



Про затвердження державних санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами"

**Наказ Міністерства охорони здоров'я України
від 24 січня 2008 року N 26**

**Зареєстровано в Міністерстві юстиції України
7 лютого 2008 р. за N 88/14779**

На виконання [Закону України "Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення"](#) **НАКАЗУЮ:**

1. Затвердити державні санітарні норми і правила "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами" (далі - Правила), що додаються.
2. Заступникам головного державного санітарного лікаря України, головному лікарю Центральної санітарно-епідеміологічної станції МОЗ України, головному державному санітарному лікарю Автономної Республіки Крим, головним державним санітарним лікарям областей, міст Києва та Севастополя, на водному, залізничному, повітряному транспорті, Міністерства оборони України, Міністерства внутрішніх справ України, Служби безпеки України, Адміністрації Державної прикордонної служби України, Державного департаменту України з питань виконання покарань, Державного управління справами України, об'єктів з особливим режимом роботи:
 - 2.1. Прийняти затвержені цим наказом Правила до керівництва та використання при здійсненні державного санітарно-епідеміологічного нагляду;
 - 2.2. Довести Правила до відома органів державної влади, підвідомчих установ державної санітарно-епідеміологічної служби, місцевих державних адміністрацій для використання у практичній діяльності.
3. Директору Департаменту державного санітарно-епідеміологічного нагляду Пономаренку А. М. забезпечити реєстрацію цього наказу в Міністерстві юстиції України.
4. Скасувати наказ МОЗ України від 24.12.2007 N 852 "Про затвердження державних санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності, молекулярно-генетичними методами".
5. Контроль за виконанням наказу покласти на директора Департаменту державного санітарно-епідеміологічного нагляду Пономаренка А. М.

**Перший заступник Міністра,
головний державний санітарний
лікар України**

М. Г. Проданчук

ЗАТВЕРДЖЕНО
наказом Міністерства охорони здоров'я
України
від 24 січня 2008 р. N 26

Зареєстровано
в Міністерстві юстиції України
7 лютого 2008 р. за N 88/14779

ДЕРЖАВНІ САНІТАРНІ НОРМИ І ПРАВИЛА
"Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить
біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-
генетичними методами"

1. Загальні положення

1.1. Державні санітарні норми і правила "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності, молекулярно-генетичними методами" (далі - Правила), розроблені на підставі [Законів України "Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення"](#), ["Про захист населення від інфекційних хвороб"](#) та постанови Кабінету Міністрів України від 22.06.99 N 1109 ["Про затвердження Положення про державний санітарно-епідеміологічний нагляд в Україні"](#).

1.2. Правила встановлюють вимоги до приміщень лабораторій і порядку організації і проведення в них робіт з патогенними біологічними агентами (далі - БПА) I - IV груп патогенності або матеріалом, підозрюваним на їх вміст, з використанням молекулярно-генетичних методів, заснованих на полімеразній ланцюговій реакції (далі - ПЛР).

1.3. Правила регламентують виконання досліджень методом ПЛР із застосуванням обладнання, реагентів, тест-систем, дозволених до використання на території України відповідно до [наказу МОЗ України від 04.08.2005 N 393 "Про затвердження Переліку медичних виробів, що підлягають державній реєстрації \(перереєстрації\) в Україні"](#), зареєстрованому в Міністерстві юстиції України 19.10.2005 за N 1229/11509.

1.4. Правила поширюються на лабораторії (відділи, відділення) мікробіологічного профілю установ охорони здоров'я (далі - лабораторії), закладів науки та освіти, спеціалізовані лабораторії незалежно від їх підпорядкування та форм власності, що

проводять молекулярно-генетичні дослідження з БПА I - IV груп патогенності або матеріалом, підозрюваним на їх вміст, дослідження з контролю об'єктів довкілля, харчових продуктів та продовольчої сировини за показниками безпеки, а також на наявність генетично-модифікованих джерел (далі - ПЛР-лабораторії).

1.5. Контроль за виконанням цих Правил здійснює Державна санітарно-епідеміологічна служба України.

1.6. В основі ПЛР лежить багатократне копіювання певного фрагмента дезоксирибонуклеїнової кислоти (далі - ДНК) за допомогою ферменту термостабільної ДНК-полімерази та специфічних праймерів. ПЛР дозволяє виявити специфічну ділянку генома біологічного агента.

1.7. Метод ПЛР має високу чутливість, специфічність, забезпечує можливість роботи практично з будь-яким видом біологічного матеріалу, пробами з об'єктів довкілля, включаючи харчові продукти, є експрес-методом, який дозволяє виконувати аналіз протягом 4 - 8 годин.

Специфічність ПЛР визначається здатністю праймерів точно "розпізнавати" певну ділянку нуклеїнової кислоти (далі - НК) і зв'язуватися з нею за принципом компліментарності.

Аналітична чутливість тест-систем для виявлення НК мікроорганізмів методом ПЛР становить 1×10^2 - 1×10^4 мікробних клітин (геномеквівалентів/мл), специфічність - 85 - 100 %.

1.8. За способом детекції продуктів ампліфікації розрізняють декілька форматів реакції:

- класичний (облік результатів реакції за допомогою електрофорезу);
- ПЛР з детекцією за допомогою гібридизаційно-імуноферментного аналізу (далі - ГІФА);
- ПЛР з флуоресцентною детекцією у "кінцевій точці" (після закінчення реакції);
- ПЛР з флуоресцентною детекцією у режимі "реального часу" (Real-Time PCR).

1.8.1. При використанні ПЛР в класичному форматі детекцію ампліконів здійснюють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Результат детекції фотографують або сканують і архівують в пам'яті комп'ютера. Метод не передбачає кількісного визначення.

1.8.2. ПЛР з детекцією ГІФА виконується за допомогою специфічних тест-систем з внутрішніми ДНК-зондами. Метод дозволяє в ряді випадків значно підвищити чутливість і специфічність детекції ПЛР-продуктів.

1.8.3. ПЛР з флуоресцентною детекцією у "кінцевій точці" дозволяє реєструвати результат ампліфікації за допомогою детекторів типу "Джин" або "Ала $1/4$ " після закінчення реакції ("end-point detection") не відкриваючи пробірок. Цей метод також не є кількісним.

1.8.4. Для ПЛР у "реальному часі" також використовують флуоресцентно мічені олігонуклеотидні зонди. Цей метод дозволяє проводити моніторинг і кількісний аналіз накопичення продуктів реакції, оскільки кінетика накопичення пов'язана із вихідною кількістю матриці НК. Використання математичних методів аналізу результатів

дослідження дозволяє автоматизувати їх інтерпретацію, тим самим зняти проблему суб'єктивної оцінки результатів електрофореграм.

1.8.5. У практичних лабораторіях, крім ПЛР, може використовуватись метод виявлення НК, заснований на одночасному застосуванні трьох ферментів: зворотної транскриптази, РНК-ази та РНК-полімерази T7 - NASBA (Nucleic Acids Sequence Based Amplification) у "реальному часі". На відміну від ампліфікації в ПЛР, NASBA є ізотермічною реакцією, яка здійснюється при температурі +41° С.

Принцип цієї ізотермічної реакції ампліфікації полягає у тому, що під час ампліфікації відбувається збільшення кількості рибонуклеїнової кислоти (далі - РНК), яка транскрибується з спеціального промотора (РНК-полімерази T7), що входить до складу специфічного праймера. Для побудовування другого ланцюга ДНК після першого етапу (зворотної транскрипції) використовується фермент РНК-залежна ДНК-полімераза (зворотна транскриптаза), яка має також і активність РНК-ази. Завдяки цій активності видаляється матрична РНК після синтезу першого ланцюга ДНК, отже, відбувається процес "денатурації" ДНК-РНК гібриду (за рахунок гідролізу РНК) автоматично відтворюваним в кожному подальшому циклі ампліфікації. Фермент ДНК-залежна РНК-полімераза транскрибує за один цикл (5 - 15 хвилин) 10^5 копій фрагментів РНК. Таким чином, протягом 40 - 50 хвилин ізотермічної транскрипційно опосередкованої ампліфікації ДНК або РНК в розчині утворюється 10^8 - 10^9 копій. В даний час принцип NASBA використовується у діагностичних наборах, виробництва "Organon Technika", "BioMerieux", "AmpliSens".

1.9. ПЛР використовують як експрес-метод діагностики інфекційних хвороб, індикації БПА в пробах з об'єктів довкілля та продуктах харчування, для визначення епідемічної значимості збудника на підставі виявлення генетичних маркерів вірулентності, визначення молекулярних механізмів резистентності мікроорганізмів до антимікробних засобів, для здійснення епідеміологічного нагляду за інфекційними хворобами, для верифікації сумнівних результатів діагностичних досліджень іншими методами, виявлення модифікованої НК в харчових продуктах, а також у наукових цілях.

1.10. Проведення досліджень методом ПЛР або NASBA вимагає дотримання правил біологічної безпеки, а також певних вимог до організації і проведення аналізу з метою запобігання контамінації досліджуваних проб НК та продуктами ампліфікації і отримання, в наслідок цього, хибнопозитивних або хибнонегативних результатів.

2. Терміни та визначення

У цих Правилах застосовуються такі терміни, визначення та скорочення:

Ампліфікація - процес багатократного примноження (копіювання) специфічної ділянки ДНК (кДНК) обмеженого (фланкованого) праймерами.

Амплікони - продукти ПЛР, що синтезуються в процесі ампліфікації ДНК-матриці.

