

Разработка и апробация метода оценки зараженности бокса ДНК-ампликонами: сравнительная эффективность ПЦР-бокса модель UVC/T-M-AR и ламинарного бокса

Авторы:

Biotechnomica: **Марина Тарвид, Юлия Исакова, Василий Банковский**

Биосан: **Артур Кигитович, Вадим Гимельфарб**



Введение

Развитие надежных и воспроизводимых (автоматизированных) методов определения ампликонов ДНК и РНК в воздухе лабораторных помещений исключительно важно не только для развития и широкого внедрения современных методов молекулярной диагностики, но и для решения вопросов, связанных с биобезопасностью (см., например, «Поведение аэрозольных частиц в волокнистых средах», Игорь Аграновский, 2008, Новосибирск, Россия, в которой рассматривается в исчерпывающем виде этот вопрос).

Ампликонами называются копируемые продукты ПЦР. Они накапливаются в рабочем пространстве не только ПЦР-бокса, но также и в помещениях, в которых осуществляется пробоподготовка образцов для анализа. В конечном счете фон ампликонов достигает критической концентрации, после которой наблюдаются ложноположительные результаты анализов и метод выходит за рамки воспроизводимости. Эта проблема становится еще более актуальной при внедрении высокоскоростных технологий изотермической

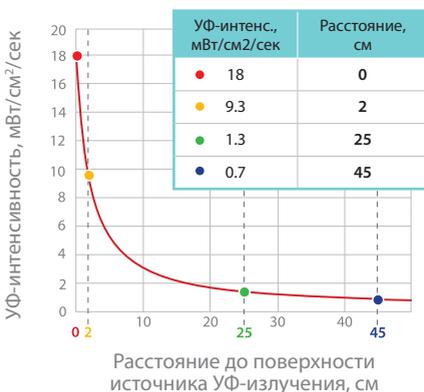
амплификации РНК (НАСБА) имеющих к тому же потенциал повышения чувствительности на 1, 3 порядка в сравнении с амплификацией методом ПЦР.

Следовательно, мониторинг концентрации ампликонов становится актуальным в современных лабораториях молекулярно-генетического контроля инфекционных заболеваний, основанных на ДНК (РНК)-диагностикумах.

UVC/T-M-AR, UV-бокс для ПЦР

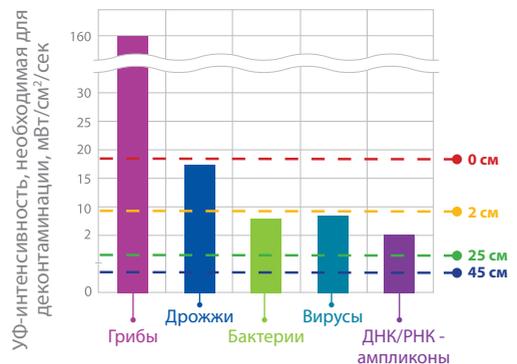


Рис. 1.1. Падение интенсивности УФ в зависимости от расстояния до источника УФ



↑ ЗА 1 СЕКУНДУ ↓

Рис. 1.2. Гермицидная эффективность УФ для микроорганизмов различных классов



Цель исследований

В задачи исследований входило: 1) разработка и апробация простого, быстрого и дешевого метода отбора образцов воздуха и мазков с рабочей поверхности ПЦР-боксов; 2) апробация метода; 3) сравнительная характеристика эффективности удаления и дезинфекции ампликонов в рабочем пространстве ПЦР-боксов различными физико-химическими методами; также 4) оценка эффективности инактивации (дезинфекции) ампликонов в рабочем пространстве ПЦР-боксов Биосан (Латвия) и боксов 2-го класса биозащиты.

В работе использовали ПЦР-бокс фирмы Биосан (Латвия), в качестве вендора ламинарный шкаф Х (производитель ЕС).

Основные принципы деконтаминации воздуха включают:

- 1) УФ-обработку воздуха;
- 2) HEPA-фильтрацию;
- 3) обработку воздуха аэроионами, обладающими окислительной активностью;
- 4) обработку гамма-лучами.

