

ДЕВИАЦИИ ЧАСТОТЫ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опыт ПЦР-исследований в 1990-х годах был омрачен обилием ложноположительных результатов, что явилось существенным ограничением широкого распространения этого метода в клинической практике [57, 66, 148, 157, 231].

По прошествии 20 лет ситуация значительно изменилась. В частности, теперь при курации пациентов с вирусными гепатитами результаты ПЦР-исследований используются для верификации диагноза, уточнения фазы течения заболевания, они же являются основой суждения об эффективности лечения и излеченности [17, 18].

Однако этот технологический прорыв не стоит рассматривать как проявление наступившей безупречности молекулярно-биологических методов исследования. Уровень специфичности ПЦР на примере детекции HCV до сих пор оценивается в 96–99% [17, 48, 129], то есть при тестировании образцов крови, собранных от 100 пациентов без HCV-инфекции, в одной-четырех пробах будет выявлена РНК HCV. И речь идет о современных лабораториях. Именно поэтому МАНК, и в частности ПЦР, — это, конечно, высокоспецифичные методы, но на них не следует безоговорочно полагаться, тем более когда положительные результаты не согласуются с другими данными [15, 209].

Любой, даже самый технически защищенный вариант ПЦР нельзя воспринимать как страховку от ложноположительных результатов [57]. И хотя частота последних в современной практике значительно снизилась, данная проблематика все же имеет место [74, 82].

2.1. СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ЧАСТОТЫ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1.1. Специфичность и причины того, почему она бывает меньше 100%¹

Традиционно явление ложноположительных результатов определено понятием **специфичность**, которая выражается следующей формулой [21, 76]:

$$\frac{\text{Истинно отрицательные результаты}}{(\text{Ложноположительные} + \text{истинно отрицательные результаты})} \times 100\%. \quad (1)$$

¹ Продолжение см. в подразделе 3.3.4.1.

Представленная формула характеризует **вероятность отрицательного результата при отсутствии болезни**, то есть при 100% специфичности тест не относит здоровых людей к категории больных и ложноположительные результаты при этом отсутствуют [21].

Однако специфичность не является столь однозначной характеристикой: в зависимости от причин ложноположительных результатов принято выделять «**аналитическую**» и «**диагностическую**» **специфичность**, что особенно актуально для тест-систем, использующих в своей основе ПЦР [187]. Под 100% аналитической специфичностью понимается отсутствие амплификации на матрице нуклеиновых кислот других микроорганизмов и человека [187]. Под 100% диагностической специфичностью подразумевается неспособность тест-системы выявлять аналит у здорового человека [21, 187]. И если аналитическая специфичность определена последовательностью праймеров и зондов [67, 70, 187], то диагностическая специфичность — совокупностью всех причин, действующих в условиях реальной практики, среди которых наиболее значимой является контаминация [121, 155, 163].

Аналитическая специфичность является обязательным параметром валидации тест-системы и должна составлять не менее 100% [67, 70]. Однако следует понимать и то, как происходит выбор последовательности праймеров и зондов при разработке тест-систем. Первоначально работа выполняется *in silico* с использованием электронных баз данных для исключения перекрестных реакций с целевыми НК других микроорганизмов [67, 115]. В дальнейшем выбранные последовательности проходят тестирование *in vitro* с использованием ограниченного числа возбудителей инфекционных заболеваний [67, 70], что, однако, не позволяет в полной мере исключить перекрестные реакции [63, 209, 217]. Таким образом, методы определения аналитической специфичности тест-системы несовершенны, а перекрестные реакции могут стать одной из причин ложноположительных результатов [209, 217], но это явление в общем не столь распространенное и варьирует в зависимости от аналита. Так, в литературе удастся встретить информацию о перекрестных реакциях при определении НК *Neisseria gonorrhoeae* [209, 217], в то время как для HCV подобных сообщений не встречается. Это обусловлено существованием комменсальных диплококков из рода *Neisseria*, обменивающихся генетическими элементами с *Neisseria gonorrhoeae*, что может приводить к появлению популяций *Neisseria*, имеющих генетическую гомологию, критичную в рамках использования конкретной тест-системы [209]. Подобная ситуация, кажется, исключена для HCV в отношении современных коммерческих тест-систем.

Однако ряд авторов предусматривают, что снижение специфичности может наблюдаться в связи биовариацией патогена [104]. И некоторые тест-системы со временем использования могут терять свою специфичность.

Эксперименты по определению аналитической специфичности как понятия об отсутствии перекрестных реакций, порой осложняются контаминацией целевыми НК. В частности, это актуально для фунгальной НК, когда данные микроорганизмы, имея высокое распространение в окружающей среде, могут попадать в воду и реагенты [71]. И поэтому, получая положительный результат в отрицательной пробе (заведомо содержащей другие родственные микроорганизмы), трудно понять, является это следствием перекрестной реакции или же обусловлено контаминацией целевой НК.

Теперь же оставим аналитическую специфичность и приступим к обсуждению диагностической специфичности. **Диагностическая специфичность** — это более широкое понятие и обратно пропорционально отражает частоту ложноположительных результатов при реальном использовании тест-системы. Диагностическая специфичность зависит от аналитической специфичности. Однако, помимо этого, существуют другие причины ее снижения.

Так, например, ложноположительные результаты могут возникать вследствие перепутывания проб. Другой причиной ложноположительных результатов в ряде случаев становится использование интеркалирующих красителей. Их особенность заключается в том, что они не проявляют избирательности и связываются с любой ДНК. В данной ситуации накопление неспецифических продуктов амплификации может повлечь за собой заблуждение об истинном статусе пробы [2]. И речь идет не только об ампликонах в классическом их представлении, когда необходима специфическая мишень (матрица), как в случае с перекрестной реакцией. При образовании **димеров праймеров** могут тоже синтезироваться короткие ампликоны [40], то есть, по существу, регистрация накопления продуктов амплификации возникает даже без участия целевой НК. В последнем случае типичная положительная S-образная флуоресцентная кривая регистрируется на поздних циклах амплификации, а потому некоторые авторы не рекомендуют учитывать такие кривые как положительные [73], что совершенно неприемлемо. Это препятствует расследованию контаминации. В связи с этим, я убежден, что **использование интеркалирующих красителей в практическом здравоохранении следует ограничить.**

Гораздо чаще ложноположительные результаты являются следствием контаминации [65]. И, как было указано выше, отображением ее

«уровня» может служить диагностическая специфичность. Однако, в отличие от аналитической специфичности, она не является обязательной при валидации тест-системы, поскольку подверженность контаминации не рассматривается как технический параметр тест-системы и вся ответственность перекладывается на качество работы персонала лаборатории [70]. Отчасти это, конечно, так, но некоторые авторы считают, что **тест-система должна быть в определенной степени «устойчива» к контаминации и эта устойчивость должна быть тщательно изучена в ходе межлабораторных испытаний** [67].

Отечественные стандарты также предполагают испытание тест-систем на резистентность к контаминации. В отличие от ГОСТ Р 51352-99 [4], пришедший ему на смену ГОСТ Р 51352-2013 [3] включает описание порядка проведения этого тестирования (п. 5.2.10.3): «Для исследования возможной кросс-контаминации в ходе изучения устойчивости необходимо провести, по крайней мере, пять циклов анализа с попеременно меняющимися высокотитражными и отрицательными образцами. Высокотитражные образцы должны включать пробы со встречающимися в естественных условиях высокими титрами вируса».

Таким образом, тест-системы все-таки должны быть испытаны на предмет устойчивости к контаминации, и предлагается делать это двумя способами: в референтной лаборатории [3] или при межлабораторных испытаниях [67]. Однако пока мне следует лишь обратить внимание на отсутствие тест-систем, где в инструкции, помимо аналитической специфичности, была бы указана диагностическая специфичность, отражающая «уровень» ожидаемой контаминации или «уровень» защищенности от нее.

И все же, если выбирать способ определения диагностической специфичности, следует остановиться в первую очередь на межлабораторных сравнительных испытаниях. Это связано прежде всего с тем, что тестирование в рамках одной лаборатории, пусть даже референтной, может не дать объективной информации о резистентности коммерческой тест-системы к контаминации. Так, при средней частоте ложноположительных результатов¹ в 2% (период с 1990 по 2002 г.), в некоторых лабораториях она составляла от 9 до 57% [65]. По другим данным, уровень ложноположительных результатов колеблется от 0,1% до десятков процентов в зависимости от лаборатории, выполняющей тестирование [226]. Конечно, речь идет о методиках устаревших, предусматривающих манипуляции с продуктами амплификации (ампликонами). И все же

¹ Под частотой и вероятностью ложноположительных результатов следует понимать частоту положительных результатов при исследовании проб, не содержащих целевую нуклеиновую кислоту, то есть в отрицательном контрольном материале.

наблюдаемая вариация ложноположительных результатов от лаборатории к лаборатории подчеркивает не только важность межлабораторных испытаний тест-системы на предмет определения диагностической специфичности, но и вообще условность какого-либо конкретного значения диагностической специфичности для тест-системы, поскольку она может колебаться в достаточно широком диапазоне.

Принимая во внимание, что **вариация частоты ложноположительных результатов зависит от лаборатории**, выполняющей исследования, вполне справедливо выглядит следующее утверждение: в «плохих» показателях диагностической специфичности, выявленных при межлабораторных испытаниях, виноват не производитель, а сотрудники лаборатории, неадекватно выполняющие свою работу. Таким образом, лаборатории могут создавать негативную репутацию производителю тест-системы и, по сути, препятствовать коммерциализации действительно качественных тестов.