Аліквота - (aliquot quantity) - певний, точно вимірний об'єм речовини, що є частиною цілого.

Біологічні патогенні агенти - патогенні для людини мікроорганізми (бактерії, віруси, хламідії, рикетсії, найпростіші, гриби, мікоплазми), генно-інженерно-модифіковані мікроорганізми, отрути біологічного походження (токсини), гельмінти, а також будь-які

об'єкти і матеріали (включаючи польовий, клінічний, секційний), підозрілі на вміст перерахованих агентів.

Біологічна безпека - система організаційних, медико-біологічних і інженерно-технічних заходів і засобів, спрямованих на захист персоналу, що працює, населення і місця існування людини від дії патогенних біологічних агентів.

"Брудна" зона ПЛР-лабораторії - приміщення з високою вірогідністю наявності синтезованих ампліконів у повітрі та на об'єктах довкілля (електрофорезна та інші приміщення, де відкриваються пробірки після ампліфікації).

Генетичні маркери - специфічні нуклеотидні послідовності з відомою первинною структурою, які дозволяють проводити ідентифікацію аналізованої НК, оскільки вони характерні для певного виду.

Деконтамінація - будь-який процес видалення або знищення мікроорганізмів, продуктів ПЛР, небезпечних хімічних та радіоактивних речовин.

Зворотна транскриптаза - РНК-залежна ДНК-полімераза, що використовує молекули РНК як матрицю для синтезу комплементарного ланцюга ДНК.

Лабораторна контамінація нуклеїновими кислотами - механічне занесення позитивно реагуючих НК, перш за все ампліконів, у досліджувані зразки, що призводить до хибнопозитивних результатів.

Нуклеїнові кислоти - дезоксирибонуклеїнова (ДНК) та рибонуклеїнова (РНК).

Комплементарна ДНК - молекула ДНК, синтезована на РНК-матриці з участю РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) - метод виявлення специфічної ділянки НК в досліджуваному біологічному матеріалі шляхом ампліфікації *in vitro*.

"Чиста" зона ПЛР-лабораторії - приміщення, вільні від синтезованих ампліконів (кімнати пробопідготовки, виділення НК, приготування реакційної суміші та ампліфікації).

3. Вимоги до організації роботи методом ПЛР з БПА I - IV груп патогенності

3.1. Загальні вимоги

3.1.1. Роботу з БПА I - IV груп патогенності методом ПЛР проводять за наявності дозволу Державної санітарно-епідеміологічної служби України на право роботи (далі - дозвіл на роботу) із збудниками I - IV групи патогенності (небезпечності), токсинами, рекомбінантними молекулами ДНК, відповідно до [постанови Кабінету Міністрів України від 22.06.99 N 1109 "Про затвердження Положення про державний санітарно-епідеміологічний нагляд в Україні"](#).

3.1.2. Організацію робіт на етапах прийому, розбору, первинної обробки матеріалу, підготовки проб і виділення НК, а також знезараження проб проводять відповідно до вимог ДСП 9.9.5.035.99 "Безпека роботи з мікроорганізмами I - II груп патогенності",

затверджених постановою головного державного санітарного лікаря України від 01.07.99 N 35 (далі - ДСП 9.9.5.035.99), та ДСП 9.9.5.-080-2002 "Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю", затверджених постановою головного державного санітарного лікаря України від 28.01.2002 N 1 (далі - ДСП 9.9.5.-080-2002).

На інших етапах ПЛР-аналізу працюють як із знезараженим матеріалом.

3.1.3. Усі етапи дослідження матеріалу, зараженого або підозрюваного на зараженість вірусами I групи, проводять в умовах максимально ізольованих лабораторій з використанням ізолюючих засобів індивідуального захисту або в боксах біологічної безпеки III класу у захисному протичумному костюмі IV типу, доповненому гумовими рукавичками.

3.1.4. У лабораторіях, що мають дозвіл на роботу з БПА II групи патогенності, допускається проведення досліджень крові/сироватки людини методом ПЛР (без попереднього накопичення мікроорганізма) з метою діагностики інфекцій, збудники яких належать до I групи патогенності.

3.1.5. У лабораторіях, що мають дозвіл на роботу з БПА III групи патогенності, допускається проведення досліджень крові/сироватки людини методом ПЛР (без попереднього накопичення мікроорганізма) з метою діагностики бруцельозу, парентеральних вірусних гепатитів, ВІЛ-інфекції, збудники яких належать до II групи патогенності.

3.1.6. Роботу з ПЛР-діагностики організовує і проводить спеціаліст з вищою спеціальною освітою, який має сертифікат лікаря-спеціаліста з лікарських спеціальностей "бактеріологія", "вірусологія" або "мікробіологія і вірусологія" та пройшов курси спеціалізації, стажування або інші види підготовки, має необхідну за програмою теоретичну і практичну підготовку за своєю спеціальністю, відповідно до Положення про порядок проведення атестації лікарів, затвердженого [наказом МОЗ України від 19.12.97 N 359](#), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 14.01.98 за N 14/2454.

Приймання матеріалу, ведення записів у журналах, виконання допоміжних маніпуляцій при проведенні досліджень та деяких етапів аналізу, дезінфекцію, знешкодження матеріалу тощо здійснюють лаборанти, які отримали свідоцтво про проходження підвищення кваліфікації та перепідготовки молодших медичних та фармацевтичних спеціалістів відповідно до Положення про Свідоцтво про проходження підвищення кваліфікації та перепідготовки молодших медичних та фармацевтичних спеціалістів, затвердженого [наказом МОЗ України від 07.09.93 N 198](#), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 31.12.93 за N 208.

Кваліфікаційні вимоги до працівників лабораторій викладені у Довіднику кваліфікаційних характеристик професій працівників. Випуск 78. Охорона здоров'я, затвердженому [наказом МОЗ України від 29.03.2002 N 117](#).

3.1.7. Кожен працівник повинен мати посадову інструкцію, що встановлює вимоги до освіти, функції, обов'язки, права, відповідальність, затверджену керівником установи.

3.1.8. Результати та протоколи досліджень реєструють на паперових та електронних носіях, а також на фотоплівках, фотографіях, які зберігають у лабораторії впродовж трьох років. Електрофореграми є невід'ємною частиною протоколу дослідження.

3.1.9. Відповіді про результати дослідження видають письмово в установленій формі за підписом лікаря, який виконував дослідження.

3.1.10. Лабораторію забезпечують аптечкою стандартної комплектації для надання першої медичної допомоги.

3.1.11. Для виконання досліджень за методом NASBA-Real-Time вимоги до організації роботи такі ж, як і для ПЛР-лабораторій, що використовують флуоресцентну детекцію.

3.2. Вимоги до приміщень ПЛР-лабораторії

3.2.1. Приміщення ПЛР-лабораторії, яка проводить роботи з БПА I - II груп патогенності або матеріалом, підозрюваним на наявність в ньому цих БПА, повинні відповідати вимогам ДСП 9.9.5.035.99; при роботі з БПА III - IV груп патогенності або матеріалом, підозрюваним на наявність в ньому цих БПА, повинні відповідати вимогам [ДСП 9.9.5.-080-2002](#), а також цих Правил.

3.2.2. Проведення досліджень методом ПЛР з БПА I - IV груп патогенності допускається на базі діючих лабораторій мікробіологічного профілю за умови дотримання вимог ДСП 9.9.5.035.99 та [ДСП 9.9.5.-080-2002](#) і організації в лабораторії відокремлених робочих зон, що дозволяють дотримуватись вимог протиепідемічного режиму роботи та відповідають етапам ПЛР-дослідження.

Не допускається проведення досліджень методом ПЛР в приміщеннях, де проводять дослідження з використанням культуральних (накопичення БПА) і генно-інженерних методів.

Приміщення, в яких проводять дослідження, спрямовані на виявлення НК мікроорганізмів, бажано виділити в окремий блок. При будівництві нових або реконструкції існуючих приміщень ПЛР-лабораторію розміщують в окремій будівлі (ізольованій частині будівлі) з дотриманням вимог ДСП 9.9.5.035.99, [ДСП 9.9.5.-080-2002](#) та цих Правил.