Среди коммерческих наиболее эффективными средствами деконтаминации являются:

УФ-обработка воздуха и рабочей поверхности

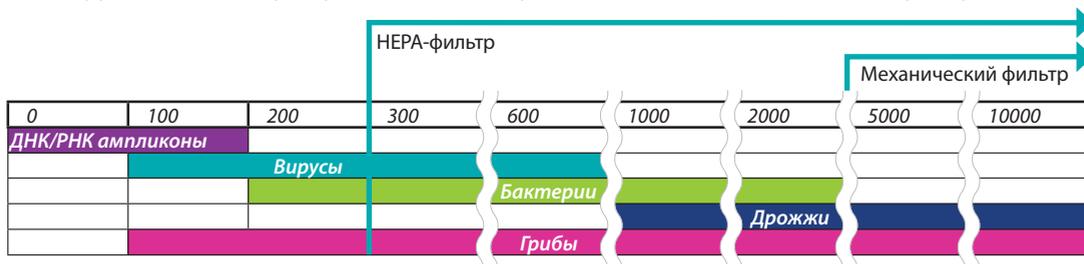
Наиболее широко распространенные на сегодня УФ-лампы низкого давления (производства Philips) относятся к классу «долгоживущих» и имеют очень узкий спектр эмиссии в области поглощения ДНК и РНК (253,7 нм).

Плотность УФ-потока, измеренная нами, падает от расстояния в квадратичной прогрессии и снижается в 10 раз при увеличении расстояния до источника с 2 см (20 мВт/см²) до 50 см (2 мВт/см²); и ничтожно мала при удалении на расстояние 3 метров. На Рис. 1.1 представлены фактические данные зависимости интенсивности УФ-потока от расстояния. Что, которые, например, объясняют низкую эффективность УФ-обработки при расстоянии до объекта более 50 см (см. Рис. 1.2 дезинфицирующая эффективность УФ – относительно вирусов, бактерий, дрожжевых микроорганизмов, а также грибов).

Организация потока воздуха через HEPA-фильтры

Для большинства микроорганизмов этот метод наиболее эффективен и позволяет удалить до 99,97% частиц размером больше 0,3 мкм. HEPA-фильтры высокой плотности могут удалить и некоторые вирусы за счет эффекта «ловушки», возникающего для частиц размером меньше 0,3 мкм [6]. Данные, представленные на Рис. 2, свидетельствуют о том, что HEPA-фильтры могут быть неэффективны относительно мелких вирусов и тем более макромолекул, каковыми являются молекулы белков, ДНК и РНК, а также нуклеопротеидных комплексов, каковыми являются большинство вирусных частиц.

Рис. 2. Эффективность HEPA фильтрации относительно различных биологических объектов и их размеров, нм



Размеры биологических агентов, нм

Постановка эксперимента

- Схема отбора образцов воздуха и мазков бокса представлена на Рис. 3
- Методика экстракции ДНК описана в разделе «**Образцы: воздуха/с внутренней поверхности бокса**»
- Количественная ПЦР в режиме реального времени
- Концентрацию ДНК-ампликонов в боксе определяли с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени. Каждый эксперимент включал отрицательный контроль, а также стандарты калибровочных концентраций ампликонов
- Для построения калибровочной кривой использовали 4 стандарта известной концентрации ДНК-фага лямбда: десятичное разбавление со стартовой концентрацией 0,6 нг/мкл (что соответствует 1 000 000 копий фага лямбда в 1 мкл)

- Результаты экспериментов считали достоверными, если получены правильные результаты для отрицательного контроля амплификации

Приготовление реакционной смеси

ПЦР-смесь: 7 мкл
 Нуклеотидтрифосфаты (dNTP's): 2,5 мкл
 Прямой и обратный праймеры: 1 мкл каждый
 ДНК-проба (ДНК-маячок): 1 мкл
 Образец воздуха или мазка с поверхности: 10 мкл
 Н₂О до конечного объема: 25 мкл

Табл. 1. Протокол амплификации

Протокол термоциклирования	Температура	Время	Циклы
Предварительная денатурация	95	5 мин.	1
Денатурация	95	5 сек.	42
Отжиг	60	20 сек.	
Элонгация	72	15 сек.	

