DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-55-61

Бактериология, 2022, том 7, №1, с. 55–61
Bacteriology, 2022, volume 7, No 1, p. 55–61

Соблюдение требований биологической безопасности в диагностических лабораториях во время пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19)

Е.А.Тюрин, Л.В.Чекан, М.В.Храмов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Проведение лабораторной диагностики биоматериалов бактериального и вирусного происхождения требует неукоснительного соблюдения требований биологической безопасности. Это касается и исследований, проводимых в лабораториях различных уровней защиты, использующих экспресс-методы полимеразной цепной реакции. Рассмотрены условия работ с биоматериалами, подозрительными на содержание возбудителей инфекционных заболеваний I–IV групп патогенности. Сделан вывод о необходимости строгого соблюдения требований биологической безопасности при проведении генетических исследований.

Ключевые слова: биологическая безопасность, возбудители инфекционных заболеваний, лабораторная диагностика, генетический материал, полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Храмов М.В. Соблюдение требований биологической безопасности в диагностических лабораториях во время пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19). Бактериология. 2022; 7(1): 55–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-55-61

Biosafety compliance in diagnostic laboratories during the SARS-CoV-2 virus (COVID-19) pandemic

E.A.Tyurin, L.V.Chekan, M.V.Khramov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Laboratory diagnostics of biomaterials of bacterial and viral origin requires strict adherence to biological safety requirements. This also applies to studies conducted in laboratories of various levels of protection using express methods of polymerase chain reaction. The work conditions with biomaterials suspicious for the presence of pathogens of infectious diseases of I–IV pathogenicity groups are considered. It is concluded that it is necessary to strictly comply with the requirements of biological safety when conducting genetic studies.

Key words: biological safety, pathogens of infectious diseases, laboratory diagnostics, genetic material, polymerase chain reaction

For citation: Tyurin E.A., Chekan L.V., Khramov M.V. Biosafety compliance in diagnostic laboratories during the SARS-CoV-2 virus (COVID-19) pandemic. Bacteriology. 2022; 7(1): 55–61. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-55-61

Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы является важной составляющей эпидемиологического надзора в рамках санитарной охраны территории Российской Федерации [1, 2]. Лабораторную диагностику биологического материала осуществляют различными методами, одним из которых является реакция амплификации нуклеиновых кислот, или полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР – молекулярно-биологический метод, основанный на катализируемой ДНК-полимеразой реакции. Это очень быстрая реакция, в основе которой лежит многократное удвоение определенного участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*), позволяющая амплифицировать (*от англ.* amplify – многократно увеличивать, усили-

Для корреспонденции:

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0016
E-mail: turin@obolensk.org

Статья поступила 22.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Eugene A. Tyurin, MD, PhD, Leading Researcher of The Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 “Quarter A” Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0016
E-mail: turin@obolensk.org

The article was received 22.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

вать) в миллионы раз в течение нескольких часов в биологическом материале малые концентрации определенных фрагментов ДНК [3]. В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Кроме простого увеличения числа копий ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и может широко использоваться в биологической и медицинской практике – например, для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний, установления отцовства, клонирования генов, введения мутаций, выделения новых генов. Именно этим методом проводят диагностику вирусных инфекций, таких как гепатиты, ВИЧ, грипп, коронавирус и др.

Специфичность метода существенно выше, чем у иммунохимических и микробиологических методов, а принцип метода позволяет диагностировать наличие инфекций со значительной антигенной изменчивостью. Поэтому методы амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов I–IV групп патогенности используют в биологии и медицине в качестве:

• метода экспресс-диагностики при исследовании биологического материала, взятого от человека, с целью выявления ДНК/РНК микроорганизмов I–IV групп патогенности и их количественной оценки;

• метода специфической индикации патогенных биологических агентов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах;

• ускоренного предварительного теста при выполнении культурального и биологического методов исследования и для идентификации культур;

• оценки эпидемиологической значимости изолятов на основании выявления генетических маркеров вирулентности и патогенности, антибиотикоустойчивости;

• оценки таксономической характеристики штаммов на основании выявления специфических видовых, родовых и других маркеров;

• оценки генотипирования штаммов с целью определения их происхождения;

• основы прогнозирования течения инфекционного заболевания и оценки эффективности проводимой терапии.

