DOI: <https://doi.org/10.32353/khrife.1.2019.039>

УДК 573.6

С. О. Зюбрий,

старший судебный эксперт Харьковского НИЕКЦ МВД Украины,

м. Харків, Україна,

e-mail: sonya.zubybrij@gmail.com

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ДЕКОНТАМИНАЦИОННЫХ СРЕДСТВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ СУДЕБНОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Статья посвящена сравнению эффективности работы дезинфицирующих средств при различной концентрации контаминирующего агента. Контаминация объектов может происходить на любой стадии проведения исследования, поэтому для ее предотвращения необходимо использовать эффективные деконтаминирующие методы, которые в то же время должны быть безопасны для персонала лаборатории. Целью работы является проверка эффективности дезинфицирующих средств при работе в биологических лабораториях и определение их воздействия на генетическую информацию клетки, влияния на ингибцию реакции ПЦР и деградацию ДНК.

Ключевые слова: деконтаминирующие средства; ДНК; ингибция; ПЦР; эффективность.

Постановка научной проблемы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была разработана для выявления патогенных микроорганизмов у клинических образцах, что произвело революцию в диагностических подходах во многих областях.

Методика ПЦР дает возможность обнаружить дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) в количестве менее 100 пг, например, при амплификации ДНК с низким числом копий (LCN) или типировании митохондриальной ДНК. Чувствительность данной методики предполагает идеальную стерильность лабораторных комнат, оборудования, расходного материала и растворов¹, поэтому методы, позволяющие избежать контаминации, особенно важны.

Как правило, загрязнение расходных материалов происходит на низких уровнях и не будет обнаружено в образце с достаточным количеством ДНК. В образцах с небольшим количеством ДНК, наоборот, может быть трудно провести различие между профилем образца и профилем загрязняющих веществ. Лаборатории для скрининга чистоты реактивов и мониторинга возможного загрязнения во время проведения методик, образца используют отрицательный контроль при выделении и амплификации ДНК.

¹ *Tamariz J. and other. The Application of Ultraviolet Irradiation to Exogenous Sources of DNA in Plasticware and Water for the Amplification of Low Copy Number DNA. Journal of Forensic Sciences. 2006. Vol. 51, № 4. P. 790–794.*

Каждый образец, предметы и оборудование лаборатории являются потенциальными источниками загрязняющей ДНК, кроме того, во время работы большое количество копий ДНК существует в воздухе и на поверхностях объектов в лаборатории. Различные источники загрязнения требуют разных методов обеззараживания. Контаминация образцов и поверхностей может происходить на любом из этапов работы:

- предлабораторном (заражение объекта собственной ДНК сотрудников, производящих отбор объектов на месте преступления). Предотвратить такой вид контаминации эксперты, работающие в ДНК-лаборатории, не могут;

- лабораторном (за счет нарушения зонирования помещений, переноса оборудования и дозаторов между помещениями, пренебрежения использованием и сменой защитной одежды: одноразовых перчаток, масок, медицинских шапочек и лабораторной одежды).

Лабораторное загрязнение имеет четыре основных источника:

- загрязнение человеческой ДНК из окружающей среды: возникает при игнорировании экспертами-биологами, наблюдателями либо обслуживающими сотрудниками норм использования средств индивидуальной защиты в лабораторных помещениях или переносе предметов и оборудования между зонами лаборатории, без их предварительной очистки;

- перекрестная контаминация: неумышленное загрязнение одного объекта ДНК-материалом другого объекта за счет небрежного использования оборудования, проведения методик;

- загрязнение реагентов ПЦР и наборов для экстракции ДНК: возникает при отсутствии стерильности реагентов, при приготовлении растворов, использовании нестерильного расходного материала или за счет небрежного обращения с объектами исследования;

- загрязнение продуктами амплификации: перенесение амплифицированной ДНК в объект, который не прошел амплификацию. Ампликоны это один из наиболее распространенных источников загрязнения, поскольку они могут быть гомологичными целевым молекулам и амплифицироваться с более высокой эффективностью, нежели сам объект исследования. Источниками такого вида загрязнения являются дозаторы, лабораторные столы и оборудование и даже поверхность рук эксперта.

Загрязнение лабораторных поверхностей и приборов может происходить на любой стадии проведения исследования, этого можно избежать, обеспечив чистоту помещений и используя методы дезактивации ДНК.

Научной проблемой является поиск эффективных методов дезактивации ДНК, которые могли бы применяться в условиях медицинских учреждений, были безопасны для персонала, который их использует.