Образцы: воздуха/с внутренней поверхности бокса

Экстракция ДНК:

Образцы воздуха:

- Образцы воздуха объемом 20 мл отбирали **1** одноразовым шприцем, содержащим 2 мл сорбирующего раствора. Затем инкубировали на горизонтальном орбитальном **2** шейкере OS-20 (180 об/мин в течение 15 мин.) для создания водного аэрозоля содержащего пробы ДНК.
- Затем пробы переносили в **3** колонки минипреп (GeneJet Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Fermentas) таким образом, чтобы весь воздух был прокачан через адсорбирующий раствор. Адсорбированную на колонке ДНК ресорбировали соответствующим буфером согласно прилагаемой инструкции.



Образцы ДНК с рабочей поверхности бокса:

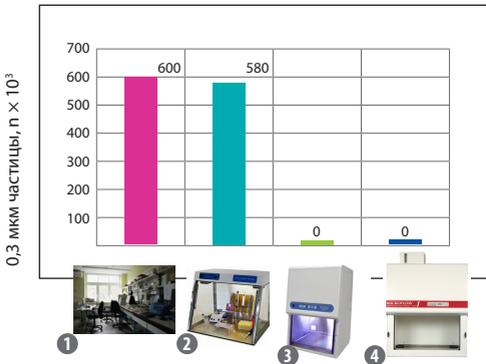
- Образцы отбирали с помощью смоченных в буфере **4** ватных тампонов.
- Тампоны помещали в пробирки, содержащие 0,5 мл воды, перемешивали в **5** центрифуге-вортке в течение 2–3 сек., а затем **6** центрифугировали в течение 2 мин. при 13300 об/мин.



Механическое загрязнение

На Рис. 5 представлены сравнительные данные механических примесей в воздухе ламинарного бокса 2-класса защиты (Microflow, Англия) и УФ-бокса для работы с ДНК-пробами UVC/T-M-AR (Биосан, Латвия). В качестве положительного контроля отбирали воздух из лабораторного помещения.

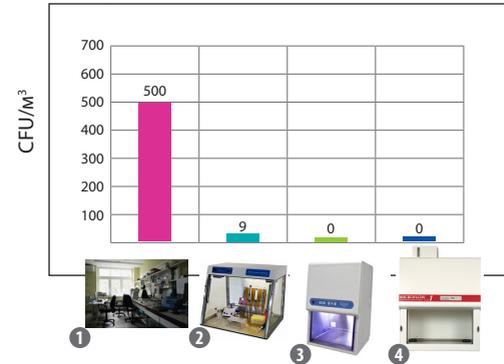
Рис. 5. Механические загрязнения частицами размером 0,3 мкм и более



Микробное загрязнение

Микробные загрязнения воздуха лабораторного помещения и боксов различной степени защиты представлены на Рис. 6. Количественные данные микробной обсемененности лабораторного воздуха, а также УФ-боксов для работы с ДНК и ламинарных боксов 2-го класса защиты (см. разъяснение к Рис. 5). В качестве положительного контроля брали пробу воздуха лабораторного помещения.

Рис. 6. Микробная обсемененность



- 1 Положительный контроль (воздух лаборатории)
- 2 УФ-бокс UVC/T-M-AR (Биосан, Латвия)
- 3 Ламинарный бокс 2-го класса защиты (Биосан, Латвия)
- 4 Ламинарный бокс 2-го класса защиты (Microflow, Англия)

Эффективность деkontаминации ампликонов, находящихся в рабочем пространстве УФ-бокса UVC/T-M-AR (Биосан, Латвия):

Определение концентрации копируемой ДНК в пробах (подписи к рисункам 7, 8, 9):

1. Образцы, экстрагированные из воздуха и мазков, подвергали амплификации. На Рис. 7 представлены данные влияния времени обработки бокса прямым УФ-облучением (инактивация как рабочей поверхности, так и воздуха ПЦР-бокса), а также с помощью встроенного в бокс УФ-рециркулятора (УФ-обработка лишь воздуха бокса за счет активной рециркуляции).
2. На Рис. 8 представлены обработанные результаты амплификации в осях Ct от логарифма концентрации ампликонов.
3. На Рис. 9 представлены сравнительные данные концентрации копируемых ампликонов (выраженной в %) как в воздухе, так и на рабочей поверхности бокса.

