

Контамінація в ПЛР-лабораторії



REGIONAL OFFICE FOR

**World Health
Organization**

Europe

Лора Чернишова

Лабораторний офіцер Бюро ВОЗ в Україні

chernyshoval@who.int

Відсоток позитивних на SARS-CoV-2 зразків у дослідженні «випадок-контроль»

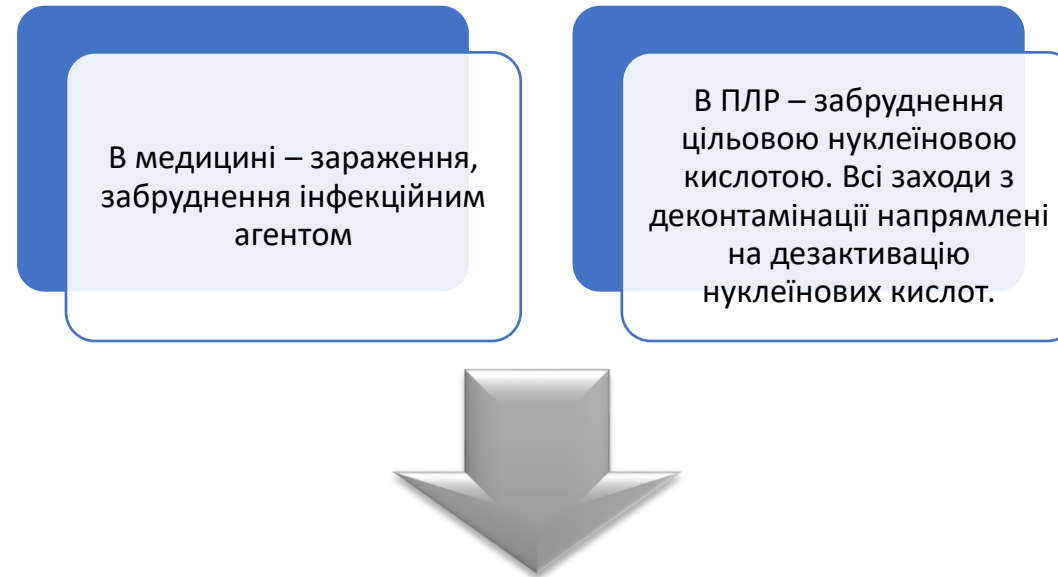
ICOS (INSIGHT 011) Number and Percent with Testing Positive for SARS-CoV-2 By Country and Case-Control Status

SCC	N	Cases		Controls		Overall	
		Positive N (%)	N	Positive N (%)	N	Positive N (%)	
Argentina	3	1 (33.3%)	4	4 (100.0%)	7	5 (71.4%)	
Croatia	2	2 (100.0%)	13	13 (100.0%)	15	15 (100.0%)	
Denmark	37	35 (94.6%)	67	54 (80.6%)	104	89 (85.6%)	
Greece	27	24 (88.9%)	49	46 (93.9%)	76	70 (92.1%)	
Mexico La red	17	17 (100.0%)	34	33 (97.1%)	51	50 (98.0%)	
Peru IMPACTA	1	1 (100.0%)	2	2 (100.0%)	3	3 (100.0%)	
Peru SES	71	69 (97.2%)	136	124 (91.2%)	207	193 (93.2%)	
Spain	7	7 (100.0%)	13	13 (100.0%)	20	20 (100.0%)	
US WDC	40	36 (90.0%)	78	70 (89.7%)	118	106 (89.8%)	
Ukraine	104	32 (30.8%)	164	102 (62.2%)	268	134 (50.0%)	
Total	309	224 (72.5%)	560	461 (82.3%)	869	685 (78.8%)	

Зміст

- Класифікація, механізм виникнення
- Попередження контамінації
- Методи виявлення контамінації
- Алгоритм дії у випадку виявлення контамінації

Контамінація (лат. *Contaminatio* – змішання, злиття)



- Дезинфекція супроводжує деконтамінацію, знижуючи загальний рівень контамінанти
- Дезинфекція, навпаки, може сприяти розповсюдженню контамінанти (амплікони)

Класифікація контамінації за її джерелом

Назва (синонім, що зустрічається в літературі)	Джерело контамінації	Склад контамінанти	Молекулярна маса	Концентрація в джерелі і контагіозність
Кросс-контамінація (контамінація від зразка до зразка, перехресна, антеградна, горизонтальна, зовнішня, спорадична, sample-to-sample, intersample, cross-contamination)	Пре-ПЛР пробірка	Нативна НК (живий збудник у зразку, його власні ДНК \ РНК, кДНК)	+++	+
		Плазміда контрольного зразка чи стандарта	++	+ / ++
Контамінація ампліконами (ретроградна, вертикальна, пост-ПЛР, carryover)	Пост-ПЛР пробірка	Амплікони	+	+++

Liferiver Vibrio cholera CTX gene /O1/O139 Real Time PCR kit

9.1.1 Зразки калу

1) Перенесіть приблизно 50 мг зразка у пробірку на 1,5 мл; додайте 1,0 мл звичайного фізіологічного розчину, потім протягом 10 секунд перемішайте на вортексі і відцентрифугуйте пробірку при 13000 об/хв протягом 2 хвилин. Обережно дістаньте пробірку та видаліть супернатант, не порушуючи осад.

2) Додайте 50 мкл буфера для екстракції ДНК, закрийте пробірку, ресуспендуйте осад на вортексі без енергійного перемішування. Швидко **відцентрифугуйте і інкубуйте пробірку протягом 10 хвилин при 100°C.**

3) Центрифугуйте пробірку при 13000 об/хв протягом 5 хвилин. Супернатант містить виділену ДНК і може бути використаний як матриця у ПЛР.