И это в определенной степени справедливо, поскольку роль человеческого фактора в реализации контаминации не вызывает сомнения [226]. По этой причине диагностическая специфичность и впрямь не может быть однозначным показателем некачественной работы тест-системы. Однако некоторые технические особенности как самой тест-системы, так и способа ее использования могут значительно снизить влияние человеческого фактора и, следовательно, уменьшить вероятность допущения ложноположительных результатов. **Создаются тест-системы, имеющие резистентность к контаминации** [234]. Вполне справедливо выглядит и то, что эти технические особенности должны вменяться как преимущество данной тест-системы. По этой причине диагностическая специфичность может служить отличным подспорьем в решении вопроса, какая из тест-систем наиболее надежна, резистентна к явлению контаминации. Казалось бы, нет ничего проще, чем применять именно такие тест-системы. Однако высокая себестоимость выполнения этих тестов является для многих лабораторий непреодолимым препятствием на пути к их использованию [41].

Тем самым **диагностическая специфичность** является важным показателем технических (аналитических) аспектов тест-системы, но в то же время, **в отличие от аналитической специфичности, не может быть фактором, ограничивающим использование этой тест-системы в практике здравоохранения.**

Но даже с учетом этих оговорок определение диагностической специфичности и ее вариации не является столь простым, как кажется на первый взгляд. В качестве примера достаточно лишь указать, что ложноположительные результаты могут регистрироваться не сразу,

а лишь спустя некоторое время работы с тест-системой [121, 163] и риск их может зависеть от количества анализируемых образцов [53]. Именно поэтому лаборатория при, казалось бы, хороших показателях диагностической специфичности может неожиданно для себя столкнуться с ложноположительными результатами, с эффектом их отсрочки по времени возникновения.

Таким образом, диагностическая специфичность имеет крайне неоднозначную репутацию. С одной стороны, она должна быть определена в ходе испытаний тест-системы в рамках государственного регулирования [3], с другой — методы ее определения несовершенны и едва ли могут рассматриваться как заслуживающие доверия. Именно поэтому я не являюсь сторонником экспериментального определения диагностической специфичности при валидации тест-системы даже в условиях межлабораторных испытаний, а предлагаю валидировать тест-систему относительно диагностической специфичности *in silico*. Ведь технологические приемы, обуславливающие резистентность тест-системы к контаминации, являются типичными. Так, например, очевидно, что тест-система, предполагающая автоматизированное исполнение и включающая UNG-протокол, более резистентна к контаминации, чем такая же тест-система без этих особенностей. По этой причине я склонен рассматривать введение некой «балльной» системы в зависимости от технических характеристик тест-системы для оценки диагностической специфичности в качестве более «справедливой» альтернативы экспериментальному определению ее уровня.

2.1.2. Уровень контаминации

И хотя диагностическая специфичность зависит от многих причин, **в реальной практике использования коммерческих тест-систем основная доля ложноположительных результатов все же обусловлена контаминацией.** Именно поэтому некоторые авторы, характеризуя конкретный ПЦР-метод, не употребляют понятие «диагностическая специфичность», а попросту напрямую говорят о том или ином уровне контаминации [104, 226]. При этом его выражают самыми различными способами [104, 226]: процент постановок, в которых выявлен хотя бы один ложноположительный результат; доля ложноположительных результатов среди отрицательного контрольного материала; доля ложноположительных результатов среди клинических биологических образцов, не содержащих целевую нуклеиновую кислоту (цНК)¹.

¹ цНК (целевая нуклеиновая кислота) — это ДНК или РНК, которые содержат участок, способный выступать в качестве матрицы в последующей реакции амплификации.

2.1.3. Предсказательная ценность положительного результата

С клинической точки зрения важно знать не только то, что тест-система надежно детектирует конкретный микроорганизм с минимальным количеством ложноположительных результатов, что и определяется рамками понятия «специфичность». Врачу необходимо иметь представление и о том, насколько выявленный микроорганизм способен выступать в качестве этиологии в данном конкретном клиническом случае при положительном результате теста. В качестве примера можно привести пневмоцистную пневмонию. Это заболевание оппортунистическое, возникает у пациентов с иммуносупрессией и обусловлено *Pneumocystis jirovecii* [202]. Данный микроорганизм не вызывает болезни у людей без иммунологической патологии, хотя и может присутствовать в их организме [202]. Таким образом, положительный результат теста у пациента с клиническим диагнозом пневмонии не позволяет подтвердить, что ее этиология обусловлена *Pneumocystis jirovecii* [202].

Отличить пневмоцистную колонизацию от пневмоцистной пневмонии в этом случае возможно лишь при высококопийном (более 10^3 копий) результате, в то время как низкокопийные образцы не имеют диагностической ценности и этиология пневмонии, скорее всего, другая [101]. Для описания данной ситуации лучше всего использовать величину предсказательной ценности положительного результата (ПЦПР), которая отражает **вероятность наличия заболевания при положительном результате теста** [21]. При этом в случае пневмоцистной пневмонии ПЦПР будет значительно выше при результате теста, равном 10^4 копий, чем при 10^2 копий целевой НК *Pneumocystis jirovecii*.

2.2. КОНТАМИНАЦИЯ КАК ГЛАВНАЯ ПРИЧИНА ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ: КЛАССИФИКАЦИЯ, МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ И ПРОФИЛАКТИКА

В буквальном смысле слова «контаминация» означает смешение, вплетение (от лат. *contaminatio*) и в медицине прежде всего ассоциируется с «загрязнением» чего-либо инфекционным агентом [81]. Однако в случае ПЦР речь идет о загрязнении цНК, которую также называют контаминантой, а загрязненные ею поверхности, оборудование, реактивы, биологические образцы и все прочее — контаминированными [65]. Это имеет принципиальное значение, поскольку контаминанта

в данном случае может находиться как в составе микроорганизма, так и вне его, сохраняя при этом опасность. И все меры по деконтаминации будут направлены в первую очередь на дезактивацию нуклеиновых кислот. Таким образом, **дезинфекция не может быть приравнена к деконтаминации, хотя, как правило, сопутствует ей, снижая общий уровень контаминанты.** Однако есть случаи, когда дезинфекция, наоборот, лишь способствует распространению цНК, что особенно актуально в отношении продуктов амплификации.

Интересно, что иногда контаминация воспринимается не как «загрязнение» чего-либо контаминантой, а как одно из его проявлений — ложноположительный результат [155]. Другими словами, если есть ложноположительный результат — есть контаминация, и наоборот, если нет ложноположительных результатов — нет и контаминации. Действительно, **выявление ложноположительных результатов в практике является единственным способом визуализации процесса контаминации.** Однако в более широком понимании это, конечно, не так. Иногда контаминация не приводит к ложноположительному результату и существует скрыто. Например, если тест-система имеет предел обнаружения, не позволяющий детектировать низкие концентрации контаминанты, или выполнение теста предусматривает использование UNG-протокола (см. подраздел 2.2.3.2).

Представьте, что в процессе проведения исследования произошел разлив биологической жидкости. Контаминанта оказалась на рабочем столе. Это контаминация или еще нет? А если сотрудник вдруг наступил на пробирку с продуктами амплификации и раздавил ее — это уже можно назвать контаминацией или следует ждать ложноположительных результатов?

Данные вопросы позволяют понять, что контаминацию как процесс загрязнения нужно рассматривать в более глубинном контексте, а ложноположительные результаты следует воспринимать только как видимую часть «айсберга». **Контаминация — это процесс внепланового, не предусмотренного при проведении исследования перемещения контаминанты.** В то же время к контаминации следует отнести и случаи перемещения контаминанты, предусмотренные инструкцией, но способом, создающим опасность ее дальнейшего распространения.

Действительно, в процессе работы исследователь неминуемо столкнется с проблемой контаминирования лабораторных поверхностей и принадлежностей. Трудно представить лабораторию, в которой бы не происходило аварийных ситуаций. И если учесть возможность перемещения контаминанты с потоками воздуха и на одежде, то следует заключить, что контаминация — это не только весьма распространенное,

но к тому же еще и нормальное, вполне допустимое явление. В определенной степени это действительно так, поэтому ПЦР-тестирование должно проходить в режимных условиях с целым комплексом мер профилактики контаминации, что обуславливает постоянный клиренс контаминанты и препятствует ее распространению [33]. И в этом случае при отсутствии ложноположительных результатов можно заключить, что даже если контаминация и есть, то миграция контаминанты находится под контролем. Так, следует выделить понятие **контролируемой контаминации**, когда в лаборатории нет ложноположительных результатов.

В случае если в лаборатории все же возникли ложноположительные результаты, это свидетельствует лишь об одном: «обычного» режима контроля контаминации становится недостаточно. Миграция контаминанты стала неконтролируемой. Так, следует выделить понятие **неконтролируемой контаминации**. Конечно, причины происходящего должны быть выявлены, и в соответствии с этим сотрудники обязаны принять меры, направленные на их устранение и на клиренс уже распространившейся контаминанты [33].

В кратком резюме следует отметить, что **выполнение ПЦР-исследований неминуемо сопряжено с развитием контаминации**. Профилактические мероприятия не всегда могут надежно защитить от распространения контаминанты. В итоге создается риск того, что контаминанта попадет в исследуемую пробу, а это, в свою очередь, опасно появлением ложноположительных результатов. В связи с этим в лаборатории, помимо профилактических мер, необходимо организовать **систему своевременного выявления (визуализации) неконтролируемой¹ контаминации**, тщательно фиксируя случаи ложноположительных результатов.