Анализ результатов:

В результате УФ обработки ДНК ее концентрация в воздухе не падает, а лишь снижается индекс копируемости ДНК (соотношение копируемой ДНК к общей концентрации ДНК в пробе). ПЦР в режиме реального времени позволяет определить концентрацию копируемого фрагмента ДНК в пробе, и, основываясь на кривой зависимости Ct (Cq) от концентрации маркера, можно оценить концентрацию копируемых маркерных молекул ДНК. На основе анализа влияния различных методов дезактивации на индекс копируемости, можно судить об эффективности этих методов.

Концентрацию ампликонов определяли с помощью кривой зависимости Ct (Cq) от концентрации 4 стандартных разбавлений фага лямбда (см. Рис. 8). На Рис. 9 представлены обработанные

данные концентрации копируемого маркера ДНК, приведенного к рабочему объему ПЦР-бокса (концентрация активной ДНК представлена в единицах — количество копий ДНК-маркера на объем бокса, а также количество копий ДНК-маркера на общую площадь внутренней поверхности бокса).

Эффективность инактивации рассчитывали как отношение копий ДНК-ампликонов до и после УФ-обработки. Влияние различной обработки (УФ-рециркулятора, а также прямого облучения УФ-лампой) на эффективность инактивации распыленного ДНК-маркера представлено в процентном соотношении и показано в Табл. 2.

Рис. 7. Влияние УФ-обработки на значение Ct (Cq) (необработанные результаты)

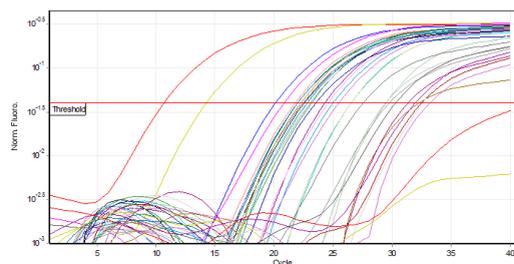
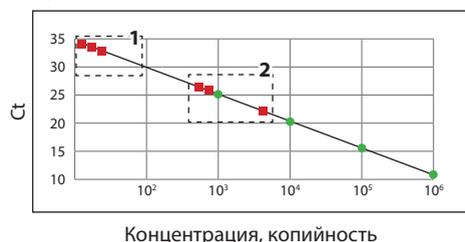


Рис. 8. Калибровочная кривая, данные влияния прямой и не прямой УФ-обработки на копиюность ДНК-фага лямбда



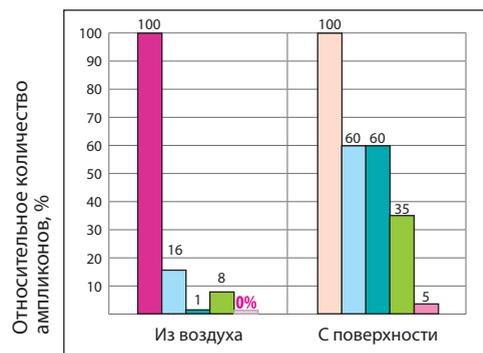
1 Образцы после распыления ДНК-фага лямбда, до УФ-обработки (положительный контроль)

2 Пробы после 30-минутной УФ-обработки

● Титры ДНК-лямбда

■ Пробы

Рис. 9. влияние прямой (открытая УФ-лампа в ПЦР боксе) и не прямой (УФ-рециркулятор ПЦР бокса) УФ-обработки на концентрацию копируемых ампликонов на примере ПЦР-бокса UVC/T-M-AR (Биосан, Латвия)