Амплікони – найнебезпечніше джерело контамінації:

- На відміну від інших НК мають екстремально малі розміри
- Їх концентрація в джерелі надзвичайно велика (по закінченню ПЛР – 10^9 - 10^{11} копій / мл, або **10^6 копій в 1 мкл**)
- Легко утворюють аерозолі
- Більш стійкі в оточуючому середовищі. Стійкі до УФ випромінювання.
- Здатні накопичуватись в щілинах та отворах (напр., між плитками кафелю)
- Надзвичайно легко і неконтрольовано розповсюджуються
- ДНК \ РНК мають заряд, **висушені** молекули електростатично «притягуються» зарядженими поверхнями (одяг, пластик) та вибірково накопичуються на предметах (пластикові штативи з наконечниками, електростатично «липкі» поверхні халатів тощо)

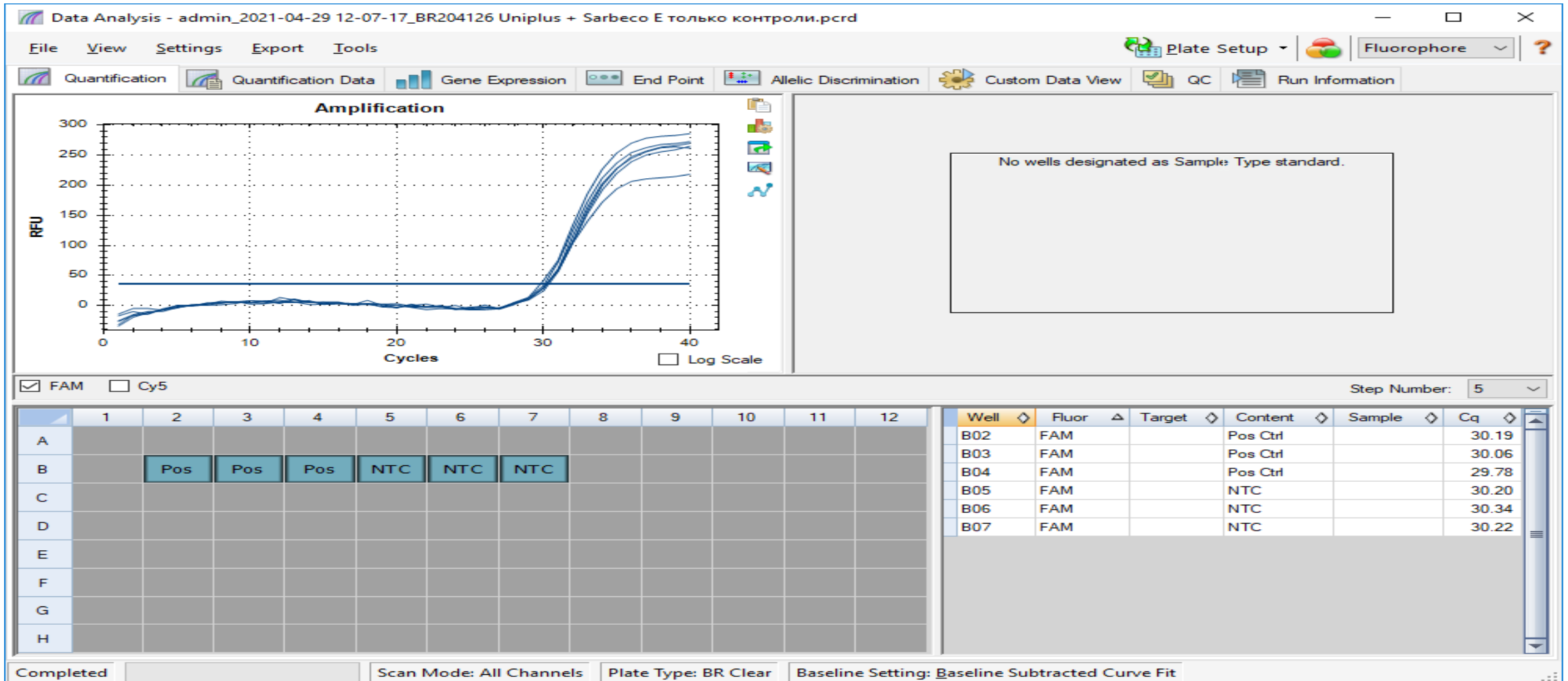
Джерело контамінації ампліконами в ПЛР лабораторії



Інші класифікації
контамінації (за
механізмами
виникнення чи
розповсюдження)

- **Контамінація з невиявленим первинним джерелом.** Особливо небезпечна контамінація ампліконами. Без виявлення первинного джерела деконтамінаційні заходи не матимуть ефекту, оскільки контамінація поновлюватиметься з первинного джерела. Ліквідація висококопійного первинного джерела є першочерговим завданням
- **Дифузна контамінація.** Неможливо чітко визначити зони з найбільш високою концентрацією контамінантів, які могли б стати джерелом розповсюдження контамінації. АБО: відбулось тотальне розповсюдження ампліконів по лабораторії (Напр., через систему вентиляції чи забруднені ручки дверей). Змиви з усіх об'єктів показують приблизно однакову концентрацію ампліконів і шлях розповсюдження визначити не вдається.
- **Перехресна контамінація ампліконами іншої тест-системи** – виникає, коли нуклеотидна послідовність ампліконів двох різних тест-систем ідентична. Не плутати з тест-системою з низькою специфічністю зондів \ праймерів, яка здатна детектувати інші види (генотипи) мікроорганізмів окрім заявлених виробником
- **Контамінація реагентів \ лабораторного пластика** – може виникати як на виробництві, так і в лабораторії. У зв'язку з цим краще використовувати пластик не тільки з маркуванням DNase free, но і DNA-free (такий пластик часто використовують в суд-мед-експертизі)
- **Контамінація накопичення** – поступове накопичення контамінантів (напр., на штативах чи в щілинах між плиткою кафеля). Є джерелом спорадичної контамінації з невиявленим джерелом, що поступово переходить в масивну.