2.2.1. Классификация контаминации

Необходимо отметить, что единой, общепринятой классификации контаминации нет. И в литературе можно встретить много ее вариантов. Однако, несмотря на такое разнообразие взглядов, все-таки прослеживается общее мнение авторов: контаминацию целесообразно разделять на виды в зависимости от того, чем она вызвана: ампликонами или нативной НК. Это ключевой момент, поскольку именно от него будет зависеть дальнейшая тактика персонала.

¹ При дальнейшем изложении, чтобы не перегружать текст терминами, слова «неконтролируемая» и «контролируемая» будут опускаться.

И вот, допустим, мы зарегистрировали положительный результат в отрицательном контрольном образце. Это является неоспоримым фактом контаминации¹. Для того чтобы начать работу по борьбе с ней, необходимо понять, что послужило контаминантой: ампликоны или нативная НК. Решить данный вопрос весьма проблематично. Необходимо знать признаки той и другой контаминации, при этом абсолютно патогномоничных среди них нет. В соответствии с этим, когда исследователь впервые сталкивается с контаминацией и не может точно сказать, чем она вызвана, ему для начала следует охарактеризовать ее посимптомно: низкокопийная, высококопийная, масштабная, спорадическая и проч. Эта классификация контаминации является промежуточной, но весьма необходимой для расследования типа контаминанты.

Однако и это еще не все. Например, даже если стало ясно, что контаминация вызвана нативной НК, надлежит понять, каков ее механизм, как распространилась контаминанта. Ведь это может быть реализовано несколькими способами. Выяснение их является не менее важным, поскольку это позволит конкретизировать свою тактику и сделать борьбу с контаминацией более эффективной. В данной связи контаминацию целесообразно разделить по механизму распространения контаминанты. При этом механизмы могут быть общими как для ампликонов, так и для нативной НК.

Вышесказанное предполагает деление контаминации на типы в зависимости от поставленных целей и сложившейся ситуации. Так, я выделяю **«фундаментальную»**, **«принципиальную»** и **«клиническую» классификации контаминации**, которые описаны ниже.

2.2.1.1. «Фундаментальная» классификация контаминации

Полимеразная цепная реакция — это один из способов амплификации нуклеиновых кислот и фундаментальное событие молекулярно-биологического тестирования. Относительно нее выделяют пре-ПЦР- и пост-ПЦР-манипуляции², а помещения лаборатории, в которых они осуществляются, принципиально разделяют на пре-ПЦР- и пост-ПЦР-комнаты [151]. Движение материала, предметов и даже воздуха возможно только в направлении из пре-ПЦР- в пост-ПЦР-помещения безвозвратно (правило поточности) [33]. Это связано с тем, что в процессе ПЦР образуется особая разновидность ДНК,

¹ При условии, что исключено применение интеркалирующих красителей.

² Если они производятся.

называемая продуктами амплификации, или же просто — ампликонами [33]. В отличие от других НК, ампликоны имеют экстремально малые размеры и высокую концентрацию в источнике [172]. По окончании ПЦР их количество оценивается не меньше чем 10^9 – 10^{11} молекул, а один микролитр может содержать около 10^6 ампликонов [57, 172]. К тому же они легче образуют аэрозоли [172], более устойчивы в окружающей среде и рассматриваются как крайне опасный ресурс контаминации в связи с высокой способностью к неконтролируемому распространению [57, 86, 119, 191, 228].

Выражаясь языком эпидемиологов, **ампликоны действительно можно признать наиболее контагиозной из всех возможных контаминант**. Именно поэтому при контаминации, обусловленной ампликонами, тактика действий сотрудников будет особенной [33]. И целью работы по визуализации контаминации должно быть не только своевременное выявление ложноположительных результатов, но и верификация типа контаминанты.

Поскольку при контаминации ампликонами должен быть осуществлен их ретроградный перенос из пост-ПЦР-¹ в пре-ПЦР-помещение, такая контаминация названа **ретроградской**. И наоборот, **антеградная** контаминация означает, что контаминация обусловлена ресурсами пре-ПЦР-помещений, когда контаминанта, не нарушая правила поточности, проходит дальнейший этап амплификации, как и положено ей проходить.

Необходимо отметить, что особенное внимание к ампликонам у исследователей было всегда, и я не первый, кто разделяет контаминацию подобным образом. Однако в литературе приходится сталкиваться с несистематизированной, хаотичной терминологией, вводящей даже в некоторое недоумение, что наглядно представлено в табл. 2.1. Предлагаемые понятия анте- и ретроградской контаминации, в отличие от предыдущих попыток классификации, на мой взгляд, достаточно просты, наиболее явственно обозначают механизм контаминации и могут стать заменой многим употребляемым на сегодняшний день синонимам.

¹ Пост-ПЦР-помещение служит местом для работы с ампликонами [151]. Если методика исследования не предусматривает открытие пробирок с ампликонами, то пост-ПЦР-помещение как таковое не выделяется и существует лишь отдельная зона для проведения амплификации [33]. Однако в случае развития контаминации ампликонами правило поточности нарушено и здесь, поскольку движение материалов из зоны амплификации в зону выполнения предыдущих этапов исследования, так же как и в случае пост-ПЦР-помещения, запрещено [33].

Таблица 2.1

Характеристики и синонимы анте- и ретроградной контаминации

Тип распространения контаминанты	Характеристика контаминанты					Синонимы контаминации, встречающиеся в литературе
	Источник	Разновидности	Молекулярная масса	Концентрация в источнике	Контагиозность	
Антеградный	Пре-ПЦР-проба	Нативная НК (кДНК, естественные РНК, ДНК)	+++	+	+	Sample-to-sample [65, 205], горизонтальная [104], intersample [104], перекрестная [3, 163, 230], внешняя [41], спорадическая [157]
		Плазмиды контрольного материала или стандарта	++	+ / ++	+ / ++	
Ретроградный	Пост-ПЦР-проба	Ампликоны	+	+++	+++	Вертикальная [104], carryover [57, 65, 205, 230], перекрестная [41, 173], пост-ПЦР [108]

Помимо анте- и ретроградной контаминаций, можно выделить и совершенно особую разновидность, в существование которой, откровенно говоря, верится с трудом. И я бы не заводил о ней речь, если бы на практике не наблюдал что-то похожее. Дело в том, что эта контаминация возникает во время проведения амплификации и может быть обусловлена как ампликонами, так и нативной НК. Вот каков ее механизм. На начальном этапе амплификации при нагревании пробирки вместе с испарением воды происходит коиспарение ампликонов, а также нативной НК, что можно сравнить разве что с вырывающимися парами из-под крышки кастрюли с кипящей водой. Затем соседствующие пробирки тем же путем (через край крышки) «вбирают» в себя коиспарившиеся нуклеиновые кислоты, что и обуславливает формирование ложноположительных результатов. Авторы, описавшие это явление, рекомендуют перед амплификацией поверх готовой смеси добавлять минеральное масло, которое играет роль защитного слоя, препятствующего коиспарению НК [205].

Следует обратить внимание и на некоторые другие особенности этого механизма контаминации. Во-первых, при нем наблюдается устойчивость к UNG-гидролизу, что обусловлено потерей активности UNG при воздействии высоких температур (подробнее см. подраздел 2.2.3.2) [205]. Во-вторых, процесс коиспарения и «пробросов» ампликонов по краю крышки пробирок может стать причиной развития ретроградной контаминации, то есть попадания ампликонов в пре-ПЦР-зоны и помещения.

Таким образом, если ранее существовало распространенное мнение, согласно которому применение минерального масла рационально лишь тогда, когда используется прижимная крышка амплификатора, не имеющая функции нагрева [88, 162], то теперь выходит, что минеральное масло необходимо применять, даже если прижимная крышка амплификатора прогревается. Некоторые авторы действительно склонялись к применению минерального масла, поскольку оно позволяет добиться более стабильной амплификации [40]. Однако о том, чтобы минеральное масло было значащим фактором в снижении контаминации, слышу впервые. На мой взгляд, этот вопрос как минимум требует изучения. К сожалению, авторы не указали конструктивные и функциональные особенности применяемого амплификатора, а при попытке установить с ними переписку для прояснения этого вопроса не вышли на связь.

Однако проблема этого типа контаминации может скрываться вовсе не в использовании минерального масла, а в силе прижатия крышкой амплификатора крышек пробирок. Необходимо проявлять пристальное внимание к способности прижимной крышки амплификатора оказывать адекватное давление на закрытые пробирки и уметь регулировать его.

Сначала я отнесся к сообщению A. Stals и соавт. [205] весьма скептически, пока не засвидетельствовал два необычных, феноменальных случая ложноположительных результатов. В первом из них специфическая флюоресцентная кривая была зафиксирована для «сухой» пробирки (без реактивов и пробы), а во втором — по каналу детекции для красителя, отсутствующего в смеси, но присутствующего в соседней пробирке. Что это было, я так и не смог понять. Минеральное масло не применял, крышка нагревается и прижимает исправно...

2.2.1.2. «Принципиальная» классификация контаминации

Контаминанта не может существовать сама по себе и практически постоянно ассоциирована с каким-либо носителем. Исключение составляют лишь случаи, когда контаминанта перемещается в воздухе, но и это только временное ее состояние, обязательно заканчивающееся осаждением на какой-либо объект.

Любая контаминанта имеет первичный источник, то есть объект, который содержит ее в наиболее концентрированном состоянии. Например, это может быть пробирка с биообразцом или пробирка с ампликонами. Персоналу необходимо четко представлять, какой из объектов в лаборатории может выступать в качестве первичного источника контаминанты, чтобы с особым вниманием относиться к нему во время проведения исследования и целенаправленно соблюдать все меры предосторожности при обращении с ним.