- После распыления ДНК-фага лямбда
- Обработка воздуха бокса в течение 15 минут с помощью УФ-рециркулятора (непрямая УФ-обработка, УФ-лампа 25 Вт)
- Обработка воздуха бокса в течение 30 минут с помощью УФ-рециркулятора (Непрямая УФ-обработка, УФ-лампа 25 Вт)
- Обработка воздуха и рабочей поверхности открытой УФ-лампой в течение 15 минут (прямая УФ обработка, УФ лампа 25 Вт)
- Обработка воздуха и рабочей поверхности открытой УФ лампой в течение 30 минут (прямая УФ-обработка, УФ-лампа 25 Вт)

На горизонтальной оси показаны: образцы воздуха и образцы с поверхности бокса в соответствии с относительной величиной копируемой ДНК (показаны на вертикальной оси). Данные, представленные на Рис. 9, являются результатом анализа 4 независимых серий экспериментов о влиянии времени облучения и способа обработки УФ рабочего объема ПЦР-бокса.

Табл. 2. Эффективность инактивации ДНК-ампликонов в ПЦР-боксе UVC/T-M-AR, (Биосан, Латвия)

Образцы	Метод инактивации			
	УФ-рец. (15 мин.)	УФ-рец. (30 мин.)	Откр. УФ (15 мин.)	Откр. УФ (30 мин.)
Из воздуха	84%	99%	92%	100%
С поверхности	40%	40%	65%	95%

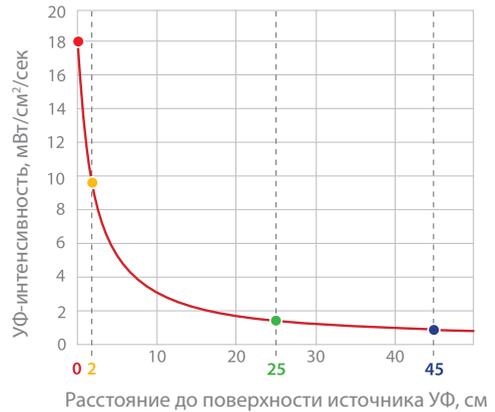
Расчет дозы УФ-обработки

Поскольку ПЦР-боксы фирмы Биосан обеспечены комбинированным способом обработки рабочего пространства бокса, включающим: 1) прямое УФ-облучение и 2) облучение с помощью рециркулятора, рассмотрим расчеты интенсивности и дозы облучения для каждого из них.

Прямое УФ-облучение

Интенсивность излучения УФ-лампы (мощность 25 Вт, длина волны излучения 253,7 нм) зависит от расстояния, и в нашем случае измеренное значение падает от 18 мВт/см²/сек до 0.7 мВт/см²/сек при увеличении расстояния от источника с 0 см до 45 см [2]. В частном случае рабочий объем ПЦР-бокса имеет градиент падения интенсивности УФ-облучения фактически в том же диапазоне (Рис. 10).

Рис. 10. Зависимость интенсивности УФ-облучения от расстояния до УФ-излучения (фильтр 253,7 нм; Radiometer VLX 254, Vilber Lourmat, Франция)



УФ-интенс., мВт/см ² /сек	Расстояние, см
● 18	0
● 9.3	2
● 1.3	25
● 0.7	45

Табл. 3. Средняя доза облучения для поверхностей бокса

Внутренние поверхности	УФ-доза за 15 мин.	УФ-доза за 30 мин.
Рабочая поверхность (40–50 см)	570–680 мВт/см ²	1140–1360 мВт/см ²
Боковые стенки (10–50 см)	570–2500 мВт/см ²	1140–5000 мВт/см ²
Передняя панель (10–50 см)	570–2500 мВт/см ²	1140–5000 мВт/см ²

УФ-доза в процессе обработки = УФ-интенсивность × время облучения

Интенсивность излучения (мВт/сек/см²) × время облучения (сек.)