В последние годы для решения этой проблемы были разработаны различные методы дезактивации ДНК, включая, использование

ультрафіолетового или γ -облучения, гидроксилламин гидрохлорида или моноазида этидия, обработку экзонуклеазой III или эндонуклеазами (например, ДНКазой I или рестрикционными ферментами), а также автоклавирование и дезактивация газогенератором на основе радикалов. Наиболее доступными и дешевыми методами дезактивации, применимыми в ПЦР лабораториях, являются окислительные реагенты и УФ-облучение¹.

Анализ основных последних исследований. Исследования по данной теме, проведенные такими учеными, как Y. Wu, J. Wu, Z. Zhang, Cheng², Setlow, Parish, P. Zhang², были сосредоточены на определении влияния методов дезинфекции (ультрафиолетового излучения, высокой температуры, 75 % этилового спирта и гидрохлорида натрия) на определенные виды патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *HBV*, *Entamoeba histolytica*) и их спор, которые в медицинских лабораториях могут приводить к появлению ложноположительных результатов анализов. Исследователи Gefrides, Powell, Donley, Kahn³, определяли эффективность автоклавирования и ультрафиолетового облучения как методов очистки расходных материалов от загрязнения человеческой ДНК. Представленные работы охватывают ограниченное количество методов дезинфекции, которые используются в медицинских и биологических лабораториях, и не описывают влияния деконтаминирующих средств на загрязнение лабораторных поверхностей человеческой ДНК.

Исходя из данной проблемы и на основании данных о физико-химических и биологических свойствах дезинфицирующих средств, используемых в биологических лабораториях, возникло предположение о проверке эффективности данных средств при работе в биологических лабораториях и воздействии их на генетическую информацию клетки.

Цель исследования: выяснение по литературным данным механизмов действия средств деконтаминации, проверка эффективности дезинфекции ДНК-загрязнений выбранными физическими и химическими методами, влияние дезинфицирующих средств на ингибацию реакции ПЦР и деградацию ДНК.

Изложение основного материала исследования. Анализ литературных источников показал, что выбранные для исследования механизмы деконтаминации имеют государственную регистрацию в

¹ Wu Y. and other. DNA decontamination methods for internal quality management in clinical PCR laboratories. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2017. Vol. 32. № 3.

² Setlow B. and other. Mechanism of killing of spores of *Bacillus anthracis* in a high-temperature gas environment, and analysis of DNA damage generated by various decontamination treatments of spores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 2014. Vol. 116. P. 805–814.

³ Gefrides L. A. and other. UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. *Forensic Science International: Genetics*. 2010. Vol. 4. № 2. P. 89–94.

Украине, методические указания по использованию, утвержденные Государственной санитарно-эпидемиологической службой, используются в других лабораториях, в том числе и международных. Представленные деконтаминационные средства имеют различные механизмы действия на клетку и ДНК. Охарактеризуем их по механизму действия и основным действующим веществам:

1. Химические методы:

А) спиртосодержащие препараты:

— 70% и 96 % этиловые спирты имеют один и тот же механизм действия на клетку — при взаимодействии с поверхностью клетки, вызывают ее дегидратацию и денатурацию белков. Антисептический эффект водного раствора спирта имеет зависимость концентрации, так препараты с содержанием этилового спирта менее чем 50 % не обладают выраженным антисептическим эффектом, но с увеличением концентрации спирта растет и его способность к коагуляции белков клетки. Антисептическая способность абсолютного спирта резко падает, так как быстрое коагулирование мембранных белков клетки, не дает концентрированному спирту проникнуть в клетку и разрушить ее внутреннее содержимое.

— Винсепт экспресс. Основным действующим веществом является 65–70 % этиловый спирт. Механизмом действия этанола является денатурация и коагуляция белков, растворение липидов. Гидроксильная группа, которая имеется в структуре спиртов, связывается с белками клеточной стенки посредством водородной связи, нарушает их структуру и функционирование, что приводит к выпадению белков в осадок. Кроме того, гидроксил-ионы омыляют липиды в мембране, приводя к разрушению поверхностной структуры клетки.

— Бациллол АФ. Основные действующие вещества: 1–пропанол 45 % и 2–пропанол 25 %, вызывают дегидратацию клетки и денатурацию белков, что приводит к разрушению структуры клеточной стенки и клеточной мембраны, высвобождению внутриклеточных компонентов, что в конечном итоге приводит к потере функциональности клетки¹.

Б) Хлорсодержащие препараты:

— Дезактин 0,2 %. Основными действующими веществами являются: хлористый натрий, 1, 3–дихлор–5, 5–диметилгидантоил. Соединения хлора имеют множественное действие на клетку, среди них: хлорирование аминокислот; окисление пептидных связей в белках и их последующая денатурация²; уменьшение поглощения питательных веществ и кислорода; ингибирование синтеза белка; снижение производства аденозинтрифосфата за счет утечки K⁺ и нарушения

¹ Sang Su Kim and other. Comparison of disinfective power according to application order of 70% isopropyl alcohol and 10% povidone-iodine. *Korean J Anesthesiol.* 2013. Vol. 65. P. 519–524.