3.2.3. ПЛР-лабораторія повинна мати дві умовні зони "чисту" і "брудну" та включати такий мінімальний набір робочих приміщень:

"чиста" зона:

- приміщення прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу;
- приміщення для виділення НК;
- приміщення приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР - ампліфікаційна;

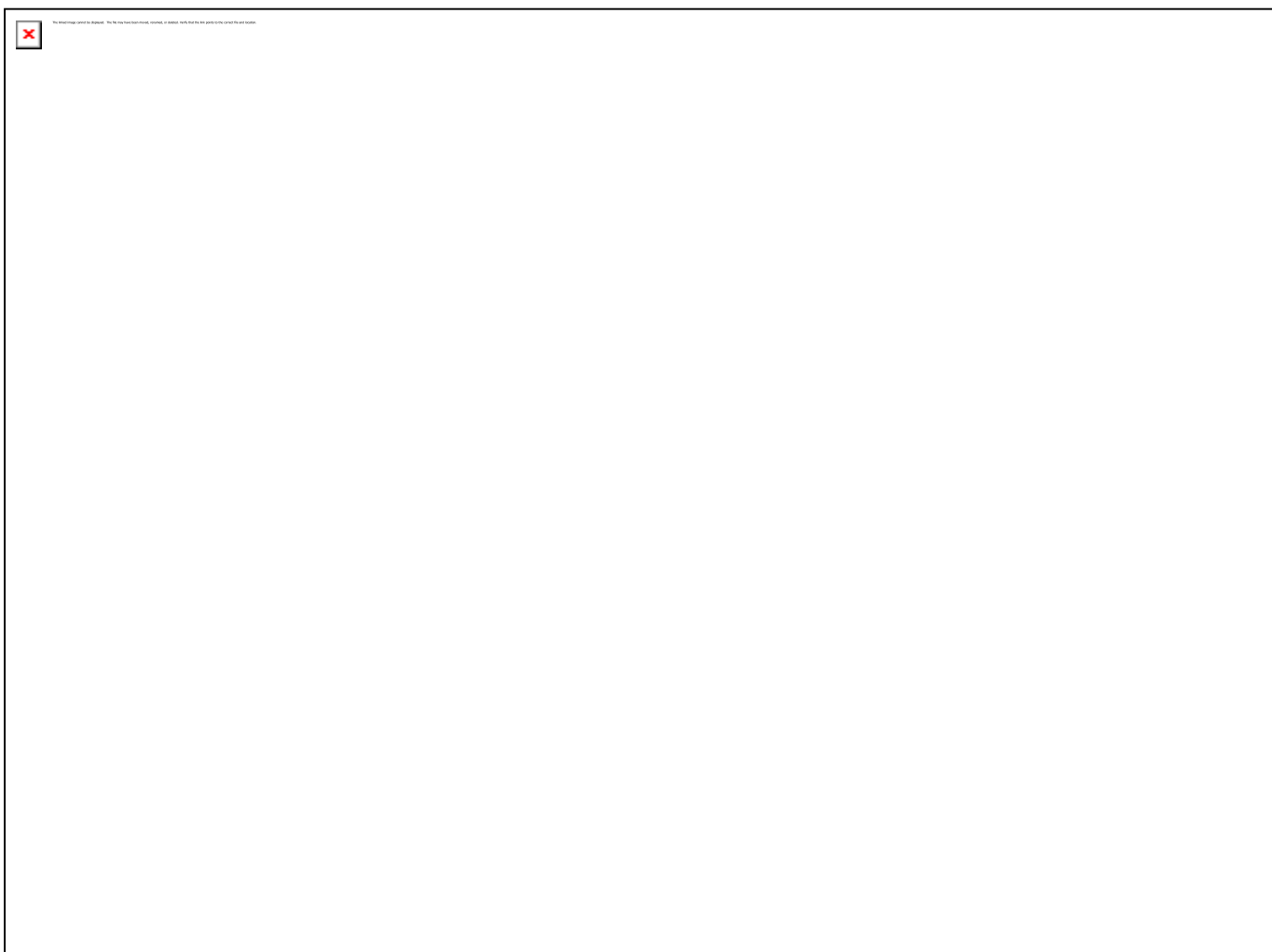
"брудна" зона:

- приміщення детекції продуктів ампліфікації (при застосуванні методів електрофорезу або ГІФА) - форезна;
- секвенаторна.

3.2.4. Робочі приміщення ПЛР-лабораторії повинні бути непрохідними і створеними за типом боксів з передбоксами. Площа кожного із робочих приміщень ПЛР-лабораторії повинна бути не меншою ніж 12 м² на одне робоче місце, у тому числі передбокс не менше 2 м². При збільшенні робочих місць площу слід збільшувати на 6 м² на кожне робоче місце, тобто $S = 12 + 6 \times (n - 1)$ м², де n - кількість робочих місць.

3.2.5. ПЛР-лабораторія, що функціонує як самостійна структура, повинна мати додатково такі приміщення - кімнату для роботи з документами (кімнату персоналу), кабінет завідувача лабораторією (може бути об'єднаний з кімнатою персоналу); роздягальні для співпрацівників; кімнату прийому їжі; туалет; душові для "чистої" та "брудної" зон ПЛР-лабораторії окремо, підсобні (складські) приміщення, приміщення для знезараження матеріалу та автоклавну, а також приміщення, вказані в підпункті 3.2.3 пункту 3.2 цих Правил, для проведення ПЛР-аналізу. Примірна схема організації ПЛР-лабораторії наведена на малюнку 1.

Малюнок 1. Примірна схема організації ПЛР-лабораторії



Умовні позначення



1 - Зона прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу; 2 - Зона виділення НК; 3 - Зона приготування реакційних сумішей, проведення ЗТ та ПЛР; 4 - Зона детекції продуктів ампліфікації методом електрофорезу або ГІФА; 5 - Кімната аналізу результатів; 6 - Передбокс; 7 - Кімната знезараження матеріалу.

3.2.6. У приміщенні прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу проводять попередню пробопідготовку (сортування, маркування, центрифугування та інше), зберігання і первинну інактивацію залишків біологічного матеріалу дезінфекційними засобами. Тут же можна проводити прийом і обробку проб для дослідження іншими методами (бактеріологічним, вірусологічним, імунологічним тощо) за умови виділення окремого обладнаного робочого місця для пробопідготовки до ПЛР-аналізу.

Усі маніпуляції, що супроводжуються ризиком утворення аерозолів (струшування, центрифугування тощо), при обробці матеріалу виконують у боксах безпеки II або III класу (в залежності від групи патогенності мікроорганізму, наявність якого підозрюють у досліджуваному матеріалі).

3.2.7. Зону виділення НК розташовують в окремому приміщенні. При організації ПЛР-лабораторії на базі діючої мікробіологічної лабораторії допускається виділення НК в приміщеннях, в яких проводять серологічні дослідження, а в лабораторіях, що працюють із збудниками I - II груп патогенності, - в кімнаті зараження та розтину тварин. У цих випадках в приміщенні організовують робочу зону для виділення НК, в якій встановлюють бокс біологічної безпеки відповідно II або III класу. У робочій зоні розташовують обладнання та предмети, які необхідні тільки для виділення НК. У боксі біологічної безпеки для виділення НК не допускається проведення інших робіт.

Виділення НК з клінічного матеріалу та проб з об'єктів довкілля проводять у іншому боксі безпеки, ніж при дослідженні харчових продуктів на показники безпеки або наявність генетично-модифікованих організмів. Крім того, доцільно розмежувати процеси виділення НК з крові/сироватки та інших видів клінічного матеріалу (в окремих боксах безпеки або в різний час, після попередньої обробки).

3.2.8. Приміщення ампліфікаційної має бути окремим. У ньому проводять приготування реакційної суміші, внесення до пробірки для ПЛР виділених препаратів ДНК або

компліментарної ДНК (далі - кДНК), зворотну транскрипцію (далі - ЗТ) РНК та ампліфікацію ДНК або кДНК.

Для приготування реакційної суміші і внесення в реакційну суміш препаратів НК встановлюють окремі ПЛР-бокси.

У ПЛР-лабораторіях з великим обсягом однотипних досліджень для приготування реакційної суміші обладнують окрему боксовану кімнату, яка функціонально, через шлюзове вікно, пов'язана з кімнатою для внесення виділених препаратів НК та проведення ампліфікації.

3.2.9. Кімнату детекції продуктів ампліфікації розташовують в окремому приміщенні, максимально віддаленому від "чистої" зони ПЛР-лабораторії. Створюють усі умови для розмежування персоналу, що працює у "чистій" зоні від персоналу, що працює у "брудній" зоні.

3.2.10. При необхідності використання для детекції продуктів ампліфікації разом з методом електрофорезу і методу ГПФА необхідно виділити окреме приміщення або окрему робочу зону для проведення гібридаційного аналізу (відповідно площа цього приміщення повинна бути збільшена як для приміщення на 2 робочих місця). Обладнання для кожного виду детекції маркують для кожної зони. Не допускається при проведенні ГПФА використання піпеток і посуду, призначених для електрофорезу.

3.2.11. При використанні в ПЛР-лабораторії методу ПЛР з флуоресцентною детекцією, як єдиного методу, окрему кімнату детекції продуктів ампліфікації не організовують.

3.2.12. Автоклавна кімната може бути спільною для ПЛР-лабораторії та інших підрозділів лабораторії, на базі якої розташована ПЛР-лабораторія, і функціонувати за умови дотримання вимог біологічної безпеки.

3.2.13. Для вивчення послідовності нуклеотидів у ДНК (секвенування) необхідно виділяти окреме приміщення - секвенаторну у "брудній" зоні ПЛР-лабораторії, яке має бути розташоване поруч з приміщенням детекції продуктів ампліфікації. При цьому слід передбачити збільшення площі приміщення детекції продуктів ампліфікації, оскільки в ньому треба буде розмістити додаткове обладнання для секвенування: настільну центрифугу з охолодженням та змінними роторами, облаштувати стіл для проведення очистки та перевірки якості отриманого продукту ПЛР.

3.2.14. Приміщення секвенаторної влаштовують за типом бокса з передбоксником загальною площею не менше 12 м², в тому числі 10 м² - робоча кімната. Передбоксник обладнують водопостачанням та каналізацією.