По мере распространения контаминанты в пределах лаборатории она охватывает все новые ареалы, но присутствует в них (или на них) уже в гораздо меньших концентрациях. Таким образом, **контаминанта по мере распространения с одного носителя на другой теряет свою «крепость»** (концентрацию). Данную ситуацию можно описать и другими словами: контаминанта **из первичного источника** попадает на другие объекты, которые становятся **вторичными источниками**, но содержат ее в гораздо меньшем количестве.

Те ареалы лаборатории, которые обсеменены контаминантой, следует обозначить как **очаг контаминации**. Если первоначально не ликвидировать наиболее концентрированные скопления контаминанты в очаге (первичный источник, а также высококопийные вторичные источники контаминанты), то общая эффективность деконтаминационных мероприятий будет в итоге низкой. Это устанавливает **порядок деконтаминации**, которую следует проводить поочередно: сначала в отношении наиболее концентрированных, а затем в отношении менее концентрированных источников контаминанты, то есть по ходу (траектории) распространения контаминанты.

Таким образом, знания о первичных и вторичных источниках контаминанты и очаге контаминации являются принципиальными при определении объема превентивных мер и мероприятий по борьбе с уже развившейся контаминацией. Это и положено в основу «принципиальной» классификации контаминации, которая, по существу, «картирует» путь распространения контаминанты, детализируя этим сам механизм контаминации.

«Принципиальная» классификация ретроградной контаминации

1. Контаминация с необнаруженным первичным источником контаминанты. Ретроградная контаминация представляет особую опасность, если первичный источник контаминанты не утилизирован и его местоположение в лаборатории остается неизвестным. Это создает прецедент, когда на уже деконтаминированные ареалы со временем будут поступать новые порции ампликонов из утерянного первичного источника. В этом случае, несмотря на проводимые деконтаминационные

мероприятия, контаминация не прекращается, потому что будет возобновляться из первичного источника.

2. Контаминация с высококопийным вторичным источником контаминанты. Стоит отметить, что ретроградная контаминация, как правило, охватывает практически весь ареал лаборатории. Однако иногда при производстве смыслов может выясниться, что на некоторых участках концентрация контаминанты будет наиболее высокой. На других же объектах, следуя путям распространения контаминанты, можно зафиксировать ее убывание. В таком случае ликвидация высококопийного вторичного источника является первоочередной задачей, наряду с поиском и утилизацией первичного источника контаминанты. При этом высококопийный вторичный источник, как правило, служит маркером места разлива ампликонов из первичного источника контаминанты.

3. Диффузная контаминация. Возникает в том случае, когда невозможно четко определить зоны с наиболее высокой концентрацией контаминанты, которые могли бы стать главным ресурсом, «подпитывающим» контаминацию. Смывы со всех объектов указывают приблизительно на одно и то же количество контаминанты, и путь распространения в этой ситуации проследить не удастся.

4. Перекрестная контаминация. Все больше лабораторий переходят на выполнение *real-time* тестов взамен используемых ранее тест-систем с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. При этом может оказаться, что нуклеотидная последовательность амплифицируемых участков «новых» и «устаревших» тест-систем совершенно идентична. В этой связи при адаптации более чувствительной *real-time* ПЦР может развиваться ретроградная контаминация [173]. И обусловлена она ампликонами, оставленными на поверхностях лаборатории от прежней, «открытой» манипуляции с продуктами амплификации (при использовании электрофореза). При этом речь может идти не только о случаях, когда производителем двух тест-систем является одна и та же компания. Иногда даже разные производители предлагают тест-системы с идентичным амплифицируемым участком [173].

Необходимо обратить особое внимание на то, что часто перекрестная контаминация как понятие употребляется и в другом контексте, обозначая антеградную контаминацию в случае распространения контаминанты от пробы к пробе [119]. В то же время перекрестную контаминацию не следует путать с перекрестным реагированием, когда праймеры и зонды тест-системы сконструированы таким образом, что тест-система становится способной детектировать и другие разновидности микроорганизмов, помимо заявленных производителем [209] (см. начало подраздела 2.1.1).

«Принципиальная» классификация антеградной контаминации

1. Прямая и опосредованная контаминации. Прямая контаминация отличается тем, что вторичных источников контаминанты не образуется. Процесс ее распространения быстрый, «одношаговый» и реализуется путем механического переноса контаминанты из одной пробирки в другую с помощью наконечника либо перемещения контаминанты в воздушном пространстве во время манипуляций с ее первичным источником. Опосредованная контаминация предусматривает большее количество этапов миграции контаминанты, которая, покидая первичный источник, сначала должна осесть на вторичном источнике, а уже затем, распространяясь с него, вызвать контаминацию тестируемой пробы.

2. Контаминация накопления. Выше разъяснена общая закономерность распространения контаминанты, согласно которой каждый новый контаминируемый ареал в сравнении с предыдущим содержит меньшее количество контаминанты. И чем больше промежуточных поверхностей контаминировано на пути к биообразцу, тем больше контаминанта «теряет» в своем количестве и вероятность контаминации биопроб становится меньше. При этом риск контаминации биопроб снижается еще существеннее при регулярных деконтаминационных уборках и ультрафиолетовом облучении рабочих зон, режим которых закреплен в МУ 1.3.2569-09 [33]. Однако существуют участки, труднодоступные для деконтаминации, а потому контаминанта способна накапливаться на них вопреки описанному правилу. Это касается штативов для наконечников, центрифуг, вакуумного отсоса, емкостей для сброса наконечников и прочего оборудования, мебели и материалов. Все они также должны проходить регулярную превентивную деконтаминацию или замену, поскольку являются местом сорбции (накопления) контаминанты. И со временем количество контаминанты на них способно достигнуть такого уровня, что, по существу, эти объекты становятся вторичным источником контаминанты.

Необходимо отметить, что при ретроградной контаминации накопительный механизм формирования вторичных источников контаминанты также имеет место. Однако если в отношении антеградной контаминации это позволяет выделить ее в отдельную разновидность контаминации, то в случае ретроградной контаминации накопление ампликонов на лабораторных поверхностях, оборудовании и материалах — это облигатный процесс. Таким образом, часть вторичных источников при ретроградной контаминации являются следствием накопления ампликонов, а часть образуются в результате постепенного распространения ампликонов от первичного источника. При этом, по моему опыту, особую сложность в плане проведения

деконтаминационных мероприятий представляет собой накопление продуктов амплификации в холодильном оборудовании и на бумажных носителях информации.

3. Горизонтальная и внешняя контаминации. Как правило, говоря о антеградной контаминации, в качестве источника контаминанты прежде всего рассматривается проба, проходящая какой-либо из этапов ПЦР-исследования, то есть фактически предполагается, что контаминанта распространяется от пробы к пробе, что некоторые авторы так и обозначают — «sample-to-sample» [65, 205]. На мой взгляд, ее более удобно называть горизонтальной контаминацией [104].

В некоторых случаях источником контаминанты может стать не исследуемая проба, а сотрудник лаборатории или какой-нибудь другой внешний объект. Такую контаминацию следует обозначить как внешнюю. Выделение внешней контаминации в отдельную группу необходимо прежде всего для того, чтобы исследователь предпринял исключительные меры предосторожности или уделит особое внимание некоторым повседневным мерам. Так, например, участие человека в исследовании характеризуется необычайно высокой частотой ложноположительных результатов, если в качестве аналита выступает участок генома человека [228]. И когда этот участок повторяется в геноме многократно (около миллиона копий для Alu-повторов, например), то контаминация является обязательной составляющей исследования, что в общем позволяет говорить даже о некоем фоновом уровне контаминации [218, 228]. Это требует особенной осторожности при проведении манипуляций с биообразцами и реактивами, поскольку в данном случае ДНК самого исследователя может стать контаминантой. А барьерам, препятствующим распространению контаминанты от исследователя в окружающую среду, необходимо уделить особое внимание.

Другими примерами, при которых часто возникает контаминация, относящаяся к внешней, могут быть исследования митохондриальной ДНК и консервативных участков бактериальной 16s рРНК [190, 218, 228].

Интересно, что для некоторых аналитов внешние источники контаминанты могут быть совершенно неожиданными. Например, судя по результатам обсемененности перчаток и оборудования гинекологического кабинета вирусом папилломы человека, опасность контаминации проб этим возбудителем весьма вероятна еще на долабораторном этапе [102]. Такая же картина наблюдается в случае, если отбор материала на исследование гриппа производится в кабинете для работы с вакцинами [89].

Во многих странах практикуется изготовление так называемых in house тест-систем, когда лаборатория разрабатывает и выполняет

валидацию тест-системы самостоятельно [70, 104]. Традиционно считается, что частота ложноположительных результатов при этом выше [160], в том числе по причине внешней контаминации. Прецедент создается из-за необходимости непосредственного изготовления контрольных материалов, что чаще всего возможно при использовании плазмид. Однако для этого необходимо создать их источник, что подразумевает работу с культурами микроорганизмов, генерирующими высокие концентрации плазмид [57, 172]. В связи с этим некоторые исследователи заказывают плазмиды в сторонних организациях [104]. И это в какой-то степени снижает риск контаминации, но не ликвидирует ее, поскольку лаборатория по-прежнему вынуждена выполнять подготовку (разведение) к работе полученной высококопийной плазмидной ДНК от фирмы-производителя [104]. Некоторые авторы в качестве профилактики контаминации плазмидной ДНК применяют UNG-протокол, что весьма эффективно снижает риск возникновения ложноположительных результатов [172].