² Maris P. Modes of action of disinfectants. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1995. Vol. 14. № 1. P. 47–55.

работы на Na^+/K^+ насоса; одно- и двухпочечные разрывы в ДНК и подавление синтеза ДНК; нарушение системы SOS-репарации ДНК¹.

— WIP'ANIOS Premium. Основными действующими веществами являются: дидецилдиметиламмония хлорид, полигексаметиленбигуанид гидрохлорид. WIP'ANIOS Premium соединяет в себе дезинфицирующие свойства хлоридов и соединений аммония. Соединение хлора вызывают инактивацию производящих энергию ферментов, денатурацию основных клеточных белков и разрушение клеточной мембраны. Соединения аммония, со своей стороны, приводят к нарушению межмолекулярных взаимодействий и диссоциации липидных бислоев; снижению интенсивности транспорта электронов и снижению эффективности работы системы фосфорилирования; денатурации белков; быстрому повышению проницаемости клеточных мембран и их разрушению, с последующей утечкой внутриклеточных компонентов. WIP'ANIOS Premium имеет длительное действие, так как осаждается в виде микроскопически тонкой пленки на предметах и поверхностях, при длительном контакте с клетками биоцид вызывает их автолиз².

В) Препарат с сульфатом меди

— DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions. Основные действующие вещества данного препарата являются коммерческой тайной. По данным протокола использования спреи содержат ионы металлов, среди которых имеется сульфат меди (II), способный катализировать перекисное окисление мембранных липидов, используя активные формы кислорода в клетке; окислять липопротеины низкой плотности; подвергать окислению основания через свободные радикалы кислорода; индуцировать разрывы в нитях ДНК за счет ассоциации ионов металлов с различными областями двойной спирали и связывания с отдельными нуклеотидами³. Ионы меди также вступают в реакцию с перекисью водорода с образованием свободных гидроксильных радикалов, которые инициируют цепную реакцию перекисного окисления, повреждающую молекулу ДНК⁴.

2. Физические методы:

А) Ультрафиолетовое излучение в спектральном диапазоне 205—315 нм. Ультрафиолетовое излучение инактивирует функциональную

¹ Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2016. URL : <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html> (дата звернення 10.06.2019).

² Ioannou, C. J., Hanlon, G. W., Denyer, S. P. Action of Disinfectant Quaternary Ammonium Compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006. Vol. 51. № 1. P. 296–306.

³ DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions. *Thermo Fisher Scientific*. 2017. URL : https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/9890M_DNAZapSolutions_PI.pdf (дата звернення 10.06.2019).

⁴ Georgieva S., Popov B., Petrov V. Genotoxic effects of copper sulfate in rabbits. *Archives of Biological Sciences*. 2013. Vol. 65. № 3. P. 963–967.

активность белков за счет деструкции азотистых оснований в активном центре белка; вызывает фотоокисление липидов, с образованием свободных радикалов и гидроперекисей; приводит к образованию димеров между пиримидиновыми основаниями в ДНК и нарушает реакцию транскрипции и репликации нуклеиновых кислот¹. Кроме того, фотоповреждения ультрафиолетом вызывают подавление синтеза аденозинтрифосфата, повышение проницаемости мембран, потерю активности биологически активных веществ².

Б) Обработка спиртом с последующим прожариванием у пламени горелки. Метод применим только для инструментов из металла. Он объединяет в себе преимущества обеззараживания спиртом, который вызывает дегидратацию клетки и денатурацию ее белков, полное обезвоживание клетки за счет горения спиртового раствора. Удаление водной составляющей клетки, при прокаливании в пламени, приводит к увеличению концентрации солей и минералов, которые нарушают метаболические функции клетки и обуславливают ее гибель. Кроме того, тепло денатурирует белки, провоцирует окислительное повреждение клетки за счет действия свободных радикалов и приводит к «сжиганию» всего поверхностного биоматериала на предметах.

В) Бидистиллированная деионизированная вода. Дистиллированная вода является гипотоническим раствором, поэтому происходит набухание клетки, а затем цитоллиз, во время которого собственные лизосомальные ферменты клетки растворяют внутреннее содержимое клетки.