Контамінація компонентів ПЛР-набору на виробництві



Що нам каже Наказ №26 Попередження контамінації

[НАКАЗ 24.01.2008 N 26 "Про затвердження державних санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами"](#)

- 1. Загальнолабораторні методи профілактики:** впровадження режиму превентивної деконтамінації, створення бар'єрів на шляхах розповсюдження контамінації, дезактивацію контамінанти
 - Поточність руху біологічного матеріалу;
 - Використання в кожній робочій зоні власного приладдя (обладнання, ЗІЗ, витратні матеріали, реагенти, засоби прибирання тощо), заборона переносу їх в іншу зону;
 - Сепарація вентиляційних потоків повітря в приміщеннях; створення стерильного повітря в ШББ, обмеження локальних неконтрольованих потоків повітря під час роботи з відкритими пробірками (напр., при вортексуванні, використанні кондиціонерів)
 - Розділення видів работ по класу небезпеки виникнення контамінації (робота з чистими реактивами, з позитивними контролями, з біологічним матеріалом тощо) та виконання їх в окремих зонах; зміна ЗІЗ та обробка рук лаборанта при переміщенні в іншу зону
 - Хімічна дезактивація контамінанти (препарати три- чи дихлорізоціануранової кислоти (напр., ДП2Т, Жавель-клейд тощо) + УФ-обробка

Попередження контамінації

- 2. Спеціальні методи профілактики** – не є обов'язковими згідно наказу №26 або відсутні в наказі.
- Наявність відпрацьованої системи утилізації ПЛР-пробірок;
 - Використання тест-систем, що підтримують хімічну інактивацію ампліконів за допомогою УДГ-протоколу (UNG)
 - Автоматизація всіх етапів ПЛР-досліджень - в 6 разів скорочує кількість контамінованих постановок, в 68 (!) разів скорочує кількість ХПР
 - Скорочення етапів досліджень, що супроводжуються відкриванням пробірок (напр., використання one-step ЗТ-ПЛР)

Що нам каже Наказ №26

9. Профілактика контамінації та порядок дій при виникненні контамінації ПЛР-лабораторії НК

9.4. При виникненні контамінації (отримання повторних позитивних результатів у негативних контролях, а також при тестуванні контрольних змивів) у лабораторії проводять комплекс заходів, обсяг яких визначається результатами дослідження контрольних змивів. Комплекс заходів включає:

- утилізацію усіх реактивів, що перебувають у "контамінованій" зоні;
- утилізацію досліджуваних матеріалів на всіх проміжних стадіях обробки (крім вихідної);
- генеральне прибирання, хімічну і ультрафіолетову дезінфекцію усіх поверхонь лабораторних приміщень;
- дезінфекцію меблів, робочих поверхонь, а також поверхонь корпусів приладів і обладнання хімічним методом і ультрафіолетовим опроміненням;
- обробку парю під тиском усього спецодягу "контамінованої" зони.

9.5. Випадки контамінації ПЛР-лабораторії реєструють у спеціальному журналі з вказівкою заходів щодо її усунення і результатів внутрішньолабораторного контролю якості та ефективності проведених заходів.

Що нам каже Наказ №26

10. Контроль якості досліджень і оцінка роботи ПЛР-лабораторії

10.3. Періодичність проведення внутрішньолабораторного контролю якості деконтамінації об'єктів довкілля визначається керівником лабораторії залежно від об'єму виконуваної роботи, **але не рідше одного разу на квартал**. У разі підозри на контамінацію внутрішньолабораторний контроль деконтамінації об'єктів довкілля лабораторії проводять негайно.

Що нам каже Наказ №26

4. Документація ПЛР-лабораторії



```
graph TD; A[4. Документація ПЛР-лабораторії] --> B[4.1. ПЛР-лабораторія повинна мати:]; B --> C[- журнал реєстрації контамінації ПЛР-лабораторії нуклеїновими кислотами;]
```

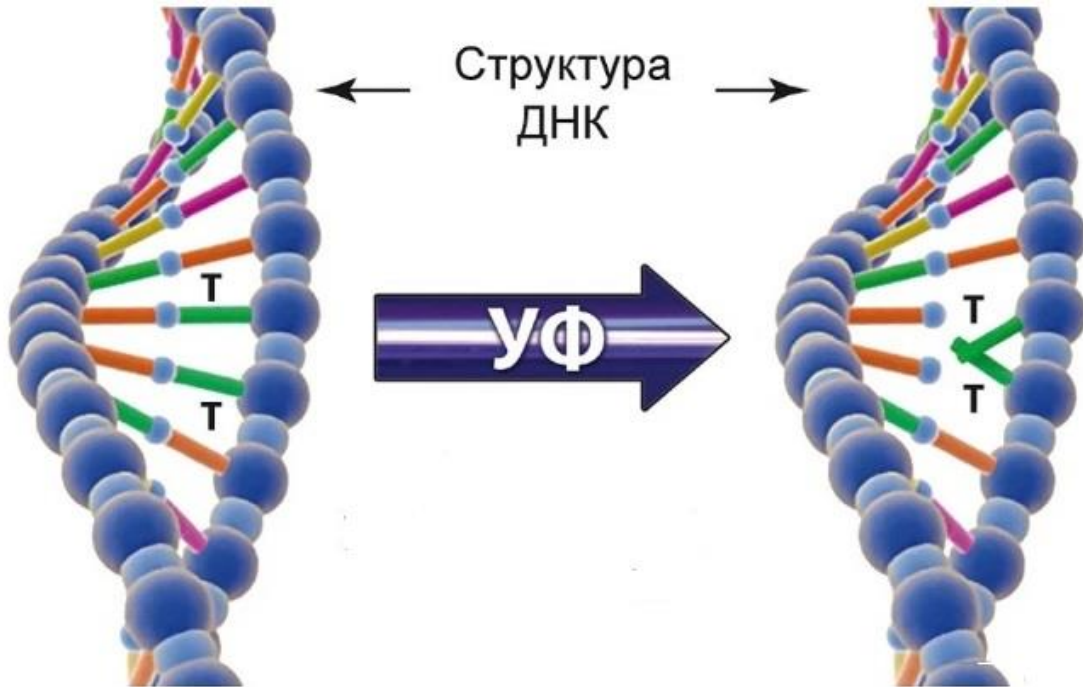
4.1. ПЛР-лабораторія повинна мати:

- журнал реєстрації контамінації ПЛР-лабораторії нуклеїновими кислотами;

Попередження контамінації. Зауваження

- Детально не описані процедури знезараження холодильників та морозильних камер, які можуть слугувати джерелом вторинної контамінації та її персистенції. Те саме стосується штативів для наконечників, якщо використовуються наконечники насипом.
- На практиці – при переході з однієї зони до іншої лаборанти одяг не змінюють. Одноразові халати використовуються багаторазово
- Генеральні \ поточні прибирання проводяться без використання хлорвмісних речовин і не інактивують контамінанту, а, навпаки, сприяють її розповсюдженню
- Премія Дарвіна за буквальне виконання цього пункту для постампліфікаційних пробірок: *«На кожному робочому місці розташовують спеціальний контейнер з дезінфекційним розчином, у який скидають одноразовий пластиковий посуд (пробірки у відкритому стані, наконечники)»*

Зауваження щодо УФ-обробки



УФ-лампи мають обмежений час використання (6-13 тис годин), їх потрібно змінювати.

УФ-обробка ефективна лише коли поверхня гладенька та розташована перпендикулярно до УФ-промінів

Ефективність УФ-обробки лімітована відстанню до УФ-лампи і залежить від інтенсивності УФ-випромінювання

Ефективність УФ-обробки залежить від молекулярної маси НК та її первинної послідовності.



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАКАЗ

06.05.2021 № 882

Зареєстровано в Міністерстві
юстиції України
28 липня 2021 р.
за № 978/36600

Про затвердження санітарно-протиепідемічних правил і норм
використання ультрафіолетового бактерицидного
випромінювання для знезараження повітря та дезінфекції
поверхонь в приміщеннях закладів охорони здоров'я та
установ/закладів надання соціальних послуг/соціального
захисту населення

Що каже наказ №882

1. Забороняється використовувати лампи, при роботі яких утворюється озон. Що робити: замінити колби УФБО на безозонові (~ 500-900 грн)
2. Огляд стану ламп проводиться щоденно. Не рідше ніж 2 рази на рік використовувати радіометри для перевірки інтенсивності УФ-випромінювання на довжині хвилі 254 нм.
3. Використовувати ЦФ-лампи лише на відкриті поверхні (виймаємо все з ШББ перед УФ-обробкою та проводимо вологе прибирання!!!)
4. Кількість УФБО розраховується так: 1 Вт потужності УФБ лампи на 1 м³ об'єму приміщення.
5. Час опромінювання розраховується так:

$$t(c) = 10000 / p$$

Де **t (c)** - час в секундах, потрібний для деконтамінації приміщення від мікобактерій туберкульозу;

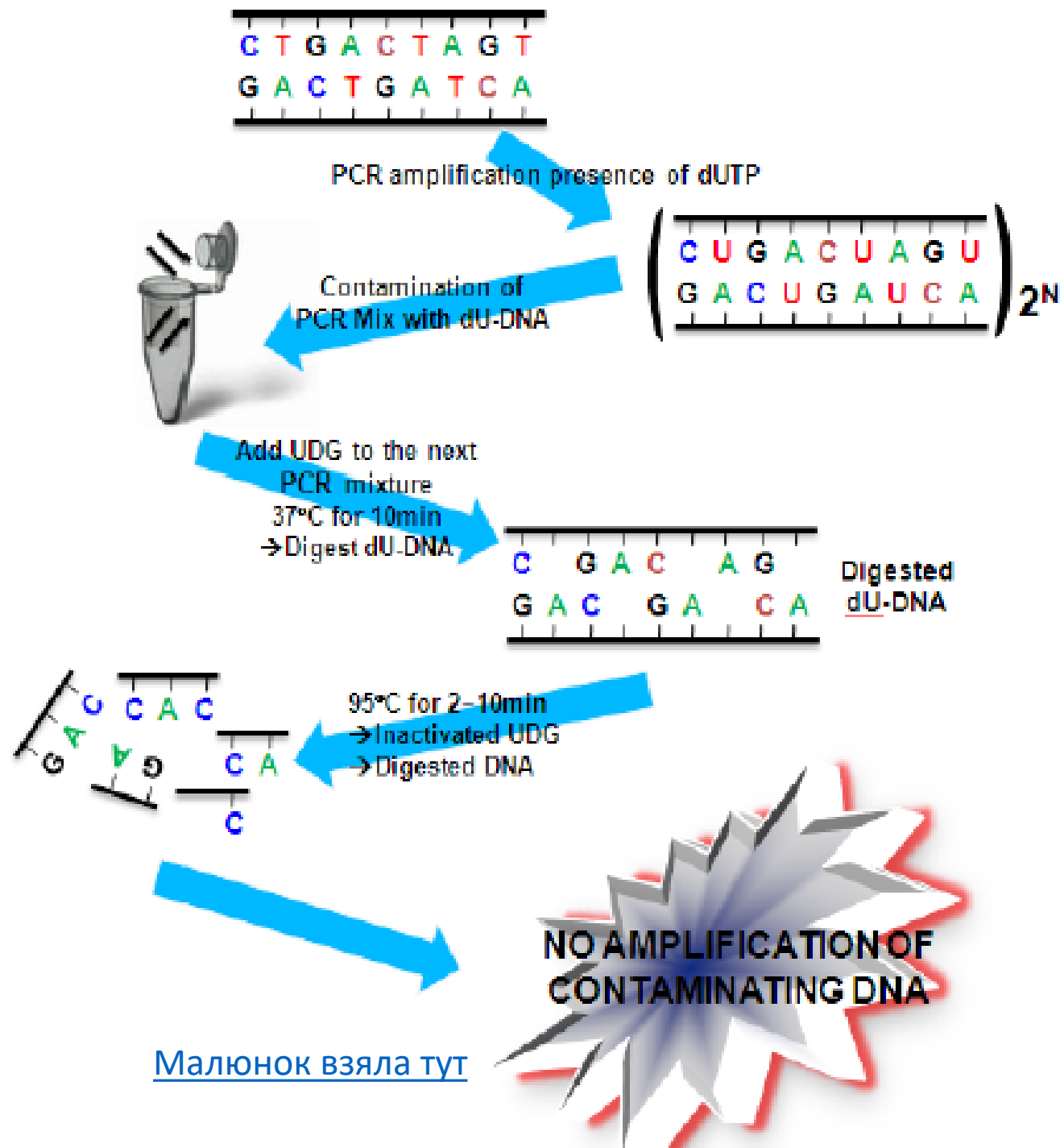
10000 - летальна об'ємна доза (99%) УФБВ (в мкДж/см²) на довжині хвилі 254 нм для мікобактерій туберкульозу;