Однако проблема контаминации плазмидной ДНК не звучит как обособленная тема в случае применения коммерческих тест-систем. В коммерческих контрольных материалах цНК не содержится в экстремально высоких концентрациях и укладывается в диапазон линейности теста [70]. Именно поэтому коммерческие положительные контрольные образцы при выполнении исследования следует рассматривать как обычные пробы, а контаминацию с их участием называть горизонтальной.

Как видно, внешняя контаминация является проблемой избранных тестов. На мой взгляд, поэтому производители тест-систем должны всесторонне информировать персонал лаборатории о рисках внешней контаминации и особых мерах предосторожности при тестировании некоторых аналитов. Например, при исследовании человеческой НК, когда источником контаминанты является сам исследователь, не будет лишним еще раз обратить внимание оператора на ключевые меры профилактики (использование маски, шапочки, халата, перчаток, надлежащая эксплуатация ламинарных шкафов¹, исключение прикосновений к флаконам с реагентами без перчаток и проч.).

4. Контаминация реактивов. Обычно контаминация реактивов рассматривается как возможное, но необязательное явление при любой

¹ В самом начале своей практической деятельности при выполнении экстракции НК я располагал штативы с пробирками в ламинарном шкафу над отверстиями для воздушных потоков. Это создавало условия для векторного движения воздуха прямо вовнутрь пробирок при их открывании, что в итоге обуславливало чрезвычайно высокий уровень ложноположительных результатов при исследовании человеческой ДНК.

из разновидностей контаминации: ретроградной или антеградной (горизонтальной и внешней). В то же время контаминация реактивов встречается чаще при ретроградной контаминации, а при некоторых разновидностях внешней контаминации может и вовсе быть явлением изолированным (то есть когда контаминирован только реактив и ничто другое; пример представлен ниже).

В любом случае необходимо понимать, что контаминированный реактив — это всегда вторичный источник контаминанты. При этом реактив или лабораторный пластик может быть контаминирован далеко за пределами лаборатории, например, на заводе-изготовителе [64, 71], что особенно характерно для фунгальной ДНК, тестирование которой осуществляется в клинической практике глубоких микозов. Контаминация реагентов при этом является существенной проблемой, ограничивающей применение данного теста [71]. В связи с этим авторы рекомендуют использовать пластик и реагенты с маркировкой не только DNase/RNase-free, но и DNA-free [71]. Однако и это зачастую не позволяет исключить контаминацию реактивов фунгальной ДНК [71]. Контаминация реактивов на заводе-изготовителе описана и для *Legionella pneumophila* [198].

Необходимо заметить, что понятие «контаминация реактивов» рассматривается более широко и включает контаминацию воды и расходного материала, но только в том случае, если контаминация расходного материала не была вызвана механизмом «накопления» (см. выше).

Контаминация реактивов также актуальна, если в качестве внешнего источника выступает человек [64]. Контаминация реактивов происходит намного реже, если источником контаминанты служат тестируемые образцы. Связано это с тем, что приготовление реагентов должно происходить отдельно, в отведенной для этого зоне [33], и в некоторых лабораториях это условие соблюдается [104].

Конечно, при определенных разновидностях контаминации реактивы могут быть контаминированы чаще, например, при ретроградной контаминации. Однако необходимо отметить, что версия о контаминации реактивов должна быть выдвинута при любой регистрируемой контаминации [104]. Более того, если контаминация не спорадическая (регистрируется неоднократно), то необходимо выполнить полную замену реактивов [104].

2.2.1.3. «Клиническая» классификация контаминации

Для того чтобы наиболее эффективно купировать развившуюся контаминацию и справиться с ее последствиями, желательно иметь представление об источнике контаминанты и путях ее распространения.

В терминах и понятиях это в полной мере можно выразить, используя «фундаментальную» и «принципиальную» классификации контаминации (см. подразделы 2.2.1.1 и 2.2.1.2). Однако первоначально, столкнувшись с контаминацией, невозможно получить прямые признаки, указывающие, с какой из ее разновидностей исследователю приходится иметь дело. Существуют лишь первичные данные, с помощью которых контаминацию можно охарактеризовать. Таким образом, **«клиническая» классификация контаминации — это своего рода пропедевтика контаминации, описывающая разновидности ее проявлений («симптомы»), что в итоге позволит дифференцировать разновидность самой контаминации.**

С точки зрения логики изложения материала я счел более рациональным рассмотреть «клиническую» классификацию контаминации в разделе 2.3.

2.2.2. Движущие силы и «механика» контаминации

Процесс контаминации складывается из нескольких простых этапов: 1) контаминанта покидает первичный источник, 2) распространяется в пределах лаборатории и, в заключение, 3) проникает в пробирку-акцептор. При этом второй этап иногда отсутствует.

Как видно, реализация этих этапов обусловлена миграцией контаминанты. Именно поэтому знание причин и закономерностей перемещения контаминанты может стать основой стратегии профилактики контаминации.

Наиболее простые примеры контаминации настолько явственно повествуют о ее механизме, что вряд ли будет уместным подробно останавливаться на том, как произошла контаминация и что является движущей силой контаминанты. И без того понятно, что, если после дозирования предыдущей пробы не поменяли наконечник, это приведет к контаминации.

В общем-то в этих элементарных примерах **миграцию контаминанты можно объяснить ее перемещением на каком-либо солидном (твердом) носителе (наконечник, перчатка и проч.) [51, 157] или аэрогенным распространением: аэрозолизацией [157] с дальнейшим перемещением контаминанты потоками воздуха и осаждением на поверхностях [57, 228].**

Однако так «просто» бывает не всегда, и порой «след» контаминанты теряется. Так, например, иногда даже будучи в полной уверенности, что исследование проведено безукоризненно, сотрудники лаборатории с удивлением наблюдают явление контаминации. Что же привело к ее возникновению? Как объяснить распространение контаминанты, если условия лаборатории приближены к «идеальным»? Некоторые исследователи объясняют это явление «субоптимальными» манипуляциями

с высококопийными пробами, в результате чего может произойти случайный занос контаминанты из положительной пробы в отрицательную [104]. Остается непонятным, что именно подразумевается под словами «субоптимальные манипуляции».

Не меньше таинственности в понимание движущих сил распространения контаминанты добавило изучение влияния воздуха на этот процесс. Традиционно воздуху придавалось важнейшее значение [155]. Однако когда речь зашла об экспериментах, целенаправленно изучающих роль воздуха при миграции контаминанты, весьма неожиданно выяснилось, что участие его в перемещении контаминанты не столь значительное, как предполагалось ранее [191, 228]. Как же тогда и с помощью каких движущих сил происходит миграция нуклеиновых кислот?

Существенное ограничение экспериментов, ставящих под сомнение многозначительную роль воздуха в миграции НК, состоит в том, что в качестве движущих сил распространения ДНК/РНК в воздушном пространстве были учтены лишь сила тяжести НК и воздушные потоки (возникшие при центрифугировании, например), то есть согласно этой логике ДНК/РНК распространяются линейно, подобно «камню», который, если его отпустить, упадет вниз, а если бросить — полетит в цель. Однако ДНК/РНК имеют заряд и подвержены электростатическим взаимодействиям, то есть под действием электростатических сил они могут не только менять свою траекторию при перемещении в воздухе, но и отрываться от твердых тел, распространяясь в любом направлении без участия воздушных потоков и не подвергаясь некой предварительной жидкой аэролизации. На основе этого свойства в криминалистике был разработан метод электростатических «смывов» ДНК с одежды [233].

Конечно, роль электростатических сил применительно к контаминации совершенно не изучена, но она может объяснять парадоксально низкую способность воздуха оказывать влияние на миграцию контаминанты в приведенных в пример экспериментах [191, 228]. Проще говоря, ДНК/РНК не «падает» в пробирку, как град или дождь, под действием силы тяжести, а притягивается к ней, как волос к наэлектризованной расческе. Это также может обусловить избирательность накопления контаминанты на некоторых предметах (пластиковые штативы с наконечниками, некоторые «электростатически липкие» материалы халатов, например¹).

¹ Примеры указаны эмпирически, и ни один из них не подтвержден экспериментально.

Примечательно, что **материал, содержащий ДНК, сорбируется при помощи электростатических сил, только будучи в сухом состоянии** [233]. Вероятно, по этой причине «влажная» аэрозолизация НК, которая ранее рассматривалась как значимый фактор распространения контаминанты, не является столь существенной в возникновении контаминации [191]. На самом деле более опасным ресурсом контаминации может быть высушенная НК, которая в отличие от растворенного варианта не связана с растворителем и как следствие подвержена действию электростатических сил. Учитывая возможную роль электростатических сил в распространении НК, неожиданным решением проблемы контаминации может стать применение «антистатиков» при работе с пробирками и наконечниками. Хотя, конечно, этот вопрос требует детальной проработки и изучения.

Предваряя освещение вопросов профилактики контаминации, нельзя не сказать и об **особой стойкости ампликонов к ультрафиолетовому излучению** в сравнении с другими нуклеиновыми кислотами [57, 86, 155], что в общем лишь способствует персистенции контаминанты.

2.2.3. Профилактика контаминации

Еще на заре использования ПЦР ощущалась острая необходимость в разработке технологий по противодействию контаминации [121, 226]. Положительной тенденцией стало совершенствование метода ПЦР, что позволило минимизировать вклад персонала в формирование контаминации и привело к появлению коммерческих тест-систем и оборудования, резистентных к ней [104]. Однако их применение осложняется высокой стоимостью [41]. Именно поэтому **вряд ли будут существовать «устаревшие» методы профилактики контаминации**, и в этом подразделе я попытаюсь представить все возможные их варианты.