Объекты исследования

В ходе исследования были испытаны семь растворов для деконтаминации, используемые в лаборатории (Винсепт экспресс, Бациллол АФ, Дезактин 0,2 %, WIP'ANIOS Premium, DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions, 70 % этиловый спирт, 96 % этиловый спирт), физические методы деконтаминации (ультрафиолетовое излучение, обработка спиртом с последующим прожариванием у пламени горелки) и бидистиллированная деионизированная вода. Контаминирующий раствор представлен синтетической геномной ДНК фирмы Promega, концентрацией 50 нг/мкл. ДНК, которая для проведения исследования, была приведена к концентрациям: 1 нг/мкл, 3 нг/мкл, и для ее разведения использовалась бидистиллированная деионизированная вода.

В исследовании применялось два контроля:

— негативный — предметное стекло, на которое не наносилась контрольная ДНК, является показателем чистоты используемых в исследовании стекол;

¹ Mark W LeChevallier, Kwok-Keung Au. Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water. *World Health Organization*. 2004. P. 41 — 66

² Действие ультрафиолетового излучения на микроорганизмы и бактерию *BioFile*. URL : <http://biofile.ru/bio/4193.html> (дата звернения 20.06.2019).

— положительный — предметное стекло, на которое наносилась выбранная концентрация ДНК, но которое не подвергалось воздействию дезинфицирующих средств, является показателем эффективности отбора проб¹.

Для обеспечения чистоты эксперимента и во избежание перекрестного загрязнения проводился слепой метод эксперимента, преднамеренное загрязнение стекол и отбор проб были разделены во времени. Во время всех процедур исследовательский персонал носил соответствующее защитное оборудование (нитриловые перчатки, маска, халат и головной убор), ватные тампоны и 1,5 мл пробирки, используемые для смывов, были предварительно продезинфицированы в соответствии с техническими рекомендациями по работе в лаборатории². Нитриловые перчатки систематически заменялись между последовательными сеансами нанесения и отбора проб. Проба с контрольной ДНК, разведенной до необходимой концентрации, во время работы систематически перемешивалась на центрифуге-вортексе Biosan FV-2400.

Технология проведения эксперимента

Для проведения исследования использовались предметные стекла для микроскопирования (далее — стекла), которые предварительно были опущены на 24 часа в дезинфицирующий раствор, очищены моющим средством и деионизированной бидистиллированной водой, обработаны 70 % спиртовым раствором. После этапа очищения стекла помещали для естественной сушки в ламинарный бокс.

На следующем этапе исследования стекла загрязнялись путем нанесения, с использованием дозаторов и одноразовых наконечников, 3 мкл раствора с выбранной концентрацией ДНК в центральную область каждого стекла. Материал механически, с использованием наконечника, распределялся тонким слоем по поверхности предметного стекла. Далее загрязненные стекла оставляли до полного высыхания при комнатной температуре, без прямого попадания солнечного света.

Готовые загрязненные стекла были разделены на группы, а именно, по три стекла для каждого дезинфицирующего раствора и физического метода дезинфекции. Таким образом все дезинфицирующие агенты испытывались у трех параллельных повторах (для оценки воспроизводимости результатов).

¹ Adé A and other. Comparison of Decontamination Efficacy of Cleaning Solutions on a Biological Safety Cabinet Workbench Contaminated by Cyclophosphamide. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*. 2017. Vol. 70. № 6. P. 407–414.

² Державні санітарні норми і правила : наказ Міністерства охорони здоров'я України від 24.01.2008 № 26. *Офіційний вісник України*. 2008. № 11. Ст. 274.

Дальнейшие этапы по обеззараживанию стекол зависели от выбранного метода дезинфекции. Группу стекол выбранных для исследования:

- ультрафиолетового излучения помещали в ламинарный бокс (расстояние от ламп до объектов составляло 45 см) и облучали в течении 30 минут;

- химических дезинфицирующих растворов, 70 % и 96 % этиловых спиртов и бидистиллированной деионизированной воды обрабатывали растворами с использованием метода смылов. Смывы производились тремя «вытирающими» движениями, для каждого стекла, с использованием ватных тампонов, пропитанных дезинфицирующими реагентами;

- 70 % спирта с последующим прожиганием исследовали методом смылов и прожигания всей поверхности стекла спиртовой горелкой.

Степень эффективности очистки стекол деконтаминирующими агентами определяли методом смыва проб, с помощью ватного тампона, пять раз «вытирающими» движениями для каждого тестируемого стекла.