P - інтенсивність УФБВ на довжині хвилі 254 нм (мкВт/см²), що виміряна за допомогою УФ-радіометру в точці приміщення, яка є найбільш віддаленою від УФБ лампи.

6. Необхідно періодично чистити колби УФБО від пилу з частотою від 1 разу на 2 тижні до 1 разу на кілька місяців

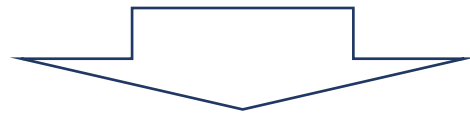
Як працює УДГ

- Урацил-N-глікозилаза гідролізує ДНК по залишках урацилу;
- В реакційній суміші замість дТТФ використовується дУТФ
- Амплікони, на відміну від нативної ДНК, стають чутливими до UNG-гідролізу
- УДГ – термолабільний фермент, інактивується під час гарячого старту. Термолабільні ізоформи УДГ можуть використовуватись навіть для ЗТ (45-50°C)



Обмеження УДГ-протоколу

- Не дає абсолютний ефект (знижує кількість ампліконів \sim в 100 разів)
- Пошкоджені УДГ амплікони, контамінуючи зразок, можуть конкурувати з цільовою НК за зв'язок з праймерами, знижати чутливість тест-систем та призводити до ХНР
- Не спрацьовує, якщо контамінанта – нативна НК



- Достатньо ефективний метод попередження контамінації, але не панацея.
 - Не дозволяє продовжувати працювати в умовах контамінації

Виявлення контамінації

Негативні контрольні зразки етапу екстракції (НКЗ) та ампліфікації (К-)

Змиви з робочих поверхонь

Негативні зразки

Негативний контроль екстракції (НКЗ)	Негативний контроль ампліфікації (К-)	Інтерпретація
<ul style="list-style-type: none"> • Обов'язковий при кожній постановці • Дозволяє розрізнити спорадичну чи масивну контамінацію зони екстракції (та ампліфікації) 	<ul style="list-style-type: none"> • Обов'язковий лише при підозрі на контамінацію (якщо в інструкції не передбачено інше) <ul style="list-style-type: none"> • Не є специфічним маркером контамінації ампліконами. Здатен виявляти також контамінацію кДНК, плазмідною ДНК калібраторів та позитивних контролів, НК зразків після екстракції. • Вирогідність виявлення спорадичної контамінації на етапі ампліфікації дуже мала (через малий об'єм зразка). Навіть один позитивний результат К- підтверджує масивну контамінації зони ампліфікації 	
Один НКЗ в постановці позитивний	Негативний	Спорадична контамінація зони екстракції
Два та більше НКЗ в постановці позитивні	Негативний	Масивна контамінація зони екстракції
Позитивний	Позитивний	Масивна контамінація зони ампліфікації та зони екстракції

Зауваження щодо використання негативних контролів

- «Негативний» НКЗ не гарантує відсутності контамінації, якщо контамінація спорадична. Серед усіх досліджуваних зразків контамінованим може бути лише один.
- НКЗ неефективний при використанні інтеркалюючих фарбників в тест-системі (за відсутності цільової мішені в зразку можливе утворення праймер-димерів і ХПР при відсутності контамінації)
- Одного НКЗ на постановку може бути недостатнім. Деякі автори вважають: доля НКЗ має складати не менше 15% від кількості зразків*. НКЗ мають розташовуватись в рандомному порядку (або в кінці постановки).

Змиви з робочих поверхонь

- Дозволяють встановити: первинне та вторинні джерела контамінації, об'єм контамінації та ефективність деконтамінаційних заходів.
- Згідно наказу №26 – відбираються не рідше ніж 1 раз на квартал. Періодичність визначається керівником. Проте щоквартальне взяття змивів не дозволяє оперативно виявляти контамінацію.
- Необхідно відбирати змиви планово – після генерального прибирання (напр., щотижня), та позапланово – при підозрі на контамінацію (напр., при позитивному НКЗ + К-), а також обов'язково – після деконтамінаційних заходів для оцінки їх ефективності.

Методика ВЗЯТТЯ ЗМИВІВ

- Підготувати необхідну кількість пробірок «епендорф» з 300-500 мкл фізіологічним розчином, TE-буфером, дистильованою водою чи транспортним середовищем (важливо: транспортне середовище без лізуючого буфера) та відповідну кількість зондів-тампонів. Промаркувати пробірки.
- Змочити зонд у вмісті пробірки, взяти змиви з робочих поверхонь площею 10x10 см. Змиви відбирають з поверхонь обладнання, меблів, дверних ручок, ручок холодильників та передаточних вікон тощо.
- Після відбору змиву тампон помістити у пробірки типу "епендорф" обертальними рухами змити відібраний матеріал і, відтиснувши надлишок рідини з тампону об стінки пробірки, видалити тампон. Одержані суспензії центрифугують при 8 000 g (12 000 об/хв) протягом 1 хвилини.
- Після цього, **минаючи етап екстракції**, передати пробірки на етап ампліфікації, перенести аліквоту суспензії в підготовлену ПЛР пробірку з реакційною сумішшю, помістити пробірки в ампліфікатор та запустити відповідну програму ампліфікації.
- При підозрі на контамінацію нативною ДНК \ РНК аліквоту змивів об'ємом 100-200 мкл провести через етап екстракції і подальшої ампліфікації
- Результати (Ct) внести в журнал змивів