Более того, как заключили J. Aslanzadeh и соавт. (2004), несмотря на многие «технические» успехи и появление резистентных к контаминации тестов, по-прежнему **нет ни одной коммерческой тест-системы, которая бы исключила ложноположительные результаты, обусловленные явлением контаминации** [57]. И надо сказать, что к этому времени уже были разработаны все применяемые ныне меры ее профилактики. Именно поэтому мероприятия по предупреждению контаминации вряд ли могут быть избыточными, но и они должны иметь обоснование, чтобы не превратить процесс профилактики контаминации в «охоту на ведьм» и паранойю.

В общем **профилактика контаминации может быть достигнута общелaborаторными и специальными мерами**, о чем и пойдет речь ниже.

2.2.3.1. Общелабораторные меры профилактики контаминации

Область применения и недостатки

Проблематика контаминации требует от исследователя соблюдения некоторых мер предосторожности во время работы. Первоначально эти меры были представлены в отдельно взятых научных публикациях. Позже стали появляться обзоры, систематизирующие накопленный опыт относительно методов профилактики контаминации. Однако лишь с изданием государственных регламентов все известные методы профилактики контаминации получили свой правовой статус: часть из них стали обязательными, а часть нет. Сформировалось понятие об охранительном режиме, который должна исполнять любая ПЦР-лаборатория. Это и есть **общелабораторные меры профилактики контаминации**. В нашей стране они закреплены в МУ 1.3.2569-09 [33].

Как оказалось, этих мер недостаточно для надежной профилактики контаминации. Именно поэтому часто исследователи применяют другие, «необязательные» (а потому названные специальными) меры профилактики контаминации. В отличие от общелабораторных мер, они не указаны в МУ 1.3.2569-09. И это весьма печально, ведь некоторые способы профилактики контаминации уместно перевести из разряда необязательных (специальных) в правовое поле общелабораторных средств профилактики, прописав их в МУ 1.3.2569-09. Эта прежде всего касается использования *real-time* тест-систем. Подавляющее большинство лабораторий использует именно их [48]. Именно поэтому сам по себе запрет использования систем детекции, предусматривающих открытие пробирок с ампликонами, хотя бы для лабораторий практического звена здравоохранения выглядит назревшим и вполне реализуемым.

Следует понимать еще и то, что МУ 1.3.2569-09, выполняя функцию регулятора тех минимальных требований, которые необходимо соблюдать при организации работ по производству ПЦР-исследований, должны быть скрупулезно проработаны. Поскольку упущенные в них, но совершенно необходимые для работы детали вряд ли будут соблюдаться, исходя из той логики, что «если они не прописаны в МУ, то и выполнять их вовсе не обязательно».

Однако МУ 1.3.2569-09 не просто упускают некоторые важные детали, а порой могут даже привести практикующих специалистов в замешательство. Например, принципиальная позиция использования в каждой из рабочих зон своих принадлежностей диктует запрет на их перемещение за пределы конкретного ареала (помещения, ламинарного шкафа, ПЦР-бокса, рабочего стола). Возникает вопрос: как же тогда надлежащим образом выполнить их деконтаминационную обработку?

Конечно, если это касается термостатов, дозаторов и прочего оборудования, которое может быть обработано ветошью, то их деконтаминацию можно провести на месте, в пределах зоны использования. Однако как быть со штативами для пробирок? Их обработка требует полного погружения в раствор хлорсодержащих дезинфектантов с дальнейшим ополаскиванием и сушкой. Для этого как минимум необходимо иметь емкость для дезинфекции, мойку с подведенной горячей и холодной водой для ополаскивания штативов, а также место для их сушки. Возникает логичный вопрос: как разместить все это, например, в рамках зоны выделения нуклеиновых кислот? Тем более непонятно, как обрабатывать вакуумный отсос, когда становятся необходимыми место для слива накопленной жидкости, большие емкости для обработки колбы-ловушки и емкости для обработки трубок отсоса. После чего все это следует надлежащим образом ополоснуть и просушить, что очевидно невозможно в условиях зоны, предназначенной для проведения исследований. К сожалению, мне приходилось встречать случаи и дословного «соответствия» МУ, когда, чтобы не укатывать вакуумный отсос за пределы рабочей зоны, жидкость из колбы-ловушки сливали в раковину для мытья рук в предбоксовом помещении.

То же самое касается и мест хранения уборочного инвентаря, который согласно МУ 1.3.2569-09 должен быть отдельным для каждой рабочей зоны и хранить его следует в месте использования. Неужели в предбоксы? Если да, то какие условия хранения необходимо соблюдать? Должны ли проходить деконтаминационную обработку швабры и ведра? Как набрать и слить воду из ведра, не выходя за пределы рабочей зоны? А что делать с ветошью? Где ее необходимо обрабатывать и как? Или все-таки лучше использовать одноразовую ветошь? Мне приходилось наблюдать, что в случае аварийного и своевременно не замеченного разлива источника ампликонов генеральные уборки лишь способствуют генерализации и персистенции контаминации. Как быть с этой ролью генеральных уборок в «раздувании» контаминации?

Необходимо также указать и на отсутствие возможности полной смены спецодежды при перемещении сотрудников из одной зоны в другую. Вернее, теоретически это возможно, но этого никто не делает и делать не будет. Надо учитывать, что многие даже дельные на первый взгляд рекомендации на практике не работают. С этим необходимо мириться и пытаться изыскивать другие решения. Ведь зачем требовать то, что нельзя осуществить?

При проведении превентивной деконтаминации особую сложность представляют «труднодоступные» участки, например штативы для наконечников, морозильные камеры и холодильники. В МУ 1.3.2569-09

нет детализированных рекомендаций относительно этапов их деконтаминации, равно как и того, в каких помещениях она должна проводиться, при том что холодильное оборудование может стать вторичным источником контаминанты и поддерживать ее персистенцию. В отношении штативов для наконечников остается лишь догадываться, как часто необходимо выполнять их деконтаминационную обработку, сколько циклов обработки может «выдерживать» штатив и каков порядок выкладки наконечников в штативы.

Перечисленные вопросы так и остаются без внятного ответа, и каждая лаборатория решает их по своему усмотрению.

Общелабораторные методы деконтаминации, помимо перечисленных ограничений, имеют и еще одно. Это легко продемонстрировать на примере генеральных уборок. Необходимо понимать, что ПЦР-лаборатория выполняет работу с возбудителями инфекционных и паразитарных заболеваний, поэтому следующей целью охранительного режима (и в том числе проведения генеральных уборок) является дезинфекция. Однако мероприятия по дезинфекции могут не приводить к дезактивации контаминанты. И если генеральные уборки с использованием дезсредств способны инактивировать представителей микромира, это совсем не значит, что они вызовут инактивацию ампликонов. По моему личному опыту, генеральные уборки лишь способствуют распространению ампликонов. Таким образом, понятия дезинфекции и деконтаминации в МУ 1.3.2569-09 не дифференцированы, и порой непонятно, для чего проводится то или иное мероприятие. То же касается вопроса о рациональности использования ламинарных систем на этапе экстракции нуклеиновых кислот [191], когда изучаемый возбудитель не представляет опасности для персонала и персонал не является источником контаминанты.

Особой проблемой общелабораторных мер профилактики контаминации является их доказательная база. В МУ 1.3.2569-09 нет ни одной ссылки на литературный источник, обосновывающий то или иное утверждение. Однако надо понимать, что правила, составленные на основе интуитивно понятных умозрений и несистематизированного опыта, не могут быть основанием для использования в медицинской практике [59]. В этом отношении лабораторная диагностика должна неуклонно развиваться в векторе общей теории доказательной медицины [59, 110, 171].

Необходимо учесть, что этот недостаток касается не только отечественных методических указаний. Авторы Рекомендаций ВОЗ по организации ПЦР-лабораторий если и обращаются к источникам литературы, то перечень их весьма скудный [151]. Более того, при составлении

подобных практических рекомендаций не следует руководствоваться и результатами отдельных исследований, обзоров и даже отдельно взятого метаанализа без их практического переосмысления, поскольку они могут быть проведены без учета некоторых критических условий реальности [59, 110]. И этому есть конкретный пример.

Так, недовольство методическими рекомендациями по организации работ в ПЦР-лаборатории было и раньше. Не обнаружив в них достаточных доказательств, С.А. Scherczinger и соавт. еще в 1997 г. провели ряд экспериментов по изучению условий, в которых может реализоваться контаминация [191]. Удивительно, но авторы не обнаружили контаминации при, казалось бы, очевидных угрозах, например, при выполнении работ с отрицательным контрольным образцом и ампликонами в одной зоне без смены перчаток, используя наконечники без фильтров. Это невольно наталкивает на мысль о том, что практика «зональности» лаборатории и другие методы физических барьеров являются излишними, а сами методические рекомендации должны быть коренным образом изменены. Однако наряду с этими выводами существуют и другие данные, когда зональная сепарация выполнения пре- и пост-ПЦР-работ приводит к существенному снижению частоты ложноположительных результатов [61].

Несмотря на всю убедительность данных, полученных С.А. Scherczinger и соавт., они могут таить в себе существенные ограничения. Дело в том, что при описании эксперимента авторы не указали аналитическую чувствительность используемого метода, что может быть крайне важным обстоятельством. Так, М. Eddyani и соавт. при анализе внешнего контроля качества наблюдали, как некоторые лаборатории с высоким уровнем предела обнаружения не имели ложноположительных результатов [95]. А в связи с тем, что контаминация, как правило, происходит в диапазоне низких концентраций (чаще всего лишь 1–100 молекул контаминанты попадают в пробирку-акцептор [163]), именно высокий предел обнаружения мог явиться главным недостатком исследования С.А. Scherczinger и соавт., что и не позволило авторам зафиксировать ложноположительных результатов. Однако об этом остается только догадываться.