УФ-доза за 15 минут облучения: градиент 570–15 700 мВт/см²

УФ-доза за 30 минут облучения: градиент 1140–31 400 мВт/см²

УФ-Рециркуляция воздуха

Обработка потока воздуха

ПЦР-бокса:

ПЦР-бокс фирмы Биосан отличается от аналогичных продуктов конкурентов наличием УФ рециркулятора, встроенного в верхнюю часть рабочего пространства бокса, что обеспечивает постоянную дезактивацию воздуха во время его эксплуатации. Рециркулятор состоит из двух вентиляторов, противопылевого фильтра и закрытой УФ-лампы мощностью 25 Вт, вмонтированных в закрытый алюминиевый корпус. Скорость потока воздуха через рециркулятор составляет 14 м³/час, что обеспечивает воздухообмен, равный 1,3 рабочего объема бокса за минуту. Максимальное расстояние между УФ-источником и стенкой рециркулятора составляет меньше, чем 2 см, на этом расстоянии интенсивность УФ-излучения достигает от 9.3 до 18 мВт/сек/см² (Рис. 10).

УФ-рециркулятор разработан для постоянной проточной деконтаминации воздуха, и, следовательно, весь объем воздуха подвергается максимально равномерной обработке.

Зависимость окончательной дозы облучения, полученного на общий объем воздуха бокса:

- В течение 15 минут: 180 мВт/см²
- В течение 30 минут: 360 мВт/см²

Обработка рабочей поверхности бокса:

УФ-рециркулятор воздуха не обеспечивает дезактивацию рабочей поверхности бокса в силу закрытости источника УФ. Поэтому для ее дезактивации необходим открытый источник УФ.

Выводы

Нами разработан простой метод отбора образцов воздуха, который в сочетании с последующей экстракцией и количественным ПЦР-анализом позволяет выявить концентрацию ампликонов в рабочем пространстве ПЦР, что может оказаться полезным для мониторинга лабораторных помещений, а также ПЦР-боксов на предмет наличия ДНК-ампликонов.

Исследования имели целью сравнение эффективности ПЦР-бокса фирмы Биосан с традиционным ламинарным боксом 2-го класса защиты, обеспеченным эффективными антимикробными HEPA-фильтрами. На основании результатов данного исследования ПЦР-боксы фирмы Биосан гарантируют 99% эффективность, в то время как ламинарные боксы Class II BioSafety фактически не обеспечивают антиампликонной защиты рабочего пространства и поверхности бокса.

Эффективность дезактивации ампликонов в воздухе ПЦР бокса после 30 минутной обработки составляет:

- Комбинированная УФ-обработка (открытый УФ и УФ-рециркулятор) обеспечивает эффективность 100%
- УФ-рециркулятор обеспечивает эффективность до 99%
- Открытый УФ-обеспечивает эффективность до 100%

В рамках классификации европейского стандарта для боксов микробиологической безопасности EN 12469 [3] и полученных экспериментальных данных был сделан сравнительный анализ (см. Табл. 4) защищенности продукта ПЦР (реакционной смеси) от влияния окружающей среды (ампликоны в боксе и лабораторном помещении) между ПЦР-боксами фирмы Биосан и боксами I, II, III класса биобезопасности.

Табл. 4. Классификация стерильных боксов на основе защиты продукта от возможной контаминации

Классы биозащиты	Тип контаминации		
	Микроорганизмы	Вирусы	ДНК/РНК-ампликоны
Класс I	+	+	-
Класс II (A1, A2, B1, B2)	+	-	-
Класс III	+	-	-
ПЦР-боксы фирмы Биосан	+/-	+	+

Планируемые исследования:

- Развитие высокоскоростной технологии мониторинга РНК-ампликонов как в воздушном пространстве лаборатории, так и стерильных кабинетах.
- Исследования эффективности удаления ДНК-ампликонов в боксах 2-го класса защиты.

Основываясь на предварительных данных, можно сделать вывод о том, что частицы аэрозоля содержащие ДНК-ампликоны, не задерживаются HEPA-фильтрами (см. Рис. 2) и могут вызывать постоянное загрязнение ампликонами бокса, а следовательно и материала, находящегося в нем.

Благодарности

Мы выражаем благодарность Биосан за финансовую и техническую поддержку, А. Дуделе за предварительные исследования в области антимикробной эффективности ПЦР-боксов фирмы Биосан.

Мы выражаем также благодарность М. Маркелову, Г. Покровскому, В. Дедкову, а также Герману Александровичу Шипулину (ЦНИИ эпидемиологии и фирма «ИЛС», Москва) за разработку и обеспечение реаген-

тами количественного анализа лямбда ДНК методом ПЦР реал-тайм.