Форма обліку результатів

Логотип лабораторії	НАЙМЕНУВАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ, НОМЕР, ВЕРСІЯ	стор 1 з 1
	ФОРМА ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЮ ПЛР-ЛАБОРАТОРІЇ МЕТОДОМ ВЗЯТТЯ ЗМИВІВ	дійсно з

Дата _____ ПІБ ВИКОНУВАЧА _____

№	Місце відбору змиву	Мітка 1 (анал. SAKS- CoV-2)	Мітка 2	Мітка 3	...													
Зона прийому, відбору, реєстрації та сортування біологічного матеріалу																		
1	Шафа біологічної безпеки (ШББ)																	
2	Стіл для сортування зразків																	
3	Ручки дверей																	
4	Ручки холодильника																	
5	Передаточне вікно																	
6...	...																	
Зона екстракції нуклеїнових кислот																		
1	ШББ №1																	
2	ШББ №2...																	
3	Автоматична платформа для екстракції НК																	
4	Ручки дверей																	
5	Ручки холодильника																	
6	Передаточне вікно																	
7...	...																	
Зона приготування реакційних сумішей																		
1	ПЛР-бокс №1																	
2	ПЛР-бокс №2...																	
3	Автоматична платформа для піпетування																	
4	Ручки дверей																	
5	Ручки холодильника																	
6	Передаточне вікно																	
7...	...																	

Результат _____

Підпис виконувача _____

Зразки як маркер контамінації

- У випадку спорадичної контамінації під час екстракції окремі негативні зразки можуть стати хибно-позитивними при «чистому» негативному контролі. Джерелом можуть бути:
 - Сусідні висококопійні зразки (контамінація «від пробірки до пробірки»). Слідкуйте за наявністю висококопійних зразків в постановці ($Ct < 15$) і поруч розташованих слабо-позитивних ($Ct > 30$)*.
 - Розлив зразків під час транспортування. Відмовляйтесь від розлитого біоматеріалу.
 - Штативи для наконечників, якщо вони використовуються багаторазово (контамінація накопичення). Періодично обробляйте штативи з наконечниками або використовуйте одноразові штативи.
 - Контаміновані рухомі частини автоматичних станцій екстракції. Тестуйте низькокопійні зразки в дублях (на екстракції чи \ та на ампліфікації). Це пов'язано зі стохастичним розподіленням НК в розчині низькокопійного зразка.
- Пам'ятайте про очікувану частоту виявлення збудника в кожній виборці. Якщо кількість позитивних результатів перевищує очікувану – час підозрювати контамінацію**
- Негативний результат при повторному тестуванні низькокопійного зразка не обов'язково свідчить про контамінацію при першому дослідженні. Пам'ятайте про низьку відтворюваність слабопозитивних результатів (особливо для РНК при тривалому зберіганні). Завжди використовуйте референсну ТС при повторному дослідженні

Результат
розлиття зразка
під час
транспортування

Магнітна сепарація				
Well Position	Sample Name	Target Name	Reporter	CT
A1	2	COVID	FAM	Undetermined
A1	2	IPC	VIC	14.212
A2	9	COVID	FAM	32.180
A2	9	IPC	VIC	16.386
A6	NC	COVID	FAM	Undetermined
A6	NC	IPC	VIC	35.661
A7	PC	COVID	FAM	27.437
A7	PC	IPC	VIC	27.452
A8	K-	COVID	FAM	Undetermined
A8	K-	IPC	VIC	Undetermined
Колонки				
Well Position	Sample Name	Target Name	Reporter	CT
A2	2	COVID	FAM	34.857
A2	2	IPC	VIC	14.040
A9	9	COVID	FAM	30.922
A9	9	IPC	VIC	15.047
A10	10	COVID	FAM	Undetermined
A10	10	IPC	VIC	15.484
A11	PC	COVID	FAM	26.101
A11	PC	IPC	VIC	27.386
A12	NC	COVID	FAM	Undetermined
A12	NC	IPC	VIC	Undetermined
B1	k-	COVID	FAM	Undetermined
B1	k-	IPC	VIC	Undetermined

Що робити
при отриманні
«ПОЗИТИВНОГО»
НКЗ, К- чи
ЗМИВІВ?

1. Зупиніть видачу позитивних результатів по цій мішені (негативні результати можна видати). Зупиніть виконання досліджень на цей патоген. Повідомте керівництво про аварійний стан «контамінації».
- Іноді контамінація може бути настільки масивною, що необхідно прийняти рішення про зупинку всіх процесів в лабораторії, в тому числі, прийому та реєстрації зразків, для попередження їх контамінації.
 - На такий випадок бажано мати резервне приміщення \ обладнання для проведення мінімуму найбільш необхідних процесів (наприклад, прийом та архівування зразків до моменту відновлення роботи лабораторії)

Що робити
при отриманні
«ПОЗИТИВНОГО»
НКЗ, К- чи
ЗМИВІВ?

2. Утилізуйте всі відкриті витратні матеріали, ЗІЗи, реагенти.
 3. Відберіть змиви з робочих поверхонь. Оцініть обсяг контамінації, її джерела.
- Бажано мати два переліка точок, з яких відбираються змиви: рутинний (менша кількість точок, акцент на місця передачі контамінації: ручки дверей, холодильників, передаточних вікон тощо), та на випадок аварійної ситуації – більш деталізований.
 - Проаналізуйте результати останніх постановок – чи не збільшилась кількість позитивних результатів за даною мішенню? Це допоможе оцінити обсяг контамінації

BIOLOGICAL CONTROL OF QUALITY PCR
ЖУРНАЛ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПЛР-
ДОСЛІДЖЕНЬ МЕТОДОМ ВІДБОРУ ЗМИВІВ

valid from

Дійсно з

Дата: ПІБ виконавця:

№	Місце відбору змива	Мікробіологічні показники							впл вкр							
		<i>M. hominis</i>	<i>G. vaginalis</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>T. vaginalis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>								
Зона сортування зразків																
1	ПЛР-бокс	-	-	-	-	-	-	-	-							
2	SELMA №1	-	-	-	-	-	-	-	-							
3	SELMA №2	-	-	-	-	-	-	-	-							
4	Стол для сортування зразків	-	35	-	-	-	-	-	-							
5	Ручки дверей	-	-	-	-	-	-	-	-							
6	Передаточне вікно	-	-	-	-	-	-	-	-							
Зона екстракції НК №1																
13	Передаточне вікно	-	-	-	-	-	-	-	-							
Зона екстракції НК №2																
14	ШББ №1	-	-	-	-	-	-	-	-							
15	ШББ №2	-	-	-	-	-	-	-	-							
16	ШББ №3	-	-	-	-	-	-	-	-							
17	ШББ №4	-	-	-	-	-	-	-	-							
18	ШББ №5	-	-	-	-	-	-	-	-							
19	ШББ №6	33	-	-	-	-	-	-	-							
20	Автоматична станція екстракції НК King Fisher Flex 96 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-							
21	Автоматична станція екстракції НК MagMax Express (2)	-	-	-	-	-	-	-	-							
22	Автоматична станція екстракції НК King Fisher Flex 96 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-							
23	Робочий стіл	-	36	-	-	-	-	-	-							

Form

Версія

BIOLOGICAL CONTROL OF QUALITY PCR
ЖУРНАЛ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПЛР-
ДОСЛІДЖЕНЬ МЕТОДОМ ВІДБОРУ ЗМИВІВ

valid from

Дійсно з

24	Ручки дверей	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
25	Передаюче вікно	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
Кімната ампліфікації (вірусні гепатити)																		
26	ПЛР-бокс №1	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
27	ПЛР-бокс №2	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
28	Робочий стіл, заповува для плашок	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
29	Робочий стіл, CFX96 #6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
30	Робочий стіл, CFX96 #10, 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
31	Робочий стіл, CFX96 #9	-	30	-	-	-	-	-	-	-								
32	Hamilton 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
33	Hamilton 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
34	Ручки дверей	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
35	Автоматична станція літєвання QIAcility №3	-	32	-	-	-	-	-	-	-								
36	Робочий стіл, CFX96 #11, 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
37	Робочий стіл, CFX96 #13	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
Кімната приготування реакційної суміші																		
38	ПЛР-бокс №1	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
39	ПЛР-бокс №2	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
40	ПЛР-бокс №3	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
41	ПЛР-бокс №4	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
42	ПЛР-бокс №5	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
43	Автоматична станція літєвання QIAcility №1	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
44	Автоматична станція літєвання QIAcility №2	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
45	Робочий стіл	-	33	-	-	-	-	-	-	-								
46	Ручки дверей	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
47	Передаюче вікно	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
Апаратна кімната																		

Form
Версія

BIOLOGICAL CONTROL OF QUALITY PCR
ЖУРНАЛ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПЛР-
ДОСЛІДЖЕНЬ МЕТОДОМ ВІДБОРУ ЗМИВІВ

valid from

Дійсно з

48	Робочий стіл, CFX96 #8, 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
49	Робочий стіл, CFX96 #1, Rotor Gene #6	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
50	Робочий стіл, CFX96 #5, Rotor Gene #7	-	31	-	-	-	-	-	-	-						
51	Робочий стіл, ДТ96 №1	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
52	Робочий стіл, CFX96 #3, 4, Rotor Gene #8	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
53	Робочий стіл, Rotor Gene 1,2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
54	Робочий стіл, Rotor Gene #4	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
55	Робочий стіл, Rotor Gene #5, Techno	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
56	Ручки дверей	-	-	-	-	-	-	-	-	-						

Результат: задовільний. В № 19,4,23,31,35,45,50 була виявлена слабкопозитивна точкова контамінація. В цих точках були проведені деконтамінаційні заходи і відібрані повторні змиви, які показали негативний результат. Деконтамінаційні заходи були проведені з використанням 0,3% розчину Жавель-Клейду та розчину Бацидол. Протоколи первинних та повторних змиві у вкладенні.

Підпис виконавця:

Що робити
при отриманні
«ПОЗИТИВНОГО»
НКЗ, К- чи
ЗМИВІВ?

4. Для виконання наступного пункту розділіться на групи. Кожна група виконує обробку своєї робочої зони. Використовуйте окремий інвентар для кожної зони.
5. Проведіть генеральне прибирання лабораторії, включаючи миття підлоги, стін, підвіконня та робочих поверхонь меблів наступними розчинами:
 - Мильним розчином. Ретельно змийте водою
 - Хлорвмісним розчином (напр., «Жавель Клейд» чи інший, дозволений до використання). Витримайте експозицію згідно з інструкцією та відповідно до матеріалу робочої поверхні. Ретельно змийте водою.
 - Обробіть поверхні лабораторного обладнання (якщо дозволено інструкцією з експлуатації даного виду обладнання), столешниці ШББ та ПЛР-боксів 70% етиловим спиртом
 - Обробіть поверхні УФ

