярно подвергают метрологическому контролю. Используемые приборы должны соответствовать нормам безопасности и электромагнитной совместимости.

4.3.3. Для проведения исследования используют приборы и расходные материалы (пробирки, наконечники к микродозаторам), исключающие возможность перекрестной контаминации исходного материала, выделенных НК и продуктов ПЦР. Для этого используют:

- термостаты с твердотельным термоблоком;
- пробирки с плотно закрывающимися крышками;
- одноразовые пробирки и наконечники к микродозаторам;
- наконечники, строго соответствующие автоматическим пипеткам, а пробирки для амплификации – термоциклерам (в соответствии с инструкцией фирмы-производителя прибора), смена наконечников после завершения каждой манипуляции является обязательной;
- специальные контейнеры для сброса использованных наконечников и пробирок, устанавливаемые на рабочих местах.

4.3.4. Микродозаторы, рабочая поверхность и наружная поверхность корпуса приборов должны быть устойчивы к действию моющих и дезинфицирующих средств и ультрафиолетового излучения.

4.3.5. Для каждого этапа проведения ПЦР-исследований необходимо предусмотреть наличие холодильников (прилож. 2):

- в комнате приема материала от 4 до 8 °С, минус 20 °С (для хранения исследуемых проб);
- в комнате выделения НК от 4 до 8 °С и минус 20 °С для хранения набора выделения НК; от 4 до 8 °С – для хранения препаратов НК; не допускается хранение препаратов НК в одном холодильнике с компонентами набора для выделения НК;
- в комнате ПЦР-амплификации от 4 до 8 °С и минус 20 °С – для хранения наборов обратной транскрипции и амплификации НК;
- в комнате детекции продуктов амплификации от 4 до 8 °С – для хранения наборов электрофоретической детекции и ГиФА.

5. Требования к проведению работ

5.1. Не допускается проведение исследований методом ПЦР в помещениях, где осуществляют работы по накоплению ПБА и генно-инженерные работы.

5.2. Работу с ПБА методом ПЦР выполняют специалисты с высшим и средним специальным образованием, прошедшие подготовку на лицензированных курсах специализации (повышения квалификации) по молекулярно-генетическим (ПЦР) методам диагностики.

5.3. Персонал допускают к работе с ПБА только после проведения инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности.

5.4. В ПЦР-лаборатории, выполняющей работы с ПБА, используют дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в установленном порядке.

5.5. Каждое помещение для проведения исследований методом ПЦР оснащают индивидуальным набором соответствующего лабораторного оборудования, расходных материалов и одежды, используемых только в данном помещении.

5.6. При проведении исследований методом ПЦР неукоснительно соблюдают следующие правила последовательной обработки материала.

5.6.1. Весь поступающий материал направляют в комнату приема материала.

5.6.2. Поступивший материал маркируют и регистрируют в специальном журнале.

5.6.3. Первичную обработку материала (взятие, маркировка и центрифугирование проб и др.) проводят только в комнате приема биологического материала.

5.6.4. В помещение выделения НК материал доставляют только в закрытых одноразовых пробирках в виде маркированных аликвот.

5.6.5. Передачу и доставку аликвот проб обработанного и обеззараженного материала, а также пробирок с продуктами ПЦР из одного помещения в другое осуществляют в закрывающихся металлических или пластмассовых контейнерах.

5.6.6. После проведения детекции и учета результатов исследования пробирки с продуктами ПЦР и использованные наконечники к микродозаторам подвергают первичной обработке дезинфицирующими растворами, вызывающими деградацию ДНК (например: 0,2 %-ный раствор ДП-2Т или другие, аналогичные ему, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке). Процедуру проводят непосредственно в комнате учета результатов амплификации.

5.6.7. Окончательную дезактивацию использованных расходных материалов и реагентов (гель, буфер для электрофореза) производят в автоклавной комнате.

5.6.8. Соблюдают поточность продвижения исследуемого материала и его производных (пробы ДНК или РНК, продукты ПЦР).

5.7. Строго соблюдают условия хранения всех реагентов и образцов ДНК согласно инструкции к набору реагентов. Образцы ДНК хранят отдельно от реагентов. Не допускается использование реагентов с истекшим сроком годности или хранившихся в условиях, не соответствующих требованиям, изложенным в инструкциях.

5.8. По окончании работы все объекты, содержащие ПБА, убирают в хранилища (холодильники, шкафы и т. д.), после чего рабочие поверхности в обязательном порядке подвергаются дезинфекции.

5.9. Остатки ПБА и посуду, использованную на этапах приема, разбора и первичной обработки материала, подготовки проб и выделения нуклеиновых кислот, приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР, собирают в закрывающиеся емкости и передают в автоклавную. Слив необеззараженных жидкостей в канализационную сеть не допускается.