И наконец, выражаем благодарность П. Перганту и Э. Хьюсон (Grant Instruments, Кембридж) за помощь при подготовке статьи, а также за экспертную оценку данной работы.

Источники

1. K Linden, A Mofidi. 2004. Disinfection Efficiency and Dose Measurement of Polychromatic UV Light (1-6).
2. Биосан UV-air flow Cleaner-Recirculators test report (<http://www.Биосан.lv/eng/uploads/images/uvrm%20uvrmi%20article%20eng.pdf>).
3. European Committee for Standardization (2000) European standard EN 12469: Biotechnology-Performance criteria for microbiological safety cabinets.
4. Интернет-источник: <http://nobelprize.org>
5. Интернет-источник: <http://www.aircleaners.com/hepahistory.phtml>
6. Интернет источник: http://www.filt-air.com/Resources/Articles/hepa/hepa_filters.aspx#Characteristics

Табл. 5. Взаимосвязь групп риска и уровней биобезопасности, практики и оборудования

ГРУППА РИСКА	УРОВЕНЬ БИОБЕЗОПАСНОСТИ	ТИП ЛАБОРАТОРИИ	РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ	БЕЗОПАСНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ
1	Базовый уровень биологической безопасности 1	Базовые учебные, исследовательские лаборатории	НТМ	Нет. Работа на открытых столах
2	Базовый уровень биологической безопасности 2	Службы здравоохранения первичного уровня, диагностические и исследовательские лаборатории	НТМ и защитная одежда, обозначение биологической опасности	Работа на открытых столах и в БББ для предохранения от потенциальных аэрозолей
3	Изолированный уровень биологической безопасности 3	Специальные диагностические и исследовательские лаборатории	Аналогично 2-му уровню плюс специальная одежда, ограниченный допуск, управляемая вентиляция	БББ и/или иная первичная изоляция для всех видов работ
4	Максимально изолированный уровень биологической безопасности 4	Лаборатории для работы с опасными патогенными агентами	Аналогично 3-му уровню плюс входные боксы, душевые на выходе, специальные стоки	БББ класса III или костюмы с притоком воздуха в сочетании с БББ класса II, автоклавы с двумя крышками (вмонтированные в стены), воздушные фильтры

БББ — боксы биологической безопасности; НТМ — надлежащая техника микробиологических исследований

Табл. 6. Сводная таблица требований к биологической безопасности

	УРОВЕНЬ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ			
	1	2	3	4
Изоляция ^a лаборатории	Нет	Нет	Да	Да
Герметичные камеры для обеззараживания	Нет	Нет	Да	Да
Вентиляция:				
— приточная	Нет	Желательно	Да	Да
— контролируемая	Нет	Желательно	Да	Да
— с HEPA-фильтрами на выходе	Нет	Нет	Да/Нет ^b	Да
Вход в виде бокса	Нет	Нет	Да	Да
Воздушный бокс	Нет	Нет	Нет	Да
Воздушный бокс с душем	Нет	Нет	Нет	Да
Тамбур	Нет	Нет	Да	—
Тамбур с душем	Нет	Нет	Да/Нет ^c	Нет
Обработка сточных вод	Нет	Нет	Да/Нет ^c	Да
Автоклав:				
— на месте работы	Нет	Желательно	Да	Да
— в помещении лаборатории	Нет	Нет	Желательно	Да
— автоклав с двумя крышками	Нет	Нет	Желательно	Да
Боксы биологической безопасности	Нет	Желательно	Да	Да
Индивидуальные средства контроля безопасности ^d	Нет	Нет	Желательно	Да

^a — Изоляция от внешней среды и функциональная изоляция от основных потоков передвижения.

^b — В зависимости от расположения выхода (см. главу 4 «ПРАКТИЧЕСКОГО РУКОВОДСТВА ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ»).

^c — В зависимости от используемого в лаборатории патогенного агента.

^d — Например, окна, системы телевизионного наблюдения, двусторонняя связь.