Для измерения остаточного количества ДНК, в начале, производилось выделение ДНК из тампонов-смылов с использованием ионообменной смолы Chelex. В пробирки с объектами добавляли по 200 мкл 5% Chelex (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), инкубировали при 56°C в течении 30 минут, далее пробирки встряхивали на центрифуге-вортексе и инкубировали на водяной бане 8 минут, повторяли этап вортексирования, и затем центрифугировали на максимальной скорости 5 минут¹. Надосадочную жидкость, с выделенной ДНК, из каждой пробы переносили в новую чистую пробирку и проводили реакцию ПЦР в реальном времени с использованием набора «PowerQuant™ System фирмы Promega. Результатом проведения ПЦР в реальном времени является количественное определение общей (аутосомной) ДНК, степень деградации и ингибиции ДНК на представленных смывах.

Значения *Ct* (пороговое значение цикла) и значения эффективности амплификации рассчитывали с использованием программного обеспечения Real Time PCR System 7500 версии v2.0 (Applied Biosystems, Life Technology, ThermoFisher Scientific), предоставленного производителем.

Статистический анализ и результаты исследования

Для проверки значимости полученных данных было выдвинуто две гипотезы:

¹ Аббасов Р. Г., Повх А. С., Романчук С. М. Методика проведения молекулярно-генетичних досліджень : метод. рекомендації. Київ : ДНДЕКЦ МВС України, 2018. 75 с.

H_0 — между средними значениями концентрации загрязняющего агента до и после применения деконтаминирующего средства различий нет. Деконтаминирующее средство не работает.

H_1 — между средними значениями концентрации загрязняющего агента до и после применения деконтаминирующего средства различия есть. Деконтаминирующее средство работает.

Результаты расчета статистических показателей приведены в таблице ниже. Так как мы имеем две связанные выборки, которые отвечают нормальному распределению, то для статистических расчетов исследования мы будем использовать парный t-критерий Стьюдента. Также рассчитаны центральные характеристики представленного ряда результатов: среднее арифметическое ($\bar{x}$), доверительный интервал средней арифметической ($ДИ$), стандартное отклонение (SD)¹. И отдельный показатель — эффективность дезактивации (DE), рассчитан для каждого моющего раствора, как измеренная концентрация контаминирующего агента после обработки к начальной концентрации агента.

Абсолютные значения (модули) критерия Стьюдента сравнивались с табличным значением показателя, при числе степеней свободы, равным $df = N - 1 = 5$, и уровне значимости равному 0,05. Двусторонний критерий Стьюдента для данного значения степени свободы равен 2,57. Показатели критерия Стьюдента в исследовании составляют от 4,422 до 4,473, что превышает критическое табличное значение показателя. Таким образом, для всех представленных дезинфицирующих растворов и методов, мы можем отвергнуть поставленную нулевую гипотезу и принять альтернативную гипотезу, с утверждением о статистически значимой разнице в концентрации загрязняющего вещества до и после проведения дезинфицирующих мероприятий.

Таблица 1

**Статистические характеристики эффективности работы
деконтаминирующих средств**

Методы / Показатели	$\bar{x} \pm ДИ$	SD	T	$DE, \%$
Бациллол АФ	0, 0038 $\pm$ 0, 0033	0, 0031	- 4, 470	99, 998
Дезактин 0, 2 %	0, 0020 $\pm$ 0, 0018	0, 0017	- 4, 472	99, 999
Бидистиллированная вода	0, 0003 $\pm$ 0, 0005	0, 0005	- 4, 473	100, 000
70 % этиловый спирт	0, 0025 $\pm$ 0, 0014	0, 0014	- 4, 470	99, 999
96 % этиловый спирт	0, 0213 $\pm$ 0, 0234	0, 0223	- 4, 422	99, 986
70 % спирт и прожаривание	0, 0035 $\pm$ 0, 0036	0, 0034	- 4, 472	99, 998
УФ излучение	0, 0198 $\pm$ 0, 0063	0, 0060	- 4, 442	99, 988
Винсепт экспресс	0, 0028 $\pm$ 0, 0019	0, 0018	- 4, 473	99, 998
WIP'ANIOS Premium	0, 0015 $\pm$ 0, 0018	0, 0018	- 4, 473	99, 999
DNAZap	0, 0003 $\pm$ 0, 0009	0, 0008	- 4, 470	100, 000

¹ Атраментова Л. А. Дизайн и статистика биологического исследования. Харьков : Издательство «НТМТ», 2015. 269 с.

Примечание: $\bar{x}$ — среднее арифметическое значение, DI — 95 % доверительный интервал, SD — стандартное отклонение, T — парный критерий Стьюдента, DE — эффективность дезактивации.

Результаты и обсуждение

Данная работа, проведенная на базе отдела биологических исследований и учета Харьковского НИЕКЦ МВД Украины, представляет собой пилотное исследование изучения эффективности работы средств деконтаминации при различных концентрациях контаминирующего агента.