3.2.15. Підготовка зразка для завантаження його у секвенатор складається з кількох основних етапів (та може розрізнятися в залежності від методики, що використовується):

- виділення НК з клінічного матеріалу проводиться у кімнаті виділення НК, як для ПЛР у класичному форматі;

- ампліфікація ділянки НК, що охоплює зону інтересу (якщо це РНК - необхідним є етап ЗТ для отримання кДНК), проводиться в приміщенні ампліфікаційної;

- очистка отриманого ампліфікованого продукту ПЛР-реакції (від праймерів, залишкових дезоксирибонуклеотидів, ферментів, матричної НК, неспецифічних ПЛР-продуктів) проводиться у форезній. Використовуються такі методи очистки: за допомогою електрофорезу в агарозному гелі; на колонках; ферментативна очистка;

- оцінка якості/кількості ДНК (з наступним розведенням при необхідності) за допомогою агарозного електрофорезу чи спектрофотометрично проводиться у форезній;

- проведення ПЛР з використанням термінаторів проводиться у секвенаторній;

- доочистка отриманого ампліфікованого продукту після реакції з термінаторами (від солей, надлишкових дидезоксирибонуклеотидів) проводиться у форезній. Використовуються такі методи очистки: очистка етанолом, ізопропанолом, гель-фільтрація, мембранна фільтрація;

- ресуспендування зразка (у формаміді або воді) проводиться у форезній;

- завантаження зразка у секвенатор.

3.2.16. Незалежно від протоколу, що буде використовуватись, необхідним є таке обладнання для секвенаторної:

- низькотемпературні холодильники для зберігання зразків та реагентів;

- ПЛР-бокс;

- дозатори на різні об'єми;

- ампліфікатор (для проведення класичної ПЛР);

- вортекс;

- секвенатор.

В залежності від методики необхідними можуть бути обладнання для проведення електрофорезу з системою документації, спектрофотометр, центрифуги зі змінними роторами та охолодженням.

3.2.17. Планувальні рішення і розміщення обладнання повинні забезпечувати поточність руху досліджуваного матеріалу за технологічним процесом. Слід повністю виключити обмін повітря між приміщеннями "брудної" зони та іншими приміщеннями ПЛР-лабораторії.

Рух матеріалу у зворотному напрямку категорично заборонено.

3.2.18. ПЛР-лабораторія повинна бути обладнана водопроводом, каналізацією, забезпечена електрикою і опалюванням відповідно до чинного законодавства. Усі приміщення лабораторії повинні бути забезпечені достатнім природним і штучним освітленням. В передбокснику кожної робочої кімнати повинна бути раковина для миття рук.

3.2.19. При будівництві нових або реконструкції існуючих ПЛР-лабораторій приміщення слід обладнати припливно-витяжною або витяжною вентиляцією. Різниця в тиску повітря в приміщеннях ПЛР-лабораторії досягається за рахунок різного за кратністю обміну повітря в них.

Кратність обміну повітря в приміщеннях ПЛР-лабораторії повинна відповідати значенням, наведеним в таблиці 1.

Таблиця 1.

Кратність обміну повітря (м³/год) у приміщеннях ПЛР-лабораторій

Найменування приміщення	Кратність обміну повітря (м ³ /год)	
	приток	витяжка
Зона прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу	5	6
Зона виділення НК	5	6
Зона приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР	5	5
Зона детекції продуктів ампліфікації методом електрофорезу або ГФА	5	7

3.2.20. Припливно-витяжна вентиляція повинна бути обладнана окремо для "чистої" та "брудної" (форезна та зона ГФА) зон ПЛР-лабораторії.

3.2.21. При відсутності системи вентиляції зменшення ризику контамінації проб досягають заходами по обмеженню обміну повітря між приміщеннями ПЛР-лабораторії (територіальне розмежування).

3.2.22. При необхідності в ПЛР-лабораторії можуть бути встановлені кондиціонери за умови використання їх при технологічних перервах. Під час роботи з досліджуваним матеріалом кондиціонери повинні бути вимкнені.

3.2.23. Внутрішнє оздоблення приміщень виконують відповідно до їх функціонального призначення. Поверхні стін, підлоги і стелі в лабораторних кімнатах повинні бути гладенькими, без щілин, легко обробляться і бути стійкими до дії мийних і дезінфекційних засобів. Підлога не повинна бути слизькою.

3.2.24. Вікна повинні бути щільно закриті. Для захисту робочих місць від сонячних променів рекомендується використовувати світлозахисні плівки, стійкі до дезінфектантів, використання жалюзі в середині приміщень - заборонено.

3.2.25. Лабораторні меблі повинні мати покриття, стійке до дії мийних і дезінфекційних засобів. Поверхня столів не повинна мати тріщин і швів.

3.2.26. Приміщення для усіх етапів ПЛР-аналізу повинні бути обладнані бактерицидними лампами, які встановлюють з розрахунку 2,5 Вт/м³. Рекомендується додатково використовувати пересувний ультрафіолетовий бактерицидний опромінювач-рециркулятор.

3.2.27. ПЛР-лабораторія повинна бути забезпечена телефонним зв'язком, комп'ютерною та оргтехнікою, підключена до локальної електронної мережі.

3.2.28. Приміщення ПЛР-лабораторії повинні бути непроникні для гризунів і комах.

3.2.29. ПЛР-лабораторію забезпечують засобами пожежогасіння.

3.3. Вимоги до лабораторного обладнання в ПЛР-лабораторії

3.3.1. Комплектацію лабораторного обладнання для ПЛР-лабораторії визначають з урахуванням функціонального призначення лабораторії, тест-систем, які планується використовувати для виконання досліджень, обсягів та номенклатури досліджень, що плануються.

Прилади, обладнання і засоби вимірювальної техніки повинні бути зареєстровані МОЗ України відповідно до [наказу МОЗ України від 04.08.2005 N 393 "Про затвердження Переліку медичних виробів, що підлягають державній реєстрації \(перереєстрації\) в Україні"](#), зареєстрованому в Міністерстві юстиції України 19.10.2005 за N 1229/11509, технічно справні, мати технічний паспорт і робочу інструкцію з експлуатації. Засоби вимірювальної техніки і обладнання підлягають регулярному метрологічному контролю (повірка/атестація).

Прилади, що використовуються, повинні відповідати нормам безпеки і електромагнітної сумісності. Все лабораторне обладнання повинно бути заземлено, перевага віддається застосуванню трьохконтактних штепсельних вилок.

Мінімальний перелік основного обладнання ПЛР-лабораторії наведений у додатку 1 до цих Правил.

3.3.2. При застосуванні методики ПЛР з флуоресцентною детекцією використовують спеціальні детектори, наприклад типу "Джин" або "Ала 1/4", який доцільно встановити в ампліфікаційній, з'єднавши його з комп'ютером із системою Windows 3.11, 95, 98, ME, XP і одним вільним COM або USB портом.

3.3.3. Ампліфікатор, що дозволяє працювати у форматі "Real Time", також встановлюють в ампліфікаційній кімнаті разом зі звичайними ампліфікаторами.

3.3.4. Для виконання досліджень за методом NASBA-Real-Time потрібне відповідне обладнання, Примірний перелік якого наведений в додатку 2 до цих Правил, яке також розташовують у приміщенні виділення НК та ампліфікаційній.

3.3.5. Кожне робоче приміщення ПЛР-лабораторії повинне мати свій промаркований працівниками, що в ньому працюють, набір меблів, лабораторного обладнання, реагентів, автоматичних піпеток, наконечників, пластикового та скляного посуду, захисного одягу, гумових рукавичок, інвентарю для прибирання тощо, які використовують тільки в даному приміщенні. Застосування його в інших приміщеннях або для інших видів робіт не допускається.

3.3.6. Для проведення дослідження користуються приладами і витратними матеріалами (пробірки, наконечники до мікродозаторів), що виключають можливість перехресної контамінації вихідного матеріалу, виділених НК і продуктів ПЛР. Для цього необхідно:

- використовувати:

термостати з твердотільним термоблоком;

пробірки з кришками, що щільно закриваються;

одноразові пробірки і наконечники з фільтром до мікродозаторів тільки вільні від ДНК-аз та РНК-аз (з маркуванням "DNase, RNase - free");

наконечники, які точно відповідають за розміром та видом автоматичним піпеткам, а пробірки для ампліфікації - термоциклерам (відповідно до інструкції фірми-виробника приладу);

- встановити на робочих місцях спеціальні контейнери для скидання використаних наконечників і пробірок.

3.3.7. Мікродозатори, робоча і зовнішня поверхня корпусу приладів повинні бути стійкі до дії мийних, дезінфекційних засобів і ультрафіолетового випромінювання.

3.3.8. Для кожного етапу ПЛР-дослідження необхідно передбачити наявність окремих холодильників:

- у кімнаті прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу - холодильна камера (6 ± 2)° C та морозильна камера - мінус (18 ± 2)° C (для зберігання досліджуваних проб);

- у кімнаті виділення НК - холодильна камера (6 ± 2)° C та морозильна камера - мінус (18 ± 2)° C для зберігання набору реагентів для виділення НК; холодильна камера (6 ± 2)° C - для нетривалого (декілька годин) зберігання виділених НК і морозильна камера - мінус (18 ± 2)° C для зберігання НК впродовж 1 місяця.

Не допускається зберігання препаратів НК в одному холодильнику з компонентами набору для виділення НК.

При необхідності тривалого (біля 1 року) зберігання виділених і підготовлених для дослідження препаратів НК потрібна морозильна камера, яка здатна забезпечити температуру мінус 70° C;

- у кімнаті приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР - холодильна камера (6 ± 2)° C і морозильна камера - мінус (18 ± 2)° C - для зберігання наборів ЗТ і ампліфікації НК;

- у кімнаті детекції продуктів ампліфікації (6 ± 2)° C - для зберігання реагентів для електрофоретичної детекції (таких як маркер молекулярної маси та інше) та ГІФА.