5.10. Перенос ПБА и использованной посуды для обеззараживания осуществляют в закрывающихся емкостях, исключающих инфицирование во время транспортирования.

5.11. Во всех помещениях лаборатории регулярно проводят влажную уборку. Каждую рабочую зону ПЦР-анализа обеспечивают индивидуальным промаркированным набором уборочного инвентаря. Не допускается использовать уборочный инвентарь для уборки других помещений.

5.12. Сотрудников каждой рабочей зоны обеспечивают спецодеждой: медицинским халатом, шапочкой, перчатками и сменной обувью. При работе в помещении детекции продуктов амплификации следует надевать бахилы. Перемещение одежды из зоны в зону категорически не допускается. Рекомендуется использование одноразовой одежды. Обработку рабочей одежды из зоны детекции продуктов амплификации проводят отдельно от одежды из других зон. Обеззараживание рабочей одежды проводят в соответствии с СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

5.13. Лабораторию обеспечивают аптечкой стандартной комплектации для оказания первой медицинской помощи.

6. Требования к обработке помещений и обеззараживанию материала

6.1. Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами». В комнатах, в которых проводят работу с выделенными НК, рабочие поверхности, штативы, оборудование следует обеззараживать ежедневно ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч. Полы ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами. Перед началом работы рабочую поверхность столов дополнительно обрабатывают 70 %-ным этиловым спиртом. Ежемесячно проводят профилактическую обработку рабочей поверхности столов и штативов 1 N соляной кислотой.

6.2. Обеззараживание проб проводят в соответствии с МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

7. Действия при возникновении контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами

7.1. При возникновении контаминации лаборатории проводят следующие мероприятия (прилож. 3):

- утилизацию всех находящихся в «контаминированной» зоне реактивов;
- утилизацию исследуемых материалов на всех промежуточных стадиях обработки (кроме исходной);
- генеральную уборку, химическую и ультрафиолетовую дезинфекцию всех поверхностей лабораторных помещений;
- дезинфекцию мебели, рабочих поверхностей, а также поверхностей корпусов приборов и оборудования химическим методом и ультрафиолетовым излучением;
- обработку паром под давлением всей спецодежды «контаминированной» зоны.

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

7.3. Проведение ПЦР-исследований до завершения деконтаминационных мероприятий не допускается.

8. Оценка и контроль качества работы ПЦР-лаборатории

8.1. В ПЦР-лаборатории, проводящей работы с ПБА III—IV групп патогенности, проводят внутрилабораторный контроль качества дезинфекции, исследование смывов с рабочих поверхностей и воздушной среды боксов.

8.2. В ПЦР-лаборатории проводят внутрилабораторный контроль качества ПЦР-исследований. ПЦР-лаборатория принимает участие во внешнелабораторном контроле качества деятельности генодиагностических лабораторий.

8.3. Внутрилабораторный контроль проводят с периодичностью, зависящей от объема выполняемой работы и определяемой руководителем лаборатории, но не реже одного раза в квартал.

8.4. Контроль осуществляют путем исследования шифрованных аттестованных контрольных панелей, содержащих «положительные» и «отрицательные» пробы.

8.5. Количество проб зависит от объема проводимых исследований и должно быть достаточным для оценки работы сотрудников и выявления контаминированных участков лаборатории.

8.6. Для выявления возможной контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами контроль проводят путем взятия смывов с поверхностей. Смывы с поверхностей берут стерильными ватными тампонами (зондами). Перед взятием смывов тампоны (зонды) смачивают стерильным физиологическим раствором или ТЕ-буфером (10 mM Tris, 1 mM ЭДТА), после чего вращательными движениями протирают рабочие поверхности. После взятия смыва зонды помещают в микропробирки типа «эппендорф» с 300—400 мкл ТЕ-буфера, вращают в течение 10—15 с, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удаляют.

Полученные суспензии центрифугируют при 8 000 g (12 000 об./мин) в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с аэрозольным барьером в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения НК используют 0,1—0,2 мл надосадочной фракции.

8.7. В качестве критериев оценки качества исследований методом полимеразной цепной реакции в лаборатории учитывают результаты внутреннего и внешнего лабораторного контроля, а также отсутствие случаев лабораторной контаминации нуклеиновыми кислотами.

Приложение 1
(справочное)

Термины, определения и сокращения

Патогенные биологические агенты (ПБА) – патогенные для человека микроорганизмы (бактерии, вирусы, хламидии, риккетсии, простейшие, грибы, микоплазмы), генно-инженерно-модифицированные микроорганизмы, яды биологического происхождения (токсины), гельминты, а также любые объекты и материалы (включая полевой, клинический, секционный), подозрительные на содержание перечисленных агентов.