Результаты количественного анализа показали, что самая высокая наблюдаемая концентрация после проведения очистки составляла 0,061 нг (при обработке 96 % спиртом), а самая низкая наблюдаемая концентрация — полное отсутствие ДНК (при обработке дезактином, бидистиллированной деионизированной водой, WIP'ANIOS Premium, DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions).

Не обнаружение загрязняющего вещества не обязательно означает, что все молекулы ДНК были полностью удалены. Малое количество могло остаться на поверхности стекла, но не было измерено, так как концентрация была ниже предела обнаружения.

Винсепт экспресс, Бациллол АФ, Дезактин 0,2 %, WIP'ANIOS Premium, DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions, 70 % этиловый спирт, обработка спиртом с последующим прожариванием у пламени горелки и бидистиллированная деионизированная вода одинаково эффективно удаляли контрольную ДНК с концентрацией 1 нг/мкл и 3 нг/мкл, причем эффективность этих дезинфицирующих средств составляла 99,9 % уже после первого сеанса очистки поверхностей.

Наивысшую 100,0 % эффективность деконтаминации показали — DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions и бидистиллированная деионизированная вода. Впрочем, основное действие бидистиллированной деионизированной воды основано на смыве ДНК со стекла, а не его полном разрушении, как это характерно при использовании DNAZap, поэтому обязательно после проведения деконтаминации расходные материалы (салфетки, марля), которыми проводились смывы, необходимо утилизировать как медицинские отходы. Как показало исследование, бидистиллированная деионизированная вода также может полноценно использоваться в биологической лаборатории, как дезинфицирующий раствор, наравне с другими химическими растворами физическими методами.

Для 96 % этилового спирта и ультрафиолетового излучения показатель эффективности составлял 99,98 %, данные методы работают менее эффективно, нежели остальные, и после обработки присутствует остаточная концентрация ДНК, которая может загрязнять пробы и приводить к недостоверным результатам генетического анализа. Свойство 96 % спирта мгновенно коагулировать белки клетки уменьшает его способность проникать внутрь клетки и нарушать ее работу, что

объясняет полученные результаты. На практике это может негативно отразиться, например, в случае загрязнения многослойным или многоклеточным контаминирующим агентом. Облучение ультрафиолетом также имеет ряд особенностей использования, которые, в реальных условиях, негативно влияют на его эффективность: влажность в помещении выше 70 %, накопление пыли (грязи) на поверхностях, большие расстояния от поверхностей до лампы накаливания, материал из которого изготовлен объект (пористые и непрозрачные материалы не эффективно дезинфицировать излучением)¹. Принимая во внимание эти негативные особенности, экспериментальный уровень эффективности дезинфекции, доступность и распространённость данных методов обработки, можно сказать, что данные методы можно использовать как самостоятельные деконтаминационные средства, но для полного удаления загрязняющих веществ рекомендуется предварительно, как первый этап, проводить обработку 96 % спиртом или ультрафиолетовым излучением, и как окончательный этап — использовать одно из других представленных средств.

Также при проведении количественного анализа оценивались пороговый цикл внутреннего позитивного контроля (*IPC Ct*) и уровень деградации ДНК. Показатели порогового цикла *IPC Ct* для всех проб соответствовал необходимому, по протоколу производителя, циклу выхода внутреннего контроля, значит использование данных деконтаминирующих веществ не вызывает ингибицию ПЦР-реакции.

Индекс деградации ДНК, после обработки, для большинства деконтаминирующих веществ, составлял < 2,0, что соответствует слабому уровню фрагментации ДНК. Однако исключение составляли образцы, обработанные ультрафиолетовым излучением, уровень деградации для них составлял от 3,0 до 5,5, что соответствует среднему уровню деградации образца и значит, что облучение лучше разрушает длинные цепи ДНК и оставляет неразрушенными фрагменты ДНК длиной меньше 200 п.н., что, по литературным данным, характерно для данного облучения².

Таким образом, все методы дезинфекции значительно уменьшали загрязнение поверхностей стекол, которые подвергались воздействию определенного количества ДНК. Кроме того, при изменении концентрации загрязняющих веществ не было заметно разницы в эффективности работы дезинфекторов, это означает, что концентрация ДНК не влияет на результативность работы деконтаминирующих веществ и все представленные методы обработки можно полноценно использовать в биологических лабораториях.

Выводы

1. Наивысшая наблюдаемая концентрация после проведения очистки составляла 0,061 нг (при обработке 96 % спиртом), а самая

¹ *Burgener, J.* Position paper on the use of ultraviolet lights in biological safety cabinets. *Applied Biosafety*. 2006. Vol. 11. № 4. P. 228–230.