При зберіганні в холодильниках (морозильних камерах) інфікованого матеріалу необхідно вживати заходи для попередження забруднення камер; розморожування рефрижератора, що передбачене правилами експлуатації, слід об'єднувати з його дезінфекцією.

Усі контейнери, пробірки, що зберігаються в холодильних (морозильних) камерах, повинні мати чіткі написи із зазначенням матеріалу, що міститься у них. Матеріали без чітких написів і реагенти, термін використання яких вичерпано, повинні бути знезаражені шляхом автоклавування і видалені з лабораторії.

Контроль температурного режиму в холодильних (морозильних камерах) проводиться щоденно з відміткою у відповідних температурних листках або журналах.

Рекомендована форма листа обліку температури в холодильнику (морозильнику) наведена у додатку 3 до цих Правил.

Для контролю температурного режиму доцільно використовувати дистанційні термометри, які дозволяють здійснювати контроль температури в камері не відкриваючи холодильника.

4. Документація ПЛР-лабораторії

4.1. ПЛР-лабораторія повинна мати:

4.1.1. Документацію щодо організації лабораторії:

- положення про лабораторію, затверджене керівником установи;
- паспорт лабораторії, затверджений керівником установи;
- дозвіл на роботу зі збудниками відповідних груп патогенності відповідно до підпункту 3.1.1 пункту 3.1 цих Правил;
- свідоцтво(а) про атестацію/акредитацію ПЛР-лабораторії;
- ліцензію на здійснення медичної практики відповідно до [Закону України "Про ліцензування певних видів господарської діяльності"](#).

4.1.2. Організаційно-розпорядчу документацію - накази, інструкції та інші документи, що регламентують діяльність лабораторії.

4.1.3. Нормативну документацію, що регламентує вимоги до об'єктів досліджень та методи досліджень.

4.1.4. Документацію на систему забезпечення якості досліджень:

- настанова з якості;
- інструкція з внутрішнього та зовнішнього контролю якості досліджень;
- інструкції з протиепідемічного режиму, охорони праці та техніки безпеки;
- журнал реєстрації контамінації ПЛР-лабораторії нуклеїновими кислотами;
- форма N 410/о "Журнал внутрішнього контролю якості лабораторних досліджень", затверджена [наказом МОЗ України від 11.07.2000 N 160](#);

- результати зовнішнього контролю якості досліджень.

4.1.5. Документи на обладнання та засоби вимірювальної техніки:

- реєстраційні документи на обладнання (журнал/картки обліку);

- паспорт на кожну одиницю обладнання та засобів вимірювальної техніки;

- графіки та посвідчення про перевірку засобів вимірювальної техніки (можуть знаходитись у метролога).

4.1.6. Документацію щодо персоналу лабораторії:

- посадові інструкції;

- документи на присвоєння (підтвердження) кваліфікаційних категорій, видані відповідно до Положення про порядок проведення атестації лікарів, затвердженого [наказом МОЗ України від 19.12.97 N 359](#), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 14.01.98 за N 14/2454 та Положення про атестацію молодших спеціалістів з медичною освітою затвердженого [наказом МОЗ України від 23.11.2007 N 742](#), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 12.12.2007 за N 1368/14635;

- дані щодо імунізації працівників;

- документи про страхування працівників на випадок зараження збудниками ВІЛ відповідно до Порядку та умов обов'язкового страхування медичних працівників та інших осіб на випадок інфікування вірусом імунодефіциту людини під час виконання ними професійних обов'язків, а також на випадок настання у зв'язку з цим інвалідності або смерті від захворювань, зумовлених розвитком ВІЛ-інфекції, затвердженого [постановою Кабінету Міністрів України від 16.10.98 N 1642](#);

- журнал реєстрації інструктажів з питань охорони праці на робочому місці, форма якого визначена додатком 6 до Типового положення про порядок проведення навчання і перевірки знань з питань охорони праці, затвердженого [наказом Державного Комітету України з нагляду за охороною праці від 26.01.2005 N 15](#), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 15.02.2005 за N 231/10511;

- журнал реєстрації аварій.

4.1.7. Медичну облікову та звітну документацію.

5. Вимоги до проведення робіт в ПЛР-лабораторії

5.1. Персонал з відповідною професійною підготовкою допускають до роботи з БПА після проведення інструктажу щодо дотримання вимог біологічної безпеки та безпеки праці, про що повинна бути відмітка з підписом проінструктованого у журналі реєстрації інструктажів з питань охорони праці на робочому місці, форма якого визначена додатком 6 до Типового положення про порядок проведення навчання і перевірки знань з питань охорони праці, затвердженого [наказом Державного Комітету України з нагляду за охороною праці від 26.01.2005 N 15](#), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 15.02.2005 за N 231/10511.

5.2. У "чистій" та "брудній" зонах ПЛР-лабораторії повинні працювати різні спеціалісти, а робота повинна бути організована так, щоб працівники цих зон були максимально ізольовані.

5.3. Порядок забору матеріалу визначений нормативними документами МОЗ України, що регламентують виконання відповідних досліджень, інструкціями до тест-систем і ДСП 9.9.5.035.99 та [ДСП 9.9.5.-080-2002](#).

Забір та транспортування матеріалу для досліджень методом ПЛР здійснює персонал, який пройшов інструктаж з цього питання. Матеріал відбирають стерильними одноразовими інструментами в стерильні одноразові флакони, пробірки, контейнери.

Одразу після забору біологічного матеріалу флакони, пробірки щільно закривають, не торкаючись їх внутрішньої поверхні і внутрішньої поверхні кришок. Працюють в одноразових рукавичках.

Відбір проб харчових продуктів та сировини проводять згідно з чинними нормативними документами, що встановлюють порядок відбору для однорідних груп продукції. Проби сипучих продуктів або щільної консистенції відбирають в одноразові поліетиленові пакети розміром не більше 10 x 15 см, використовуючи одноразові рукавички і стерильні (профламбовані) інструменти. Проби рідких продуктів відбирають в стерильні ємкості з скла або пластика з кришками, що герметично закриваються. Проби опечатують, складають акт відбору проб харчових продуктів (форма N 342/о, затверджена [наказом МОЗ України від 11.07.2000 N 160](#)), який разом з відібраною пробкою і направленням відправляють в лабораторію.

Транспортування проб харчових продуктів здійснюють при температурі, рекомендованій для зберігання сировини або харчового продукту.

5.4. Доставка в лабораторію матеріалу для дослідження здійснюється у спеціальних контейнерах або сумках-холодильниках стійких до дії дезінфектантів. На дно цих ємкостей поміщають адсорбуючий матеріал (марлева серветка, тканина, вата тощо). Штатив з пробірками поміщають в сумку-холодильник або в контейнер з холодними агентами. Правила упаковки БПА регламентовані діючими нормативними документами щодо порядку обліку, зберігання, передачі і транспортування мікроорганізмів.

Кожна партія матеріалу повинна супроводжуватись пакувальним листом з описом вкладеного у контейнер (копія пакувального листа зберігається у відправника) та направленнями на дослідження кожного зразка:

для біологічного матеріалу - форма N 200/о "Направлення на аналіз", затверджена [наказом МОЗ України від 04.01.2001 N 1](#);

для проб із об'єктів довкілля - форма N 205/о "Направлення на санітарно-мікробіологічне дослідження", затверджена [наказом МОЗ України від 04.01.2001 N 1](#);

для культур мікроорганізмів - направлення на ПЛР-дослідження оформлюється у вільній формі і супроводжується паспортом штаму.

Ці документи упаковують окремо від проб.

Ємкості з матеріалом повинні бути промарковані відповідно до направлення. Забороняється обертати направлення навколо ємкості з об'єктом досліджень, вкладати в контейнер. Направлення зберігаються в лабораторії протягом терміну, визначеного в установленому порядку.

5.5. Матеріал, що надходить для дослідження, приймають в кімнаті прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу, де його розбирають і сортують дотримуючись вимог біологічної безпеки.

Розпаковування матеріалу проводиться з дотриманням запобіжних заходів, з використанням маски та гумових рукавичок.

Первинні транспортні контейнери або сумки-холодильники, в яких доставлено зразки, після розвантаження, обробляють дезінфікуючими розчинами, після чого вони можуть бути повернені закладу (власнику), що направив матеріал.

Зразки і посуд, в якому матеріал надходить для дослідження, поверненню не підлягають.

Ємкості, що містять матеріал, зовні обробляють дезінфектантом, ставлять на металеві підноси або в штативи і переносять на стіл для реєстрації і сортування.

Зразки біологічного матеріалу реєструють відповідно до форми N 252/о "Журнал реєстрації мікробіологічних та паразитологічних досліджень", затвердженої [наказом МОЗ України від 04.01.2001 N 1](#); проби з об'єктів довкілля - відповідно до форми N 379/о "Журнал реєстрації санітарно-мікробіологічних та санітарно-паразитологічних досліджень", затвердженої [наказом МОЗ України від 11.07.2000 N 160](#).

Кожний зразок маркують відповідно до реєстраційного журналу.

5.6. При проведенні досліджень методом ПЛР неухильно дотримуються таких правил послідовної обробки матеріалу:

5.6.1. Після реєстрації промарковані зразки передають на робочі місця для підготовки матеріалу для дослідження методом ПЛР, де проводять їх первинну обробку (центрифугування проб, їх об'єднання або розділення тощо).

5.6.2. При перенесенні біологічного матеріалу із флаконів (пробірок) в інші та виконанні маніпуляцій з ним використовують тільки окремі одноразові наконечники з аерозольним бар'єром.