Исследование материала, содержащего или подозрительного на содержание микроорганизмов I–IV групп патогенности, методами амплификации нуклеиновых кислот связано с необходимостью одновременного обеспечения и соблюдения персоналом правил биологической безопасности (ББ) и требований к организации при проведении данных работ с целью предотвращения контаминации помещений и оборудования нуклеиновыми кислотами и/или ампликонами исследуемых проб.

Данные исследования проводят в лабораториях организаций, имеющих лицензию на деятельность, связанную с возбудителями инфекционных заболеваний человека бактериальной и/или вирусной природы. Лаборатории, в которых проводят диагностические исследования, должны иметь «срочные» санитарно-эпидемиологические заключения, выданные в установленном порядке на срок не более пяти лет, о соответствии условий государственным санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативным документам [4–6].

Целью работы являлась оценка условий ББ в диагностических лабораториях различных учреждений и организаций, выполняющих исследования при помощи ПЦР.

Соблюдение противоэпидемического режима работы лаборатории должно быть обеспечено в соответствии с положениями санитарно-эпидемиологических правил и требованиями ББ, регламентирующими работу с микроорганизмами I–II и III–IV групп патогенности соответственно [6–8]. Проведение исследований биологического материала без предварительного накопления возбудителя возможно в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III–IV групп патогенности, но с указанием конкретных видов микроорганизмов, которое также выдается в установленном порядке [4], то есть допускается исследование биологического материала, подозрительного на инфицирование микроорганизмами II группы патогенности, в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III–IV групп патогенности, только в тех случаях, для которых разработаны и утверждены нормативные документы, регламентирующие порядок проведения таких исследований в условиях данной лаборатории.

Размещение и организация деятельности лаборатории для проведения ПЦР

При строительстве новых лабораторий или при реконструкции старых помещений лабораторию стараются размещать в отдельно стоящем здании или изолированной части здания, этажа с соблюдением требований санитарно-эпидемиологических правил, соблюдая условия наличия «чистой» и «заразной» зон [6–8]. Помещения лаборатории должны быть обустроены в виде боксов с предбоксами с указанием рабочих зон. Боксовые помещения оборудуются приточно-вытяжной вентиляцией с высокоэффективными фильтрами очистки воздуха класса безопасности не ниже H14; водопроводом, не связанным с централизованной сетью (через бак разрыва струи); канализацией с системой обеззараживания сточных вод; электричеством и отоплением; средствами пожаротушения; естественным и искусственным освещением. Внутренние помещения «чистой» и «заразной» зон лаборатории должны быть непроницаемы для грызунов и насекомых. Стены, пол и потолок помещений отделывают кафелем или краской, устойчивой к действию моющих и дезинфицирующих растворов. Они должны быть гладкими, без щелей, легко обрабатываемыми. В рабочих помещениях «заразной» зоны устанавливают бактерицидные лампы [9]. Окна плотно закрыты, без форточек, возможно использование светозащитных пленок из материала, устойчивого к действию используемых дезинфицирующих средств.

Архитектурно-планировочные решения и размещение оборудования в лаборатории должны обеспечивать поточность движения исследуемого материала. Лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна иметь определенный набор расположенных последовательно са-

мостоятельных рабочих помещений-зон или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений:

• рабочая зона 1 – зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки доставленного материала;

• рабочая зона 2 – зона выделения нуклеиновых кислот;

• рабочая зона 3 – зона приготовления реакционных смесей и проведения реакции амплификации (ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), *англ.* Real-time PCR) и учета ее результатов при использовании гибридизационно-флуоресцентного метода детекции;

• рабочая зона 4-1 – зона учета результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза и/или гибридизационно-ферментным методом детекции;

• рабочая зона 4-2 – зона учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования и/или на ДНК-чипах.

Материал передают между зонами в контейнерах через шлюзы, в которых установлены бактерицидные лампы для обеззараживания воздуха.

Лаборатория оборудуется вспомогательными помещениями: комнатами для персонала, кабинетом заведующего лабораторией, раздевалками для сотрудников, комнатой приема пищи, туалетом, подсобными (складскими) помещениями, которые располагаются на «чистой» стороне лаборатории. Обеззараживание исследуемого материала проводиться в помещении автоклавной, которая может быть общей с другими подразделениями учреждения, но при условии соблюдения требований ББ – разделения материальных потоков по времени доставки и месту предварительного хранения.