В заключение следует отметить, что МУ 1.3.2569-09 бесспорно выполняют важнейшую функцию регулятора качества ПЦР-исследований в практическом здравоохранении. Тем не менее работу над их содержанием нельзя считать совершенной и законченной. К сожалению, сама проблема контаминации, несмотря на ее актуальность, до сих пор остается малоизученной, то же касается и вопросов по противодействию ей, особенно в части общелабораторных мер. На мой

взгляд, весьма обоснованно выделить целое научное направление, занимающееся изучением явления контаминации, что в итоге должно способствовать оптимизации МУ.

Разновидности общелабораторных мер профилактики контаминации¹

Выход контаминанты за пределы своего источника — это вполне естественное событие. Конечно, если оно предусмотрено инструкцией (дозирование пробы, удаление супернатанта и проч.). Незапланированные случаи перемещения контаминанты следует отнести к аварийным. Однако **как при плановой, так и при аварийной миграции контаминанты существуют меры предосторожности, препятствующие дальнейшему ее распространению**: расходный материал, контактирующий с источником контаминанты, должен быть одноразовым и после использования подлежит утилизации; супернатант следует собирать в колбу-ловушку с хлорсодержащим средством, отработанные электрофоретические гели и буфер, а также участки разлива источника контаминанты необходимо подвергнуть деконтаминации. Случайное повторное применение одноразовых материалов необходимо исключить, что особенно касается наконечников, которые при использовании желательно считать. Эти, а также прочие меры и есть та первая линия защиты, которая обеспечивает профилактику, локализацию и деградацию «крупных» (очевидных) загрязнений контаминантами.

В отсутствие «видимых» загрязнений контаминантами, в лаборатории так или иначе **должен быть организован режим превентивной деконтаминации, предусматривающий создание барьеров на путях распространения контаминанты и дезактивацию контаминанты**, то есть деконтаминация осуществляется даже при отсутствии явной контаминации.

Устройство барьеров, сдерживающих миграцию контаминанты, заключается в 1) использовании принципа поточного движения исследуемых проб согласно последовательности прохождения ими этапов анализа; 2) сепарации вентиляционных потоков воздуха в помещениях, создании стерильной воздушной среды в ламинарных системах и ограничении локальных неконтролируемых потоков воздуха во время работы с открытыми пробирками (например, при центрифугировании или кондиционировании воздуха); 3) запрете использования оборудования и расходных материалов за пределами той зоны, в которой предусмотрена их эксплуатация; 4) разделении видов работ по классу опасности в отношении риска инициации контаминации (работа с реактивами,

¹ Рассмотрены более подробно в МУ 1.3.2569-09 [33]. Необходимо также отметить, что согласно МУ 1.3.2569-09 лаборатория должна быть приведена в соответствие и с другими основополагающими нормативными актами [43, 47].

биообразцами, плазмидами, ампликонами) и выполнении их в особых помещениях (рабочих зонах), что предусматривает смену спецодежды и гигиеническую обработку рук при перемещении сотрудника между ними.

Химическая дезактивация контаминанты в рамках режима превентивной деконтаминации предусматривает различные виды уборок¹. Дезактивация контаминанты производится и при использовании ультрафиолетового излучения. Безусловно, этот метод является эффективным, но лишь в случае, если облучаемые поверхности гладкие и расположены перпендикулярно распространению лучей лампы [86]. Эффективность ультрафиолетовой обработки лимитирована расстоянием от лампы до дезактивируемой поверхности, а также зависит от интенсивности излучения, которое должно регулярно контролироваться [86]. Более того, эффективность инактивации НК зависит от ее молекулярной массы и первичной последовательности [57, 86, 155]. Все это в совокупности делает метод УФ-деконтаминации весьма уязвимым, в связи с чем некоторые авторы перестраховываются и считают возможным оставлять лампы включенными круглосуточно, в то время пока работы в конкретной зоне не производятся [86].

2.2.3.2. Специальные меры профилактики контаминации

К сожалению, общелабораторных мер недостаточно для эффективной профилактики контаминации. Это подталкивает сотрудников лаборатории использовать другие способы «защиты» от ложноположительных результатов, и они не являются общелабораторными лишь потому, что их не обязывают применять МУ 1.3.2569-09. Именно поэтому данные способы профилактики я назвал специальными.

Специальные меры профилактики, как и общелабораторные, основаны на принципах устройства барьеров на пути распространения контаминанты и ее дезактивации. Некоторые авторы не используют какой-либо один метод и предлагают комбинированный подход [78, 140]. Однако на практике он очень трудоемок, осуществляется вручную и сильно зависит от человеческого фактора, поэтому важно, чтобы меры борьбы с контаминацией были к тому же инкорпорированы в тест-систему или стали одним из свойств используемого оборудования. И действительно, **основным трендом борьбы с контаминацией является ее коммерциализация.** Ведь речь идет о практическом здравоохранении,

¹ В качестве дезактивирующего средства в методических указаниях рекомендуется использовать ДП-2Т [33]. Однако следует учесть, что это коммерческое название трихлоризоциануровой кислоты. Именно поэтому можно использовать аналоги ДП-2Т. Для дезактивации ампликонов я успешно применял и дихлоризоциануровую кислоту.

и самостоятельность здесь не приветствуется. Отклонение от инструкции производителя тест-системы неприемлемо [12]. В этом случае применить какой-либо способ дезактивации ампликонов так просто нельзя. Конечно, принципиально это не возбраняется, но по существу тогда тест-система должна вновь пройти процедуру валидации, что крайне непросто выполнить в реальных условиях отечественного здравоохранения [12].

В предыдущих подразделах мы выяснили, что контаминация не является однородной. В зависимости от типа контаминанты ее можно разделить как минимум на антеградную и ретроградную. Первоначально исследователям были доступны лишь методы детекции, предусматривающие манипуляцию с продуктами амплификации. В этих обстоятельствах ретроградная контаминация являлась неотъемлемой составляющей работы и главной причиной ложноположительных результатов. Коммерческие предложения по профилактике контаминации в этих условиях не заставили себя долго ждать. Так, было создано приспособление для загрузки постамплификационного материала в гель путем прокола нижней части пробирки, что, наряду с использованием одно-разовых гелей, позволяет герметизировать внесение материала в лунку геля и тем самым потенциально снижает интенсивность загрязнения окружающего пространства ампликонами [51]. Другой способ профилактики ретроградной контаминации заключается в автоматизации процесса электрофореза нуклеиновых кислот, что, наряду с применением капиллярного электрофореза, препятствует распространению ампликонов [124, 226].

Но даже и в этом случае приходится говорить не столько о снижении риска контаминации, сколько об уменьшении ее интенсивности. Какими бы ни были меры предосторожности, **любые, тем более регулярные, манипуляции с ампликонами неминуемо приводят к развитию ретроградной контаминации.** И когда речь заходит о электрофоретической детекции продуктов амплификации, следует понимать, что выполнение ПЦР-исследования уже происходит в условиях некой фоновой контаминации, что несет в себе постоянный риск получения ложноположительных результатов. Другие авторы выражают недоверие к манипуляциям с ампликонами более сдержанно, указывая не на существование фоновой контаминации, как это делаю я, а лишь на дополнительный риск развития контаминации [1, 23, 35, 151].

Так или иначе, всеобщей тенденцией является отказ (если это возможно) от метода электрофоретической детекции продуктов амплификации. Тест-системы, которые не предусматривают открытия пробирок после проведения амплификации, получили значительное

преимущество и в практическом здравоохранении стали наиболее востребованными [48, 197]. Их еще называют «закрытыми» [119, 173, 194], а метод электрофореза именуют «открытым» [194]. Следует заметить, что понятия «закрытый» или «открытый» в прочих областях лабораторной диагностики имеют другой смысл. Так часто обозначают возможность использования реагентов других производителей на используемом оборудовании [54]. Первоначально это не вызывало путаницы. Однако с появлением полностью автоматизированных платформ для выполнения ПЦР-исследований, на основе которых стало возможным с максимальным удобством использовать реагенты других производителей (в том числе «собственного производства»¹), понятия «закрытый» и «открытый» для ПЦР приобрели уже второй смысл [52, 77, 100]. В этой связи я предлагаю назвать методы детекции продуктов амплификации, не требующие открытия пробирок, не закрытыми, а *in tube*-системами или *in tube*-детекцией, и наоборот, тот вид детекции, который предусматривает манипуляции с ампликонами, — *ex tube*-детекцией.

На современном этапе развития метод электрофоретической детекции стали считать устаревшим [194], но не только по причине значительного риска контаминации при его использовании. *In tube*-детекция, приходящая ему на смену, кроме более высокой резистентности к ретроградной контаминации, имеет ряд других преимуществ: она менее трудоемка, имеет более выгодный предел обнаружения и широкий диапазон линейности [119, 176, 194].

Однако ампликоны при использовании *in tube*-систем потенциально могут быть даже более опасным ресурсом контаминации, что обусловлено низким пределом обнаружения этих тестов и образованием ампликонов с еще меньшей молекулярной массой в сравнении с электрофоретическими методами [119]. Последнее обстоятельство, как известно, лишь способствует распространению контаминанты [205]. И поэтому **главным условием безопасной работы с *in tube*-тестами является наличие отлаженной системы утилизации пробирок с ампликонами**, что, по моему мнению, должно быть закреплено во внутренних документах лаборатории. Ведь если произошел разлив ампликонов, это неминуемо приведет к ложноположительным результатам, тем более когда этот разлив остался незамеченным. Сотруднику, производящему утилизацию, необходимо пройти инструктаж, а также иметь представление об основах ПЦР и тех рисках, которые несет в себе отклонение от выработанных в лаборатории правил утилизации пробирок с ампликонами, то же самое касается осведомленности о разновидностях уборок, правил

¹ In house тест-системы.