5.6.3. При роботі з біологічним матеріалом важливо не здійснювати різких рухів, обережно відкривати пробірки, флакони, враховуючи можливість аерозольних викидів, які можуть привести до контамінації проб і робочих поверхонь.

5.6.4. Передачу і доставку аліквот проб обробленого і знезараженого матеріалу, препаратів НК, пробірок з продуктами ПЛР із одного приміщення всередині лабораторії в інше здійснюють через шлюзові передаточні вікна або переносять у щільно закритих металевих або пластмасових контейнерах. Контейнери після кожного використання піддають дезінфекції.

5.6.5. У приміщення виділення НК матеріал доставляють тільки в закритих одноразових пробірках у вигляді маркованих аліквот. Після виділення НК передають для постановки

реакції у кімнату приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР або зберігають у холодильній чи морозильній камері.

5.6.6. У кімнаті приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР готують компоненти реакційної суміші та складають власне реакційну суміш (якщо не використовуються готові тест-системи), додають виділені препарати НК. Всі маніпуляції проводять у окремих настільних ПЛР-боксах. Реакційні суміші готують до початку роботи з виділеними НК.

В ПЛР-лабораторіях з невеликим обсягом різноманітних досліджень допускається об'єднати виконання етапу приготування реакційної суміші і внесення виділеної НК в одному ПЛР-боксі в різний час після попередньої обробки ПЛР-боксу.

Перед початком роботи та після її закінчення ПЛР-бокси та обладнання, що в них знаходиться, обробляють 70° С спиртом та опромінюють ультрафіолетом 1 годину.

Усі маніпуляції у ПЛР-боксах, перенесення реакційних сумішей і препаратів НК, заповнення ампліфікаторів пробірками із реакційною сумішшю і НК та звільнення від них проводять в одноразових гумових рукавичках.

5.6.7. При використанні праймерів з флуорофорами - після постановки реакції проводять детекцію, облік та реєстрацію результатів дослідження. Відпрацьовані пробірки з дотриманням вимог підпункту 5.6.4 пункту 5.6 цих Правил видаляють з приміщення, де проводилась ампліфікація, у форезну або спеціально виділене приміщення для первинної дезінфекції відпрацьованого матеріалу, де проводять їх знезараження.

5.6.8. При використанні класичного формату реакції або ГІФА - реакційні пробірки з дотриманням вимог підпункту 5.6.4 пункту 5.6 цих Правил передають у "брудну" зону до кімнати для детекції продуктів ампліфікації для подальшого електрофорезу або ГІФА.

5.6.9. Робота з розчинами, що містять бромистий етидид (гель для електрофорезу, буферні розчини тощо), проводиться в гумових рукавичках (одна або дві пари), оскільки речовина вибірково комплексується з ДНК і має мутагенну та тератогенну дію.

5.6.10. Ультрафіолетове опромінення, що застосовується для візуального обліку результатів електрофорезу, небезпечно для зору, тому необхідно користуватися захисними окулярами, маскою або щитком.

5.6.11. Після проведення детекції і обліку результатів дослідження класичним методом (електрофореграма) або ГІФА пробірки з продуктами ПЛР та використані наконечники до мікродозаторів піддають первинній обробці дезінфікуючими розчинами, що спричинюють деградацію ДНК, дозволеними до застосування в установленому порядку. Процедуру проводять безпосередньо у форезній або спеціально виділеному приміщенні для первинної дезінфекції відпрацьованого матеріалу, яке розташоване як можна далі від "чистої" зони. Остаточне знезараження використаних витратних матеріалів і реагентів проводять в автоклавній кімнаті.

5.6.12. Результати досліджень оформляють і зберігають в ПЛР-лабораторії згідно з підпунктом 3.1.8 пункту 3.1 цих Правил.

5.7. За результатами аналізу видають відповідь про наявність у досліджуваній пробі специфічних ділянок (фрагментів) ДНК або РНК, що мають гомологію з певною ділянкою

генома збудника відповідного інфекційного захворювання, або про наявність в досліджуваному матеріалі генетичних маркерів або генетично модифікованої НК.

5.8. При проведенні досліджень суворо дотримуються умов зберігання усіх реагентів згідно з інструкцією (настановою) про застосування наборів. Усі реактиви зберігають розлитими на окремі порції (аліквоти). Не допускається використання реагентів з вичерпаним терміном придатності або таких, що зберігалися у не відповідних умовах.

5.8.1. Серійні аліквоти реагентів повинні бути пронумеровані і занесені в спеціальний журнал з вказівкою номера партії реактивів, з якої проведене аліквотування, дати приготування аліквот і особи, що проводила розлив реагентів.

5.8.2. Перед роботою з ДНК або перед перенесенням приготованих до проведення реакції ПЛР сумішей всі початкові реагенти повинні бути прибрані в морозильну камеру, призначену для робочих реактивів.

5.8.3. Не допускається повертати частково використані реактиви в холодильник для зберігання аліквот, так само як і в холодильник для зберігання початкових розчинів в промислових упаковках.

Зразки ДНК зберігають окремо від реагентів у відповідних холодильниках.

5.9. Після закінчення роботи всі об'єкти, що містять БПА, та реагенти прибирають у сховища (холодильники, шафи тощо), після чого робочі поверхні в обов'язковому порядку піддають дезінфекції.

5.10. Залишки БПА (або матеріалу) і посуд, використаний на етапах прийому, розбору і первинної обробки матеріалу, підготовки проб і виділення НК, приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР, збирають в ємкості з дезрозчинами, що закриваються, і після відповідної експозиції передають в автоклавну.

Зливання рідин в каналізаційну мережу без знезараження не допускається.

5.11. Перенесення БПА (або матеріалу) і використаного посуду для знезараження здійснюють у щільно закритих промаркованих ємкостях.

5.12. У всіх приміщеннях ПЛР-лабораторії регулярно проводять вологе прибирання кожної робочої зони ПЛР-аналізу індивідуальним промаркованим інвентарем для прибирання, який заборонено використовувати для прибирання інших приміщень.

5.13. Працівників кожної робочої зони забезпечують відповідним спецодягом: медичним халатом, шапочкою, рукавичками і змінним взуттям, комплектами протичумного костюма тощо. При роботі в приміщенні детекції продуктів ампліфікації слід одягати бахіли.

Переміщення одягу із зони в зону категорично забороняється. Рекомендується використання одноразового одягу, особливо в "брудній" зоні ПЛР-лабораторії - кімнаті детекції продуктів ампліфікації.

5.13.1. Спецодяг працівників лабораторії позначають індивідуально та відповідно до розподілу по зонах (наприклад: одяг персоналу, що працює в різних зонах, може відрізнятися за кольором або фасоном). Зміна спецодягу проводиться не рідше одного разу на тиждень.

5.14. Вибір типу захисного костюма проводиться в суворій відповідності до ДСП 9.9.5.035.99 та [ДСП 9.9.5.-080-2002](#) і визначається видом збудника, робочою зоною ПЛР-лабораторії, оснащенням її боксами біологічної безпеки.

5.14.1. Первинну обробку матеріалу, доставленого на дослідження (об'єднання або розділення проб, центрифугування, інактивацію тощо), виконують у захисному костюмі I - II або IV типу, доповненому рукавичками і в разі потреби респіратором.

5.14.2. У приміщенні підготовки проб і виділення НК при дослідженні матеріалу, інфікованого бактеріями I - II груп патогенності, інактивованого на етапі підготовки проб, роботу проводять у боксі біологічної безпеки II класу в костюмі IV типу, доповненому гумовими рукавичками.

5.14.3. На етапах проведення ПЛР, обліку результатів роботу проводять у таких видах захисного одягу:

- із незараженим матеріалом - в костюмі IV типу, доповненому гумовими рукавичками;

- з пробами із зовнішнього середовища, інфікованими збудниками Кримської геморагічної гарячки, тяжкого гострого респіраторного синдрому, геморагічної гарячки з нирковим синдромом, Омської геморагічної гарячки - у костюмі I типу або в боксі біологічної безпеки II класу та в костюмі IV типу, доповненого гумовими рукавичками та респіратором;

- з матеріалом з іншими вірусами II групи патогенності роботи проводять у захисному костюмі IV типу, доповненому респіратором і гумовими рукавичками.

5.14.4. Надягання і зняття захисного одягу проводять у передбоксах. У кожному з них повинен бути окремий персональний комплект захисного одягу і взуття.

5.14.5. Захисний одяг зони детекції продуктів ампліфікації і в першу чергу гумові рукавички вважаються найбільш забрудненими продуктами ампліфікації. Перед зняттям одягу слід замінити рукавички, у яких працювали, на чисті.

Гумові рукавички міняють при проведенні обробки робочого місця (боксу безпеки та ПЛР-боксу до та після роботи), після внесення клінічних зразків при виділенні НК та перед елюцією.

6. Порядок обробки спецодягу при роботі в приміщеннях ПЛР-лабораторії

6.1. Використаний одяг підлягає замочуванню у дезінфекційному розчині (наприклад, у 0,2 % розчині засобу "Жавель-Клейд" протягом 60 хвилин або в інших засобах, зареєстрованих в Україні). Після цього прання проводять у воді з додаванням прального порошку при температурі 90 - 100° С.