Прием материала, его маркировку, регистрацию в специальном журнале, первичную подготовку (концентрирование материала путем центрифугирования, фильтрации, иммуносорбции, суспендирование, перевод сухих и плотных материалов в жидкую фазу и т.д.), объединение или разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала осуществляют в рабочей зоне 1. В рабочей зоне 2 проводят выделение и очистку нуклеиновых кислот микроорганизмов из проб, подготовленных в рабочей зоне 1.

В рабочей зоне 3 осуществляют приготовление реакционных смесей, проведение обратной транскрипции, амплификации нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридизационно-флуоресцентного метода детекции.

Приготовление реакционных смесей для проведения обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот осуществляют до доставки в рабочую зону 3 проб, подготовленных в рабочей зоне 2.

Можно разделить рабочую зону 3 на две подзоны (3а и 3б), разместив их в отдельных помещениях. В подзоне 3а готовят реакционные смеси и проводят обратную транскрипцию. В подзоне 3б проводят амплификацию нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридизационно-флуоресцентного метода детекции. При необходимости возможно совмещение рабочей зоны 2 и рабочей зоны 3 в одном помещении при наличии в нем отдельных боксов микробиологической безопасности II или III классов для каждой из рабочих зон.

Рабочие зоны 4-1 и 4-2 располагают изолированно от рабочих зон 1–3 для предотвращения их контаминации продуктами амплификации через воздух. Рабочая зона 4-1 предназначена для учета результатов продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза и/или гибридизационно-ферментным методом детекции, а также очистки продуктов амплификации для секвенирования. Рабочая зона 4-2 предназначена для учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования и/или на ДНК-чипах.

При использовании различных методов учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот (электрофорез, гибридизационно-ферментативный анализ, секвенирование и ДНК-чипы) в рабочих зонах 4-1 и 4-2 выделяют отдельные рабочие подзоны или отдельные боксированные помещения (отдельные изолированные помещения) для каждого типа детекции. Объединение рабочих зон 4-1 и 4-2 запрещается.

Как было сказано выше, помещения лаборатории оборудуют приточно-вытяжной вентиляцией [6–8]. Воздушный режим в рабочих зонах 1 и 2 регулируют таким образом, чтобы вытяжка преобладала над притоком и в помещениях присутствовало разрежение 100–150 Па. В рабочей зоне 3 объем приточного воздуха должен соответствовать объему на вытяжке, и, таким образом, разрежение отсутствует.

Рабочие зоны 4-1 и 4-2 желательно оборудовать автономной системой приточно-вытяжной вентиляции. Вытяжка должна преобладать над притоком и создавать разрежение в помещении зон 100–150 Па. В условиях жаркого климата разрешается установка кондиционеров в помещениях рабочих зон лаборатории при условии их выключения на время проведения работ с последующей дезинфекционной обработкой рабочего места.

Каждая самостоятельная рабочая зона оснащается минимальным набором соответствующего лабораторного оборудования в зависимости от их функционального назначения и риска контаминации, мебелью, многоразовой и одноразовой пластиковой и стеклянной посудой, расходными материалами, защитной одеждой и уборочным инвентарем, который используется только в данном помещении. Лабораторная мебель, оборудование и принадлежности каждой рабочей зоны маркируют номером указанной зоны или помещения. Их применение в других рабочих зонах (помещениях) или для других видов исследований не допускается.

Рабочие поверхности лабораторной мебели и используемого оборудования должны быть устойчивы к действию моющих и дезинфицирующих растворов, ультрафиолетового излучения. Поверхность столов не должна иметь трещин и швов. Оборудование и измерительные приборы, используемые в работе, должны быть исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации и по соблюдению требований ББ, соответствовать нормам электробезопасности и электромагнитной совместимости. Средства измерения не реже одного раза в год поверяют в специализированных центрах. В лаборатории в каждом предбоксе должна быть аварийная аптечка стандартной комплектации для оказания первой медицинской помощи при авариях в соответствии с действующими санитарными правилами в зависимости от того с каким возбудителем бактериальной

или вирусной природы будут проводить работы «заразной» зоне [6–8]. Каждый предбокс оборудуется световой и звуковой аварийной сигнализацией, которая выводится в коридор и на пост дежурного по лаборатории.