низкая наблюдаемая концентрация — полное отсутствие ДНК (при обработке дезактином, бидистиллированной деионизированной водой, WIP'ANIOS Premium, DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions).

2. Наивысшую 100,0 % эффективность деконтаминации показали — DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions и бидистиллированная деионизированная вода.

Эффективность деконтаминации с использованием Винсепт экспресс, Бациллол АФ, Дезактин 0,2 %, WIP'ANIOS Premium, 70 % этиловый спирт, обработка спиртом с последующим прожариванием у пламени горелки составляла 99,99 %.

Для 96 % этилового спирта и ультрафиолетового излучения показатель эффективности деконтаминации составлял 99,98 %.

3. Представленные деконтаминирующие средства не вызывают ингибицию ПЦР-реакции.

4. Индекс деградации ДНК для большинства деконтаминирующих веществ, составлял < 2,0, но для образцов обработанных ультрафиолетовым излучением, уровень деградации составлял от 3,0 до 5,5.

5. Высокая концентрация ДНК не влияет на результативность работы представленных деконтаминирующих веществ. Однако влияние деконтаминирующих агентов на следовые концентрации и деградированную ДНК может отличаться. Данная проблема является целью для будущих исследований.

6. Сравнительная характеристика представленных методов обработки показала различие в механизмах действия деконтаминирующих агентов на человеческую ДНК и высокую эффективность их работы, что позволяет применять выбранные методы в биологических лабораториях.

References

- Abbasov, R. H., Povkh, A. S., Romanchuk, S. M. (2018). *Metodyka provedennia molekuliarno-henetychnykh doslidzhen: metodicheskie rekomendacii*. Kyiv: DNDEKTs MVS Ukrainy [in Ukrainian].
- Adé, A. and others (2017). Comparison of Decontamination Efficacy of Cleaning Solutions on a Biological Safety Cabinet Workbench Contaminated by Cyclophosphamide' 70 (6) *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*. [in English].
- Atramentova, L.A. (2015). *Dizain i statistika biologicheskogo issledovaniia*. Kharkov: Izdatelstvo «NTMT» [in Russian].
- Burgener, J. (2006). Position paper on the use of ultraviolet lights in biological safety cabinets' 11 (4) *Applied Biosafety*. [in English].
- Deistvie ultrafiolietovogo izlucheniia Na mikroorganizmy i bakterii. URL: <http://biofile.ru/bio/4193.html> (data zvernennia 20 June 2019) [in Russian].
- Derzhavni sanitarni Normy i pravyla : Nakaz Ministerstva okhorony zdorovia Ukrainy vid 24.01.2008 № 26 (2008) Ofitsiyni visnyk Ukrainy [in Ukrainian].
- DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions (Thermo Fisher Scientific, 2017). URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG /manuals/9890M_ DNAZap Solutions_PI.pdf (data zvernennia 19 June 2019) [in English].

- Gefrides, L. A. and others (2010). UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. 4(2) *Forensic Science International: Genetics* [in English].
- Georgieva, S., Popov, B., Petrov, V. (2013). Genotoxic effects of copper sulfate in rabbits. 65(3) *Archives of Biological Sciences*. DOI: 10.2298/abs1303963g [in English].
- Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities* (Centers for Disease Control and Prevention, 2016) URL: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html> (data zvernennia 19 June 2019) [in English].
- Ioannou, C. J., Hanlon, G. W., Denyer, S. P (2006). Action of Disinfectant Quaternary Ammonium Compounds against *Staphylococcus aureus*. 51(1). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [in English].
- Maris, P. (1995). Modes of action of disinfectants. 14 (1) *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* [in English].
- Mark, W. LeChevallier, Kwok-Keung, Au Water (2004). *Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water*. London: IWA Publishing, 41—66 [in English].
- Sang, Su Kim and others (2013). Comparison of disinfective power according to application order of 70% isopropyl alcohol and 10% povidone-iodine 65 *Korean J Anesthesiol.* [in English].
- Setlow, B. and others (2014). Mechanism of killing of spores of *Bacillus anthracis* in a high-temperature gas environment, and analysis of DNA damage generated by various decontamination treatments of spores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* 116. *Journal of Applied Microbiology.* [in English].
- Tamariz, J. and others (2006). The Application of Ultraviolet Irradiation to Exogenous Sources of DNA in Plasticware and Water for the Amplification of Low Copy Number DNA 51 (4) *Journal of Forensic Sciences.* [in English].
- Wu Y. and others (2017). DNA decontamination methods for internal quality management in clinical PCR laboratories' 32 (3) *Journal of clinical laboratory analysis* [in English].