Биологическая безопасность – система организационных, медико-биологических и инженерно-технических мероприятий и средств, направленных на защиту работающего персонала, населения и среды обитания человека от воздействия патогенных биологических агентов.

НК – нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК).

Генетические маркеры – нуклеотидные последовательности с известной первичной структурой, которые позволяют проводить идентификацию анализируемой НК.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод обнаружения специфического участка НК в исследуемом биологическом материале путем амплификации in vitro.

Амплификация – процесс многократного копирования специфического участка ДНК (кДНК), ограниченного (фланкированного) праймерами.

Ампликоны – продукты ПЦР, синтезируемые в процессе амплификации копии ДНК-мишени.

Лабораторная контаминация НК – механический занос положительно реагирующих НК, прежде всего ампликонов, в исследуемые образцы, приводящий к ложноположительным результатам.

Приложение 2
(рекомендуемое)

Перечень оборудования ПЦР-лаборатории

Для обработки материала и выделения НК

1. Центрифуга для пробирок объемом 5—100 мл.
2. Центрифуга-вортекс.
3. Микроцентрифуга от 12 до 16 000 g для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5 мл.
4. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °С.
5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
6. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 мл.
7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1 000 мкл.
8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл.
9. Штативы для наконечников, микропробирок объемом 1,5 мл.
10. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С, минус 20 °С.
11. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Для приготовления ПЦР-смеси и проведения амплификации

1. Настольный бокс с бактерицидной лампой.
2. Амплификатор.
3. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
4. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объёмом 0,5 (0,2) мл.
5. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл.
6. Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 (0,2) мл.
7. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С, минус 20 °С.
8. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

Для электрофоретического анализа продуктов ПЦР

1. Камера для горизонтального электрофореза.
2. Источник постоянного тока с напряжением 150—460 В.
3. Трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.
4. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов.
5. Компьютер для анализа результатов электрофореза.
6. Микроволновая печь для плавления агарозы.

7. Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы объемом 250 мл.
8. Мерный цилиндр объемом 1 л.
9. Штатив для микропробирок на 0,5 мл.
10. Отдельная автоматическая пипетка 10—40 мкл.
11. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл в штативе.
12. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С.
13. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

Для гибридизационно-ферментной детекции продуктов ПЦР

1. Термостат планшетный, поддерживающий температуру 37 °С.
2. Вошер (не обязательно).
3. Планшетный спектрофотометр.
4. Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в чистой зоне и предназначенным для анализа результатов гибридизации).
5. Восьмиканальная пипетка до 200 мкл.
6. Отдельный набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема.
7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема.
8. Мерный цилиндр объемом 1 л.
9. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С.
10. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

Приложение 3
(рекомендуемое)

Действия при контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами

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

2. Каждую зону лаборатории обрабатывают работающие в ней сотрудники.

3. Для обработки каждой зоны используют новый набор уборочного инвентаря.

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 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 персонал надевает одноразовую одежду, бахилы, шапочки, перчатки; готовит моющие и дезинфицирующие растворы.

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

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

8. После завершения указанной обработки проводят обеззараживание ультрафиолетовым излучением влажных поверхностей в течение 1 ч.

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

10. Каждый последующий этап обработки проводят в новой одноразовой одежде (халат, шапочка, бахилы, перчатки) с использованием новой ветоши. Для удаления остатков нанесенных на поверхность дезинфицирующих средств ветошь тщательно прополаскивают в чистой воде, обрабатываемую поверхность протирают несколько раз. После каждого этапа обработки ветошь утилизируют.

11. По завершении деконтаминации берут повторные смывы, которые исследуют на наличие НК возбудителей инфекционных заболеваний, диагностику которых наиболее часто осуществляют в данной лаборатории, а также на выявление НК возбудителей, имеющих короткие – менее 300 п.н. – специфические продукты амплификации (длина специфического фрагмента указана в инструкциях к тест-системе).

12. Для проведения смывов стерильный зонд с ватным тампоном смачивают в физиологическом растворе или ТЕ-буфере (10 mM Tris, 1 mM ЭДТА), после чего вращательными движениями протирают рабочие поверхности оборудования, мебели, дверных ручек и косяков, телефонов и т. п. Особое внимание уделяют помещениям совместного посещения работников зоны детекции продуктов амплификации и других сотрудников лаборатории (столовая, санузел и т. п.). После взятия смывов зонды помещают в микропробирки типа «эппендорф» с 300—400 мкл ТЕ-буфера, вращают в течение 10—15 с, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удаляют.

13. В случае получения в образцах смывов положительных результатов ПЦР-анализа обработку повторяют.

14. Загрязнённый расходный материал (пробирки, наконечники и т. п.) утилизируют.

gost.e-ecolog.ru