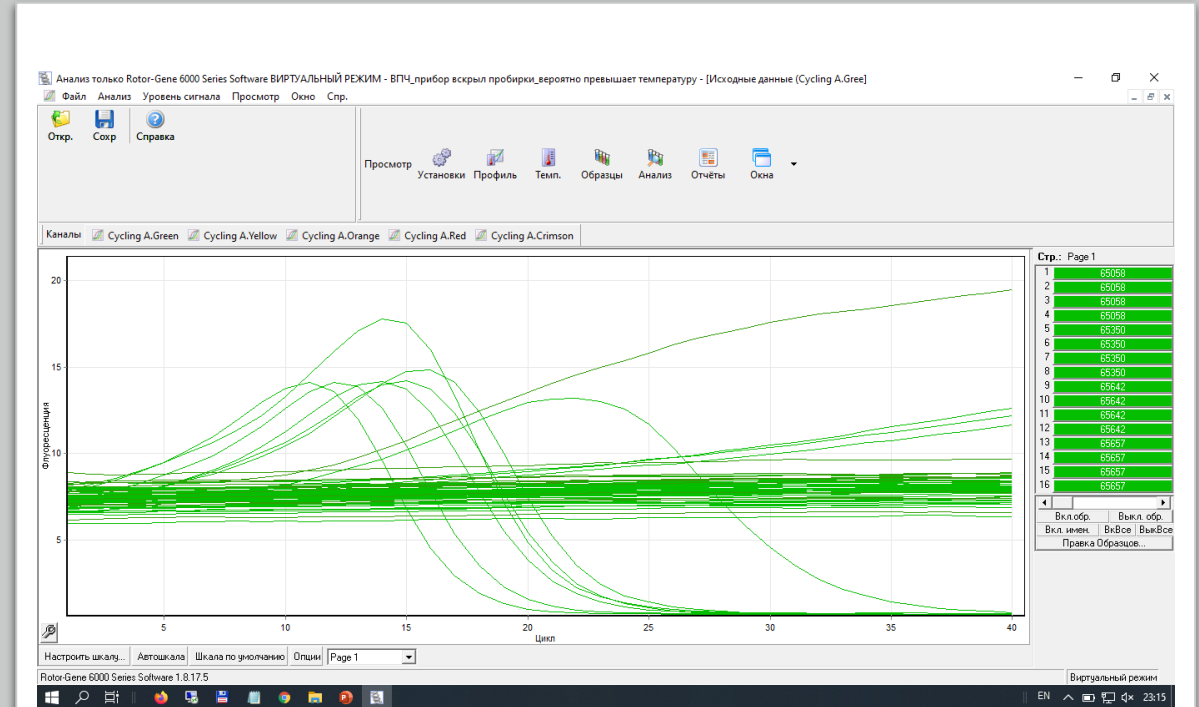
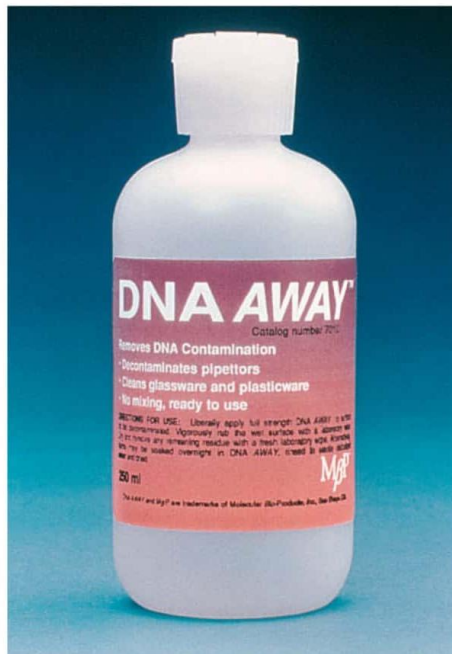
Що робити
при отриманні
«ПОЗИТИВНОГО»
НКЗ, К- чи
ЗМИВІВ?

5. Замочіть у хлорвмісному розчині пластикові штативи для пробірок. Витримайте експозицію згідно з інструкцією. Ретельно вимийте проточною водою.
6. Відберіть повторні змиви. При появі позитивних результатів повторних змивів повторіть миття лабораторії (пункти 4-5). Повторюйте процедуру до отримання негативних результатів. При ефективному прибиранні значення C_t в забруднених точках мають збільшуватись, а потім зникнути.
7. Замініть реагенти, витратні матеріали та ЗІЗи на нові.
8. Можна повертатись до аналізу результатів. Повторіть аналіз позитивних зразків та видайте результати.

Корисні поради

1. Дуже ефективним засобом деконтамінації є комерційні розчини ДНКаз (DNA Away від Thermo Fisher, DNAZap від Invitrogen тощо)

- ДНКази стійкі в оточуючому середовищі і здатні накопичуватись. При постійному використанні можуть потрапляти в ПЛР-пробірки під час підготовки до ампліфікації, та призводити до руйнування ампліконів



Корисні поради

- Деякі лабораторії використовують силіконові насадки на ручки дверей, які щоденно замочуються в хлорвмісних розчинах та замінюються.
- Увага!!! Не купуйте поролонові насадки! Поролон як губка збирає амплікони і є джерелом контамінації
- Можна використовувати серветки, змочені в хлорвмісному розчині. Огорніть ручки дверей мокрими серветками та зафіксуйте бахілою чи одноразовою шапочкою. Залиште до висихання серветки, а потім замініть на свіжу



Рекомендації щодо запобігання контамінації

- Змиви з робочих поверхонь – 1 раз на тиждень (при кількості досліджень до 100 зразків на тиждень змиви робимо 1 раз на 2 тижні). При підозрі на контамінацію (наявність специфічних сигналів в негативному контролі) змиви робити позачергово!
- Рекомендувати перегляд, оновлення та внесення змін до 26 наказу МОЗ України від 2008 р «Про затвердження державних санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами»
- Лабораторною командою СО WHO розроблена СОП по проведенню внутрішнього лабораторного контролю якості в ПЛР-лабораторії методом взяття змивів з робочих поверхонь, яка буде поширена по лабораторіях
- В січні 2023 р був проведений вебінар «[Контамінація в ПЛР-лабораторії](#)». На вересень запланований повтор вебінару, учасникам надісланий СОП. Для отримання сертифікату всі учасники вебінару мають пройти тестування.
- Взяття змивів – частина внутрішньолабораторного контролю якості, тому витрати на його проведення необхідно вносити до бюджету.
- Включати негативний контроль етапу екстракції НК в кожну постановку (не менше ніж один негативний контроль на 24 зразка)
- Включити в закупівлю розчини ДНКаЗ для попередження контамінації ([DNAzap](#), [DNA-Erase](#), чи аналоги)
- Покласти відповідальність на дотримання практики взяття змивів на завідувача лабораторії.

Дякую за
увагу