Допуск сотрудников лаборатории к работам по исследованию материала, поступившего на диагностику

Допуск сотрудников для проведения диагностических работ материала, имеющего в своей основе генетические конструкции, осуществляют на тех же условиях, что и допуск персонала к работам с микроорганизмами бактериальной или вирусной природы [6, 7]: после прохождения входного медицинского осмотра, первичной подготовки на специализированных курсах с основами ББ и на сертификационных специальных курсах по постановке реакции амплификации (ПЦР), инструктажа по ББ и сдачи зачета по знанию требований и положений ББ. Все работы с материалом выполняют, соблюдая принцип парности (работа только вдвоем). При этом нахождение в «заразной» зоне не должно превышать 4 ч. При длительной работе (>4 ч) возможен перерыв в течение 60 мин с выходом из зоны и отдыхом с последующим возвратом в «заразную» зону [7, 8].

Требования биологической безопасности к порядку получения проб, подготовке их для исследования и постановке реакции

В соответствии с письмом руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) Поповой А.Ю. «…возникающие (впервые выделенные) патогенные биологические агенты, не включенные в Классификацию, а также известные ранее, однако обладающие новыми патогенными для человека свойствами патогенные биологические агенты, в отношении которых известны случаи летальных исходов заболевания и/или имеются сведения о высоком эпидемическом потенциале, следует относить ко II группе патогенности» [10].

Любые клинико-диагностические и лабораторные работы, связанные с использованием потенциально инфицированного или инфицированного новым коронавирусом (COVID-19) материала, могут проводиться исключительно в лабораториях, имеющих лицензию на осуществление деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных II степени потенциальной опасности [5]. Следовательно, проведение всех работ по подготовке и постановке реакции амплификации должно соответствовать требованиям санитарных правил для микроорганизмов II группы патогенности [7, 8].

Исследование материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы, осуществляют специалисты с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшие подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) (только при работе с данными микроорганизмами) или с микроорганизмами III–IV групп патогенности, получившие дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

Для исследований в случае воздушно-капельных инфекций, как в случае с возбудителем новой коронавирусной инфекции COVID-19, в лабораторию доставляют мазки. Мазки (слизь) носоглотки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой палочке. Использовать деревянные палочки не рекомендуется. Тампон вводят легким движением по внутренней стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль внутренней стенки носа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с защелкивающейся крышкой, содержащую соответствующую транспортную среду, и аккуратно обрезают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой. При этом допускается только однократное замораживание–оттаивание исследуемого материала.

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой палочке вращательными движениями с поверхности миндалин, нёбных дужек и задней стенки ротоглотки. Использовать деревянные палочки также не рекомендуется. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой и аккуратно обрезают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Для получения достоверных результатов следует строго соблюдать условия хранения и перевозки отобранного материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от +2 до + 8°С – в течение 3 суток;
- при температуре -20°С – в течение 1 мес.;
- при температуре -70°С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание–оттаивание материала.

Весь поступающий материал направляют в рабочую зону 1 для приема, регистрации, разбора, первичной обработки и обеззараживания материала. В рабочую зону 2 материал подлежит передаче только после обеззараживания в маркированных одноразовых микроцентрифужных пробирках объемом 1,5–2,0 мл с закрытой крышкой. После окончания работы в рабочей зоне 2 пробирки передают в рабочую зону 3, где предварительно проведена работа по подготовке реакционных смесей для проведения реакции амплификации. После окончания работы в рабочей зоне 3, если для учета результатов используется метод электрофореза и/или гибридизационно-ферментативный метод детекции, пробирки переносят в рабочую зону 4-1 для проведения анализа. В случае применения для регистрации результатов реакции амплификации секвенирования работы по очистке ампликонов осуществляют в рабочей зоне 4-1 с последующим переносом пробирок в рабочую зону 4-2 для завершения анализа. Если учет реакции амплификации осуществляют с использованием ДНК-чипов, пробирки из рабочей зоны 3 для проведения анализа переносят в рабочую зону 4-2. Эти положения прописа-

ны в нормативно методических документах о правилах отбора и доставки биоматериала для проведения реакции амплификации [3].

Дальнейшие исследования проводят с разобранным, кодированным биоматериалом, пробирки с которым установлены в специальные штативы по 24 штуки в каждом. Передача разобранного материала осуществляется в контейнерах.