и очередности использования уборочного инвентаря. Это остро ставит вопрос о том, кто должен выполнять уборку и допустимо ли вообще ее выполнение младшим медицинским персоналом, что на сегодняшний день широко практикуется в ПЦР-лабораториях.

В личной практике мною была установлена достаточно «жесткая» схема утилизации пробирок с ампликонами: по подобию матрешки я последовательно герметизировал их в два пакета с замком zip-lock, а затем в непрокальваемую емкость для отходов класса «Б» и пакет для отходов класса «Б». Вынос ампликонов за пределы учреждения производился в конце каждого рабочего дня.

Так или иначе, но проблема контаминации **при использовании in tube-детекции** по-прежнему остается весьма актуальной [194]. И несмотря на то, что **роль ампликонов в возникновении контаминации здесь отходит на второй план, а в качестве главной причины контаминации рассматривается нативная НК** [104], всегда существует опасность контаминации ампликонами в связи с возможностью аварийного открытия пробирок с продуктами амплификации. А это, как указывалось выше, в случае разлива ампликонов неминуемо приведет к ложноположительным результатам. Более того, как утверждают некоторые авторы, в процессе самой амплификации вероятно возникновение «проброса» ампликонов по краю крышки пробирок [205] (см. подраздел 2.2.1.1). Другим источником ампликонов может стать использование в предыдущем периоде работы метода электрофореза, и при переходе на in tube-тест-системы, есть возможность того, что оставшиеся ампликоны станут матрицей для амплификации и ресурсом ложноположительных результатов [194]. Надо заметить, что такая контаминация относится к ретроградной (см. подраздел 2.2.1.2), но некоторые авторы называют ее перекрестной [173]. Это создает лишь путаницу, поэтому ее лучше называть перекрестной ретроградной.

В связи с описанным **исследователи перестраховываются**, и, помимо создания физических барьеров на пути распространения продуктов амплификации, было **предложено несколько методов химической дезактивации ампликонов** [57]. Однако **практическое значение получило применение лишь так называемого UNG-протокола** [57, 194]. С начала 1990 х гг. он с успехом используется как в ex tube-, так и в in tube-системах детекции [194, 201, 234].

Урацил-N-гликозилаза (uracil-N-glycosylase, UNG) — фермент, участвующий в репарации ДНК, распространен у бактерий и вызывает гидролиз цепи ДНК по остаткам урацила [57]. В этой связи при подготовке ПЦР-смеси вместо дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) используется дезоксиуридинтрифосфат (дУТФ). Именно поэтому

ампликоны, в отличие от нативной ДНК, становятся чувствительны к UNG-гидролизу, после чего уже не способны быть матрицей для последующей реакции амплификации [57]. И хотя UNG является термолabileм ферментом, что должно вызвать его разрушение при горячем старте ПЦР, некоторые авторы обеспокоены возможностью неполной денатурации UNG, что в итоге потенциально способно привести к гидролизу целевых амплифицируемых фрагментов положительной пробы и как следствие к снижению чувствительности метода [57, 194]. Однако известны куда более термолabileные изоформы UNG, что позволяет совмещать UNG-протокол даже с обратной транскрипцией, традиционно выполняемой при температуре 45–50° С [119, 128]. И как показывает опыт, использование UNG-протокола не приводит к снижению аналитической чувствительности ПЦР [172, 234].

Химическую инактивацию ампликонов (в том числе с помощью UNG-гидролиза) в литературе иногда называют стерилизацией [57], хотя **ни один из способов дезактивации не гарантирует абсолютный эффект**. В частности, для UNG-протокола речь идет приблизительно о 100-кратном снижении количества ампликонов [194], что, конечно, зависит от ряда их характеристик и параметров инкубации с UNG [172, 173, 211]. Более того, как выяснилось, разрушенные с помощью UNG ампликоны, попадая (контаминируя) в пробы пациентов, способны конкурировать с целевой НК за связь с праймерами [58]. Это обуславливает снижение чувствительности тест-системы и появление ложноотрицательных результатов [58].

В целом эффективность UNG-гидролиза в отношении предотвращения контаминации в условиях практики признана достаточно высокой [119, 159, 234].

Схема использования UNG-протокола в коммерческих тест-системах различается. UNG-протокол может быть инкорпорирован как обязательный этап исследования, в других случаях его выполнение опционально и рекомендуется только при выявленной контаминации [119, 173]. И здесь вместо дТТФ также используется дУТФ, но урацил-N-гликозилаза добавляется лишь при условии наступления контаминации [119, 173]. Однако не следует думать, что использование UNG-протокола делает возможным продолжение работы в условиях контаминации ампликонами. Это создает потенциальный риск ложноположительных результатов, потому что применение UNG-протокола (как уже указывалось чуть выше) не гарантирует полной деструкции ампликонов [166, 194], тем более если речь идет о высококопийной контаминации [65, 159]. Именно поэтому при выявленной контаминации необходимо как можно раньше провести деконтаминационные

мероприятия, выявить причины ее возникновения и выработать меры по предупреждению повторения случившегося [33].

В условиях применения in tube-систем, тем более при использовании UNG-протокола, когда контаминация ампликонами становится маловероятной, на первый план выступает антеградная контаминация, где в качестве контаминанты выступает нативная НК [104]. UNG-гидролиз в этом случае принципиально невозможен [159]. Причины антеградной контаминации, как правило, обусловлены погрешностями при ручном выполнении ПЦР-исследования начиная с этапов выделения НК [74, 104]. Именно поэтому **другим шагом на пути к усовершенствованию метода ПЦР стала автоматизация его этапов** [174], которая даже при использовании ex tube-систем детекции весьма эффективна, что выражается в шестикратном (с 19 до 3,1%) снижении серий постановок, сопровождающихся контаминацией и в общем 68-кратном снижении количества ложноположительных результатов [226]. При полной автоматизации real-time ПЦР доля серий исследований с зафиксированной контаминацией составила от 0,56 до 1,8% [104]. По другим данным, при автоматизации только лишь процедуры экстракции нуклеиновых кислот частота ложноположительных результатов сокращается до 0,25% (1/400) [115].

На сегодняшний день автоматизация ПЦР позволяет существенно сократить производственные площади лаборатории и устранить вопрос дефицита кадров. С помощью некоторых конструктивных особенностей роботизированных платформ весь цикл ПЦР-исследования от момента выделения НК до момента получения результата выполняется без вмешательства персонала и фактически занимает пределы единой зоны [52]. «Линейка» автоматизированных платформ расширяется, и выбора становится все больше [179]. Есть большая надежда на то, что в скором будущем полностью автоматизированные системы для выполнения ПЦР-исследований станут недорогими и доступными для большинства лабораторий [79].

Общей тенденцией производителей реагентов является стремление максимально сократить количество этапов ПЦР-исследования, при выполнении которых необходимо открывать пробирки. Это связано в том числе с тем, что каждый дополнительный этап увеличивает риск контаминации [65]. Ярким примером служит обратная транскрипция. Если она производится как отдельный этап, а затем полученная кДНК вносится в амплификационную смесь, то создается дополнительный риск контаминации [159]. В этой связи современные тест-системы предусматривают выполнение обратной транскрипции и амплификации в рамках объединенной амплификационной смеси как неделимого этапа,

что получило название one step reverse transcription-PCR (RT-PCR) [120, 151]. К тому же one step RT-PCR имеет меньший предел обнаружения, более широкий диапазон линейности и хорошо поддается автоматизации [120].

Необычным приемом профилактики контаминации является ограничение количества исследуемых образцов (речь идет о высококопийных пробах) до 12 в постановке [53]. Не менее интересный способ профилактики контаминации заключается в ограничении количества циклов амплификации, что позволяет добиться отсутствия ложноположительных результатов [65]. Однако я считаю, что в практическом здравоохранении его использовать нельзя, поскольку этот способ не защищает от контаминации, а лишь скрывает ее.

2.3. СРЕДСТВА ВИЗУАЛИЗАЦИИ КОНТАМИНАЦИИ

Мероприятия, направленные на предупреждение контаминации, не могут гарантировать отсутствие возможности ее наступления. Именно поэтому **персонал лаборатории должен быть способен своевременно отличить истинно положительные результаты от ложных, а также определить причину и механизм возникшей контаминации.** Комплекс мер, направленных на это, и является системой визуализации контаминации. Однако в данном подразделе речь пойдет лишь о том, с помощью каких средств можно ее осуществить. Сам алгоритм расследования контаминации рассмотрен в подразделе 2.4.

Иногда выявить контаминацию не так уж и сложно. Так, при обнаружении цНК в отрицательном контрольном образце (ОКО) факт контаминации становится очевиден. На основании обнаружения цНК в отрицательном контрольном образце необходимо предположить, что в данной серии исследований не только ОКО, но и биопробы подверглись контаминации. Дифференцировать, какие из проб действительно оказались контаминированными, возможно лишь после выполнения их повторного тестирования, но предварительно убедившись, что повторный риск контаминации при этом минимален. Иначе при повторном исследовании биообразец вновь окажется контаминированным.

В то же время отсутствие положительного результата при исследовании ОКО еще не является гарантией отсутствия контаминации биопроб в данной аналитической серии. Среди всех проб контаминированы могут быть несколько или вообще только лишь один образец. В этом случае исследователь сталкивается с куда более сложной задачей, ведь теперь ему необходимо заподозрить ложные результаты среди