6.2. При використанні одноразового робочого одягу його піддають дезінфекції, як зазначено в пункті 6.1 цих Правил, після чого автоклавують і утилізують, якщо роботи проводились з БПА I - II груп патогенності. Якщо роботи велись з матеріалом, підозрілим на вміст БПА III - IV груп патогенності, достатньо передати його на автоклавування, попередньо упакувавши для унеможливлення контамінації приміщень лабораторії при транспортуванні.

6.3. Прання та заміну робочого одягу із зони детекції продуктів ампліфікації проводять окремо від одягу з інших зон.

Забороняється одночасно проводити прання спецодягу з різних зон.

Здавати використаний і видавати чистий спецодяг слід дотримуючись поточності і розділивши ці операції у часі.

6.4. Захисні окуляри, змінне взуття протирають розчином дезінфекційного засобу і проводять ультрафіолетове опромінення вологих поверхонь протягом 1 години.

7. Вимоги до обробки приміщень і знезараження матеріалу в ПЛР-лабораторії

7.1. Всі дезінфекційні засоби, що застосовуються в ПЛР-лабораторії, повинні бути зареєстровані МОЗ України відповідно до Порядку державної реєстрації (перереєстрації) дезінфекційних засобів, затвердженого [постановою Кабінету Міністрів України від 03.07.2006 N 908](#), та Порядку організації роботи з державної реєстрації (перереєстрації) дезінфекційних засобів та видачі реєстраційного свідоцтва, затвердженого [наказом МОЗ України від 06.11.2006 N 739](#), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 17.11.2006 за N 1213/13087.

Дезінфекційні засоби повинні використовуватись за призначенням і відповідно до режиму використання.

7.2. Знезараження матеріалу, підозрюваного на інфікованість мікроорганізмами I - IV груп патогенності, проводять відповідно до ДСП 9.9.5.035.99, [ДСП 9.9.5.-080-2002](#).

7.3. У кімнатах, у яких проводять роботу з виділеними НК, робочі поверхні, обладнання щодня опромінюють ультрафіолетовим промінням протягом 1 години до та після роботи. Підлогу щодня піддають вологому прибиранню із застосуванням дезінфікуючих засобів. Перед початком роботи робочу поверхню боксів додатково обробляють 70 % етиловим спиртом. Щомісяця з метою профілактики протирають робочі поверхні столів і штативи 1 N соляною кислотою.

7.4. На кожному робочому місці розташовують спеціальний контейнер з дезінфекційним розчином, у який скидають одноразовий пластиковий посуд (пробірки у відкритому стані, наконечники). Після відповідної експозиції розчин зливають у каналізаційну мережу, а відпрацьований пластик упаковують у термостійкий пакет для подальшого знезараження під тиском 0,2 МПа (2,0 кГс/см²) при температурі (132 ± 2)° С протягом 60 хвилин. Після автоклавування пакет може бути утилізований на полігоні побутових відходів.

7.5. Колби-пастки, штативи для пробірок та наконечників занурюють у дезінфекційні розчини. Усі предмети повинні перебувати в безпосередньому контакті з дезінфекційним засобом, навкруги предмета не повинно бути бульбашок повітря.

7.6. Відпрацьовані гелі та буфер з електрофоретичної камери поміщають у пластикову 5-літрову ємкість з кришкою, яка щільно загвинчується. Додають таку ж саму за об'ємом кількість 0,5 М розчину калію перманганату і 2,5 М розчину соляної кислоти. Акуратно перемішують і залишають при кімнатній температурі на 4 - 6 годин. Потім додають 1 об'єм 2,5 М розчину натрію гідроксиду, акуратно перемішують. Нейтралізовані реактиви зливають у каналізацію.

Для нейтралізації можна використовувати й інший спосіб: до 100 см³ відпрацьованого буфера додати 100 мг порошку активованого вугілля, залишити розчин на 1 годину при кімнатній температурі, періодично помішуючи, після чого профільтрувати рідину. Фільтрат може бути злитий у каналізацію, а фільтр з вугіллям слід запакувати у пластиковий пакет і помістити у контейнер для захоронення на полігоні токсичних відходів.

7.7. Обробку автоматичних дозаторів здійснюють двічі на рік (при необхідності частіше). Автоматичні дозатори в лабораторіях, які працюють з матеріалом, підозрілим на вміст збудників I - II груп патогенності розбирають, обробляють мийним розчином для видалення жирового забруднення, після чого залишки мийного засобу видаляють серветкою, змоченою водою. Потім проводять обробку 1 N соляною кислотою (час експозиції - 1 година). Залишки розчину ретельно видаляють серветкою, змоченою водою, і проводять знезараження вологих поверхонь ультрафіолетовим промінням упродовж 1 години. Після закінчення обробки дозатори збирають і проводять калібрування відповідно до інструкції виробника з експлуатації відповідного приладу.

В інших випадках обробку автоматичних дозаторів проводять згідно з інструкцією виробника, користуючись для деконтамінації 70 % етанолом, або спеціальними розчинами для деконтамінації, рекомендованими в інструкціях з експлуатації приладу.

Дозатори, які можна автоклавувати (бажано використовувати саме такі), знезаражують паром під тиском 0,2 МПа при температурі (132 + 2)° С протягом 60 хвилин.

8. Правила роботи в боксах біологічної безпеки при виділенні НК

8.1. Для запуску в роботу нового боксу біологічної безпеки всі його поверхні необхідно вимити мийним засобом, потім ретельно змити чистою водою, обробити розчином дезінфектанту (витримати експозицію відповідно до нормативного документу на конкретний дезінфекційний засіб), знову змити стерильною водою, обробити 70 % етанолом і піддати ультрафіолетовому опроміненню.

8.2. Перед початком роботи боксу для знезараження повітря у ньому його включають і залишають працювати впродовж 1 години в режимі максимальної фільтрації.

8.3. Кожний бокс укомплектовують набором необхідного для роботи обладнання, ємкістю для лабораторних відходів, розчином 70 % етанолу та робочим розчином дезінфектанту.

8.4. Кількість апаратури та матеріалів у боксі повинна бути мінімальною.

8.5. Перед початком роботи всі робочі поверхні протирають 70 % етанолом. Особливо обробляють етанолом дозатори, вортекс, термостат, центрифугу (особливо ретельно ті місця, до яких найчастіше в процесі роботи торкаються руками або ємкостями з клінічним матеріалом).

Категорично заборонено проводити обробку робочих поверхонь однією серветкою.

8.6. Під час роботи слід максимально обмежити рух персоналу за спиною спеціаліста, що працює в боксі безпеки.

Працівнику, що працює в боксі, не слід порушувати повітряний потік неодноразово виймаючи і знову вводячи руки в бокс. Рухи повинні бути плавними і перпендикулярними

площині відкритої передньої частини. Маніпуляції з матеріалом починають тільки через хвилину після того, як руки просунуті в середину боксу, для того, щоб порушений потік повітря заспокоївся і почав обтікати руки.

Усі роботи повинні проводитися на середній або задній частині "столішниці" боксу і бути видимими через оглядову панель.

Жодна решітка не повинна блокуватися записами, піпетками або іншими матеріалами, оскільки це порушує повітряний потік і може викликати контамінацію матеріалу та оператора.

Документи не слід поміщати усередину боксу безпеки.

8.7. Під час проведення маніпуляцій на вортексі та в мікроцентрифузі штативи для наконечників, флакони та пробірки повинні бути закритими.

8.8. При протіканні пробірки з клінічним матеріалом у процесі роботи слід перенести вміст у чисту пробірку, а непотрібну пробірку скинути в окрему ємкість для інфікованого матеріалу.

8.9. У кінці роботи одягають нові одноразові рукавички і проводять обробку 70 % етанолом усіх робочих поверхонь, як і перед початком роботи.

8.10. Після завершення робочої зміни ємкість з відпрацьованими наконечниками звільняють. Усі предмети всередині боксу, включаючи обладнання, повинні бути деконтаміновані. Обробку проводять робочим розчином дезінфектанту з відповідною експозицією, після чого протирають одноразовими серветками, змоченими стерильною водою для зняття залишків дезінфекційного засобу.

8.10.1. Через наконечник відсмоктувача в кінці роботи пропускають дезінфекційний розчин, шланг відсмоктувача зовні обробляють серветкою, змоченою у дезінфекційному розчині.

8.10.2. Вимикають усі електричні прилади в боксі та відсмоктувач.

8.10.3. Протирають 70 % етанолом ручки боксу та вимикачі панелі управління боксу. Закривають бокс і вмикають ультрафіолетове опромінення на 1 годину.

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

9.1. Висока чутливість методу ПЛР зумовлює його найбільшу проблему - можливість отримання хибнопозитивних результатів унаслідок потрапляння із зовнішнього середовища в реакційну суміш молекул НК або її фрагментів, здатних бути матрицями в реакції ампліфікації. Джерелом хибних результатів можуть бути перехресна контамінація між пробами в процесі отримання НК або при постановці ПЛР, забруднення досліджуваних зразків позитивними контролями, але найчастіше - є контамінація продуктами ампліфікації попередніх досліджень.

Навіть поодинокі молекули ДНК можуть бути багато разів копійовані в процесі ПЛР, приводячи до утворення цільового ДНК-продукту, а отже, до хибнопозитивного результату.

Хоча більшість причин хибнопозитивних результатів є наслідком внутрішньолабораторної контамінації, не варто скидати з рахунку і забруднення, що відбуваються поза лабораторією під час збору зразків, їх первинної обробки (фасування, пакування, транспортування), оскільки саме на цих стадіях найскладніше забезпечити стерильні умови роботи.