При проведении исследований с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот следует соблюдать следующие правила работы [3, 6–8]:

• обеспечивать поточность движения исследуемого материала, проб нуклеиновых кислот, продуктов амплификации;

• разбор материала, его предварительную обработку, хранение, перевозку и передачу на исследование в рабочую зону 1 осуществлять согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований для каждого вида возбудителя инфекций, инструкциям к наборам реагентов;

• передачу исследуемого материала в рабочую зону 1 и проб при смежном расположении помещений рабочих зон 1, 2, 3 (3а и 3б) желательно осуществлять через шлюзовые передаточные окна, а в рабочие зоны 4-1 и 4-2 – через передаточные окна;

• перенос проб из одной рабочей зоны в другую, а также их хранение в этих помещениях осуществляют в плотно закрывающихся металлических или пластиковых контейнерах с возможностью опечатывания, в штативах с их последующей обработкой регламентируемыми дезинфицирующими средствами после каждого использования;

• при исследовании материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами I–IV групп патогенности, все манипуляции в рабочих зонах 1 и 2, включая манипуляции, сопровождающиеся риском образования аэрозоля (встряхивание, центрифугирование и т.д.) при обработке материала и выделении нуклеиновых кислот, выполняют в боксах микробиологической безопасности II или III класса;

• по окончании работы все объекты, инфицированные (подозрительные на инфицирование) микроорганизмами I–IV групп патогенности, помещают на хранение в холодильное (морозильное) оборудование (бытовые и промышленные холодильники (морозильники) и шкафы, холодильные камеры) на время проведения исследований. Рабочее место и рабочие поверхности оборудования подвергают дезинфекции;

• работы в рабочих зонах 3, 4-1 и 4-2 выполняют в боксах микробиологической безопасности II класса или ПЦР-боксе. При работе с материалом, содержащим микроорганизмы III–IV групп патогенности, этапы анализа, выполняемые в рабочих зонах 4-1 и 4-2, проводят на лабораторных столах;

• каждая манипуляция после ее завершения обязательно должна сопровождаться сменой наконечников для автоматических пипеток;

• расходуемые материалы (наконечники, пробирки и т.д.), наборы реагентов должны строго соответствовать используемому оборудованию (автоматическим пипеткам, термоциклерам и т.д.);

• рекомендуется использование источников бесперебойного питания при подключении амплификационного оборудования;

• условия хранения наборов реагентов (комплектов реагентов), образцов проб должны соответствовать инструкциям по применению. Образцы проб, содержащих нуклеиновые кислоты и/или ампликоны, хранят отдельно от реагентов в разных холодильниках. Не допускается использование несертифицированных наборов, реагентов с истекшим сроком годности, хранившихся в условиях нарушения температурного режима;

• холодильное оборудование должно быть оснащено средствами ручного или автоматического температурного контроля и регистрации, свидетельствующими о реальном режиме хранения наборов реагентов и исследуемых проб.

Использование рабочей и защитной одежды при проведении различных этапов постановки реакции

При работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности выбор типа защитного костюма, рабочей одежды и средств индивидуальной защиты органов дыхания проводят в строгом соответствии с нормативными документами [6–8] в зависимости от вида возбудителя, рабочей зоны, оснащения ее боксами микробиологической безопасности. Эти же требования и положения распространяются и на проведение генетических работ и исследований, в частности на проведение реакции амплификации.

Каждая рабочая зона (помещение) обеспечивается необходимым количеством комплектов рабочей и защитной одежды: комбинезон или пижама, противочумный халат, шлем или шапочка, одноразовые резиновые перчатки (две пары), сменная обувь, очки и респиратор/полумаска 3-го класса безопасности (FFP3). При работе в помещении детекции продуктов амплификации поверх обуви надевают одноразовые бахилы или меняют тапочки на боксовую обувь. Рекомендуется использование одноразовой одежды. Использование одежды из другой зоны запрещено.

В предбоксах устанавливают промаркированные емкости с дезинфицирующим раствором, куда укладывают каждый элемент защитной одежды, каждый строго в свою емкость. Наиболее загрязненной продуктами амплификации считается защитная одежда рабочих зон 4-1 и 4-2, особенно верхние защитные перчатки, которые снимают в первую очередь.

Надевание и, особенно, снятие защитной одежды производят в предбоксах рабочих помещений после окончания всех работ, а также при проведении перерыва в работе или при переходе из одного помещения в другое, чтобы не контаминировать пути движения людей продуктами проведенных исследований. В каждом предбоксе должен быть отдельный комплект защитной одежды и обуви [6–8]. После снятия каждого элемента противочумного костюма руки в перчатках погружают в дезинфицирующий раствор, а после снятия перчаток руки протирают тампоном со спиртом, а затем моют с мылом.