С. О. Зюбрий

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕФЕКТИВНОСТІ ДЕЯКИХ
ДЕКОНТАМІНУЮЧИХ ЗАСОБІВ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ПРИ
ПРОВЕДЕННІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ЕКСПЕРТИЗ**

Стаття присвячена порівнянню ефективності роботи дезінфікуючих засобів при різній концентрації контамінуючого агента. Контамінація об'єктів дослідження може відбуватися на будь-якій стадії проведення дослідження, тому для її попередження необхідно використовувати ефективні деконтамінуючі методи, які в той же час повинні бути безпечні для персоналу лабораторії. Метою роботи є перевірка ефективності дезінфікуючих засобів при роботі в біологічних лабораторіях та визначення впливу їх на генетичну інформацію клітини, інгібіцію реакції ПЛР і деградацію ДНК. Проаналізовано механізми впливу на клітини і ДНК хімічних розчинів: Вінсепт експрес, Баціллол АФ, Дезактін 0,2%, WIP'ANIOS Premium, DNAzap™ PCR DNA Degradation Solutions, 70% і 96% етилових спиртів, і фізичних методів: ультрафіолетового випромінювання, обробки спиртом з подальшим прожарювання в полум'ї пальника, і обробки бідистильованою деіонізованою водою. При проведенні дослідження контамінуюча ДНК була представлена синтетичною геномною

ДНК фірми «Promega». В результаті пілотного дослідження найвищу ефективність деконтамінації мали DNAzap™ PCR DNA Degradation Solutions і бідистильована деіонізована вода. Бідистильована деіонізована вода може повноцінно використовуватись в лабораторії в разі дотримання норм утилізації медичних відходів. Інші методи показали ефективність більше 99,98%, що також дозволяє використовувати їх при роботі в біологічній лабораторії, дотримуючись запропонованих рекомендацій. Представлені дезінфікуючі речовини не викликали інгібіцію реакції ПЛР. ДНК, що збереглася після обробки деконтамінуючими речовинами, для більшості деконтамінуючих агентів мала низький рівень деградації. Після обробки ультрафіолетовим випромінюванням рівень деградації ДНК був середнім, це означає, що ультрафіолетове випромінювання краще руйнує довгі ланцюги ДНК, залишаючи незруйнованими ланцюги до 200 п.н. Крім того, збільшення концентрації контамінуючої ДНК не вплинуло на зміну ефективності роботи деконтамінуючих засобів. Всі проаналізовані деконтамінуючі агенти можна застосовувати в молекулярно-генетичних лабораторіях.

Ключові слова: деконтамінуючі засоби, ДНК, інгібіція, ПЛР, ефективність.

S. Ziubrii

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF EFFECTIVENESS OF SOME DECONTAMINATION FACILITIES USED FOR CARRYING OUT OF FORENSIC MOLECULAR GENETIC EXAMINATION

The article is devoted to comparing the performance of disinfectants at different concentrations of a contaminating agent. Contamination of objects can occur at any stage of the study, so effective methods of decontamination should be used to prevent it, which at the same time should be safe for laboratory staff. The purpose of the work is to check the effectiveness of disinfectants while working in biological laboratories and to determine their effects on the genetic information of the cell, the effect on the inhibition of PCR reaction and DNA degradation. The mechanisms of influence on a cell and DNA of chemical solutions are analyzed: Винсентт експрес, Бациллол АФ, Дезактин 0, 2 %, WIP'ANIOS Premium, DNAzap™ PCR DNA Degradation Solutions, 70 % u 96 % ethyl alcohols, and physical methods: ultraviolet radiation, alcohol treatment followed by calcination in the flame of the burner and treatment with bidistilled deionized water. While research the contaminating DNA is represented by the synthetic genomic DNA produced by the Promega company. As a result of the pilot study, DNAzap™ PCR DNA Degradation Solutions and bidistilled deionized water had the highest decontamination efficiency. Bidistilled deionized water can be used to the fullest in the laboratory if medical waste disposal standards are met. Other methods showed an efficiency of more than 99.98% which also allows them to be used when working in a biological laboratory, following the suggested recommendations. The presented methods of decontamination did not cause inhibition of the PCR reaction. Preserved, after decontamination treatment, DNA for most agents had a low level of degradation. After being treated with ultraviolet radiation, the level of DNA degradation was medium which means that ultraviolet radiation destroys long strands of DNA, leaving strands unbroken up to 200 bp. In addition, increasing the concentration of contaminating DNA did not affect the change in the efficiency of decontamination substances. All the decontaminated substances analyzed can be modified in molecular genetic laboratories.

Keywords: decontamination agents, DNA, inhibition, PCR, efficiency.

Надійшла до редакції 22.06.2019