Требования биологической безопасности к деконтаминации помещений и обеззараживанию материала

Деконтаминацию, или обеззараживание, помещений проводят регулярно, используя дезинфицирующие средства в

соответствии с требованиями нормативных методических документов [3, 6–8]. Ежедневно в начале рабочего дня проводят влажную уборку, по завершению работ с материалом – текущую дезинфекцию. Рабочие зоны, расположенные в помещениях лаборатории, ежедневно обеззараживают ультрафиолетовым облучением с записью в специальном журнале с указание времени проведения облучения (не менее 30 мин).

Каждая рабочая зона, расположенная в помещениях лаборатории, обеспечивается промаркированным набором уборочного инвентаря. Использование промаркированного индивидуального для каждой зоны уборочного инвентаря для уборки других помещений лаборатории не допускается.

Рабочую поверхность столов и столешниц боксов микробиологической безопасности и поверхности оборудования перед началом работы протирают 70%-м этиловым спиртом.

При использовании кондиционеров ежемесячно проводят очистку и обработку радиаторной решетки кондиционера и накопителя конденсата 0,2%-м раствором ДП-2Т с заменой фильтров. Во время проведения работ с материалом включать кондиционер не разрешается [3, 6–8]. Не менее чем один раз в год осуществляют дезинфекционную обработку автоматических дозаторов. Дозаторы разбирают, обрабатывают (замачивают) в моющем растворе для удаления жирового загрязнения, после чего остатки моющего средства удаляются ветошью, смоченной водой. Затем проводят обработку раствором 1 N соляной кислоты с экспозицией не менее 1 ч. Остатки раствора тщательно удаляют ветошью, смоченной водой, и проводят обеззараживание влажных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч. По окончании обработки дозаторы собирают и проводят калибровку в соответствии с прилагаемой инструкцией по пользованию дозаторами. Автоклавируемые дозаторы обеззараживают паром под давлением 1,7 атм. при температуре 120 ± 1°С в течение 20 мин.

Остатки биоматериала, инфицированного или подозрительного на инфицирование микроорганизмами I–IV групп патогенности или их фрагментами (ДНК, РНК), использованную посуду после дезинфекции соответствующими дезинфицирующими препаратами собирают в закрывающиеся емкости (контейнеры) и передают на автоклавирование. Слив необеззараженных жидкостей в канализационную сеть не допускается

При возникновении аварийной ситуации или подозрении на контаминирование помещений лаборатории работы по проведению реакции амплификации немедленно останавливают и проводят мероприятия по ликвидации контаминации.

При случайном открытии пробирок с продуктами амплификации (рабочая зона 3) необходимо, остановив работу, надеть перчатки (при их отсутствии), закрыть пробирки, заменить перчатки и провести мероприятия по ликвидации возможной контаминации. Следовательно, необходимо соблюдать санитарно-гигиенические требования и проводить постоянный внешний и внутренний контроль обсемененности рабочих помещений, в которых проводят работы с биоматериалом. Необходимо регулярно отбирать мазки у работающих сотрудников, их окружения, а также делать смывы с рабочих поверхностей и оборудования с последующей постановкой реакции амплификации.

Организацию комплекса мероприятий по ББ в лаборатории обеспечивает ее руководитель, а в организации – директор. Срочность выполнения работ, недостатки в материально техническом обеспечении и другие причины не могут служить основанием для снижения или отступления от требований положений ББ. Каждый сотрудник лаборатории и/или прикомандированные специалисты обязаны сообщать руководству лаборатории и организации о выявленных нарушениях ББ [7, 8].

Таким образом, проведение диагностических работ с генетическим материалом от бактерий или вирусов с использованием реакции амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР-реакции) требует определенных знаний не только в области проведения генетических исследований, но и в области ББ, а также неукоснительного исполнения требований и предписаний специалистов в этой области, понимания ответственности за правильность выполнения операций и действий.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. акад. РАМН Онищенко ГГ, академика РАМН Кутырева ВВ. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико»; 2013, 560 с.
2. Санитарно-эпидемиологические правила. «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19).» СП 3.1.3597-20. 2020.
3. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» МУ 1.3.2569-09. 2009.
4. Санитарно-эпидемиологические правила «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». СП 1.3.1318-03. 2003.
5. Постановление правительства РФ «О лицензировании деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных (за исключением случая, если указанная деятельность осуществляется в медицинских целях) и генно-инженерно-модифицированных организмов III и IV степеней потенциальной опасности, осуществляемой в замкнутых системах» от 16 апреля 2012 г. №317.
6. СанПиН «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 3.3686-21, 2021,1092 с.
7. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08. 2008. 92 с. с дополнениями 1 (СП 1.3.2518-09) и 2 (СП 1.3.2885-11).

8. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13. 2014. 195 с.
9. Руководство «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях». Р 3.5.1904-04. 2004. 25 с.
10. Информационное письмо Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) Поповой А.Ю. от 06.03.2020 №02/3739-2020-32.

References

1. Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Edited by Onishchenko GG, Kutyrev VV. 2nd ed. Moscow: "Shiko" Publ.; 2013, 560 p. (In Russian).
2. Sanitary and epidemiological rules. "Prevention of new coronavirus infection (COVID-19)." SP 3.1.3597-20. 2020. (In Russian).
3. Guidelines "Organization of work of laboratories using methods of amplification of nucleic acids when working with material containing microorganisms of pathogenicity groups I–IV" MU 1.3.2569-09. 2009. (In Russian).
4. Sanitary and epidemiological rules "The procedure for issuing a sanitary and epidemiological conclusion on the possibility of carrying out work with pathogens of human infectious diseases of groups I–IV of pathogenicity (danger), genetically engineered microorganisms, poisons of biological origin and helminths". SP 1.3.1318-03. 2003. (In Russian).
5. Decree of the Government of the Russian Federation "On licensing activities in the field of the use of pathogens of infectious diseases of humans and animals (except if the specified activity is carried out for medical purposes) and genetically engineered organisms of III and IV degrees of potential danger carried out in closed systems" dated April 16, 2012 No 317. (In Russian).
6. SanPiN "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases", 3.3686-21, 2021,1092 p. (In Russian).
7. Sanitary and epidemiological rules "Safety of work with microorganisms of the III–IV groups of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases". SP 1.3.2322-08. 2008. 92 p. with additions 1 (SP 1.3.2518-09) and 2 (SP 1.3.2885-11). (In Russian).
8. Sanitary and epidemiological rules "Safety of work with microorganisms of groups I–II of pathogenicity (danger)". SP 1.3.3118-13. 2014. 195 p. (In Russian).
9. Manual "Use of ultraviolet bactericidal radiation for disinfection of indoor air". P3.5.1904-04. 2004. 25 p. (In Russian).
10. Information letter from the Head of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) Popova A.Yu. 06.03.2020 No 02/3739-2020-32. (In Russian).

Информация об авторах:

Чекан Лариса Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Larisa V. Chekan, Senior Researcher Head of the Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Mikhail V. Khramov, MD, PhD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Систематическое длительное изучение кишечной палочки в Англии демонстрирует стабильную популяционную структуру

Escherichia coli, вызывающая инфекции мочевыводящих путей и бактериемию, интенсивно исследуется, в том числе в работах, посвященных вирулентной, глобально распространенной, мультирезистентной линии ST131. Чтобы контекстуализировать ST131 в более широкой популяции *E. coli*, связанной с заболеванием, была применена геномика для анализа систематического 11-летнего стационарного обследования *E. coli*, связанного с бактериемией, с использованием изолятов, собранных со всей Англии. Анализ динамики популяции наиболее успешных клонов выявил появление ST131 и ST69 и их становление в качестве двух из пяти наиболее распространенных клонов наряду с ST73, ST95 и ST12. Наиболее часто идентифицируемой линией была ST73. По сравнению с ST131 ST73 был чувствителен к большинству антибиотиков, что указывает на то, что множественная лекарственная устойчивость не была доминирующей причиной преобладания клонов *E. coli* в этой популяции. Временной филогенетический анализ появления ST69 и ST131 выявил различия в динамике появления и показал, что распространение ST131 в этой популяции не было обусловлено последовательным появлением все более резистентных субкладов. Мы показали, что с течением времени популяция *E. coli* только временно нарушалась введением новых клонов, прежде чем было быстро достигнуто новое равновесие. В совокупности эти результаты предполагают, что частота клонов *E. coli* при инвазивном заболевании определяется отрицательным частотно-зависимым отбором, происходящим за пределами больницы, наиболее вероятно – в комменсальной нише, и что лекарственная устойчивость не является основным фактором успеха в этом ниша.

Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, et al.
Systematic longitudinal survey of invasive Escherichia coli in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131.
Genome Res. 2017 Jul 18;27(8):1437–49. DOI: 10.1101/gr.216606.116