9.2. Існує декілька способів профілактики внутрішньолабораторної контамінації. Для мінімізації ризику отримання хибних результатів необхідно, насамперед, територіально розмежувати різні стадії аналізу, тобто правильно спланувати розміщення лабораторії. Крім того, розроблено метод з використанням урацил-ДНК-глікозилази (далі - УДГ). Цей фермент здатний вищеплювати з ДНК урацил. З цією метою до суміші трифосфатів додають урацил, який в процесі ПЛР вбудовується в ампліфіковану ДНК і служить мішенню для УДГ. Якщо амплікони від попередньої реакції потраплять у щойно приготовану суміш, що містить УДГ, у них буде вищеплено урацил і подальше прогрівання до 95° С призведе до деградації ампліконів. УДГ є активною при температурі 20 - 50° С, тому вона не руйнує амплікони під час ПЛР, але вимагає ретельного підбору концентрації фермента і негайного проведення електрофорезу або ПФА після закінчення ампліфікації.

9.3. Використання методики постановки ПЛР без етапу детекції, коли необхідно відкривати пробірки, дозволить уникнути ризику розповсюдження ампліконів у зовнішньому середовищі. Існують тест-системи з флуоресцентною детекцією. У цьому випадку використовуються гібридаційні олігонуклеотидні зонди, мічені флуорофорами, і реєструється флуоресценція, яка з'являється тільки при наявності специфічного продукту.

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

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

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

9.6. Проведення ПЛР-досліджень до завершення деконтамінаційних заходів і отримання негативних результатів внутрішньолабораторного контролю не допускається.

9.7. Порядок дій персоналу при контамінації ПЛР-лабораторії НК наведений нижче.

9.7.1. Співробітників, які проводять деконтамінаційні заходи, забезпечують одноразовими халатами, шапочками, бахілами і рукавичками, одноразовими ганчірками, ємкостями для приготування необхідних кількостей мийних і дезінфекційних розчинів.

9.7.2. Кожну зону ПЛР-лабораторії обробляють працівники, які в ній працюють.

9.7.3. Для обробки кожної зони використовують новий набір інвентарю для прибирання.

9.7.4. Кожну зону ПЛР-лабораторії розбивають на ділянки прибирання, наприклад:

ділянка 1 - бокс біологічної безпеки і обладнання всередині нього;

ділянка 2 - зовнішні поверхні боксу біологічної безпеки;

ділянка 3 - шафи для витратних матеріалів;

ділянка 4 - холодильники для зберігання реактивів, зразків (проб);

ділянка 5 - обладнання, яке використовують у роботі, але яке розташоване поза боксом біологічної безпеки;

ділянка 6 - поверхні приміщення (стіни, вікна, батареї, стеля, двері тощо);

ділянка 7 - підлога.

9.7.5. Перед початком обробки персонал одягає одноразовий одяг, бахіли, шапочки, рукавички; готує мийні і дезінфекційні розчини. Обробку проводять послідовно пересуваючись від однієї ділянки до іншої. Кожну ділянку обробляють окремими ганчірками.

9.7.6. Поверхні кожної ділянки на початку обробляють мийним розчином для видалення жирових забруднень, після чого залишки мийного засобу видаляють ганчірками, змоченими водою.

9.7.7. Потім на поверхню наносять на 30 хвилин дезінфекційний розчин (наприклад, 0,2 % розчин "Жавель-Клейду" або аналогічні йому, дозволені до застосування з цією метою в установленому порядку).

Залишки дезінфекційного засобу ретельно видаляють серветками, змоченими водою.

9.7.8. Після завершення вказаної обробки проводять знезараження ультрафіолетовими променями вологих поверхонь протягом 1 години.

Заходи, описані в підпунктах 9.7.7 та 9.7.8 пункту 9.7 цих Правил, повторюють ще раз.

9.7.9. Кожний подальший етап обробки проводять у новому одноразовому одязі (халат, шапочка, бахіли, рукавички) з використанням нових ганчірок. Для видалення залишків дезінфекційних засобів, нанесених на поверхню, ганчірки ретельно прополіскують у чистій воді, оброблювану поверхню протирають кілька разів. Після кожного етапу обробки ганчірки слід утилізувати.

9.7.10. Після завершення деконтамінації беруть повторні змиви, які досліджують на наявність НК збудників інфекційних захворювань, діагностику яких найчастіше здійснювали в цій лабораторії, а також на виявлення НК збудників, що мають короткі (менше 300 пар нуклеотидів) специфічні продукти ампліфікації (довжина специфічного фрагмента вказана в інструкціях до тест-систем).

9.7.11. У разі отримання в зразках змивів позитивних результатів ПЛР-аналізу обробку повністю повторюють.

9.7.12. Забруднений витратний матеріал (пробірки, наконечники тощо) утилізують.

10. Контроль якості досліджень і оцінка роботи ПЛР-лабораторії

10.1. Контроль якості досліджень є невід'ємною складовою правильної організації роботи ПЛР-лабораторії. Він включає в себе постійне проведення внутрішньолабораторного контролю якості, передбаченого системою забезпечення якості досліджень, що діє в кожній конкретній лабораторії, і участь в програмах зовнішньої оцінки якості ПЛР-досліджень (професійне тестування).

10.2. Система забезпечення якості роботи ПЛР-лабораторії повинна передбачати систематичне проведення внутрішньолабораторного контролю якості дезінфекції (деконтамінації).

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

10.4. Для оцінки якості деконтамінаційних заходів та виявлення можливої контамінації лабораторії НК або продуктами ампліфікації контроль проводять шляхом відбору змивів з поверхонь. Змиви з поверхонь беруть стерильними ватними тампонами (мінімальний розмір площі 10 x 10 см). Перед відбором змивів тампони змочують стерильним фізіологічним розчином або ТЕ-буфером (10 mM Tris, 1 mM EDTA), після чого обертальними рухами протирають робочі поверхні обладнання, меблів, дверних ручок, телефонів тощо. Особливу увагу приділяють приміщенням, які відвідують усі співробітники лабораторії (кімнати прийому їжі, туалет тощо). Після відбору змиву тампон поміщають у мікропробірки типу "епендорф" з 300 - 400 мкл ТЕ-буфера, обертальними рухами змивають відібраний матеріал протягом 10 - 15 секунд, уникаючи розбризкування розчину, і, відтиснувши надлишок рідини з тампону об стінки пробірки, видаляють.

Одержані суспензії центрифугують при 8000 g (12000 об/хв) протягом 1 хвилини. Надосадову рідину відбирають наконечником з аерозольним бар'єром в мікропробірку об'ємом 1,5 мл. Для виділення НК використовують 0,1 - 0,2 мл надосадової фракції.

10.5. Для дослідження слід обирати тест-системи з внутрішнім контрольним зразком. Постановка негативних контролів при виділенні НК і проведенні реакції обов'язкова. Це дозволить своєчасно виявити контамінацію в лабораторії.

10.6. Керівник ПЛР-лабораторії або фахівець, на якого покладені функції контролю якості (менеджер з якості), періодично проводить тестування працівників шляхом надання контрольних задач (внутрішній контроль якості досліджень).

10.6.1. Як "позитивні" можуть бути використані:

- зразки, штучно контаміновані НК;
- зашифровані проби матеріалу, уже дослідженого в лабораторії раніше, які зберігалися при температурі мінус 20° С не більше тижня. У цих пробах визначають НК тих самих збудників, що при первинному дослідженні;
- атестовані контрольні панелі, що містять "позитивні" і "негативні" проби.

Як "негативні" - зразки, що не містять НК, наприклад, ДНК-буфер.

Кількість проб залежить від об'єму проведених досліджень і повинна бути достатньою для оцінки роботи співробітників і виявлення контамінованих ділянок лабораторії.

Результати внутрішнього контролю якості ПЛР-досліджень реєструють відповідно до форми N 410/о "Журнал внутрішнього контролю якості лабораторних досліджень", затвердженої [наказом МОЗ України від 11.07.2000 N 160](#).

10.7. При проведенні зовнішньої оцінки якості досліджень лабораторія-учасник отримує атестовані контрольні панелі, що містять "позитивні" і "негативні" проби.

За результатами розшифровки атестованих контрольних панелей роблять висновок щодо оцінки якості ПЛР-досліджень.

Про результати зовнішнього лабораторного контролю необхідно інформувати установи Державної санітарно-епідеміологічної служби України та Референс-центр з молекулярної діагностики інфекційних хвороб МОЗ України.

10.8. Основними критеріями оцінки якості роботи ПЛР-лабораторії є результати внутрішнього і зовнішнього лабораторного контролю якості досліджень, а також відсутність випадків лабораторної контамінації НК.

**Директор
Департаменту державного
санітарно-епідеміологічного
нагляду МОЗ України**

А. М. Пономаренко

"Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами"

Мінімальний перелік обладнання ПЛР-лабораторії

Для обробки матеріалу і виділення НК

1. Бокс біологічної безпеки не нижче II класу.
2. Центрифуга клінічна для пробірок об'ємом 5 - 100 мл.
3. Центрифуга-вортекс.
4. Мікроцентрифуга від 12 до 16000 g для пробірок об'ємом 1,5 мл.
5. Твердотільний термостат для пробірок об'ємом 1,5 мл з діапазоном робочих температур 25 - 100° C.
6. Вакуумний відсмоктувач з колбою-пасткою.
7. Набір автоматичних піпеток змінного об'єму (мінімум 3 піпетки: до 20 мкл, до 200 мкл і до 1000 мкл).
8. Одноразові поліпропіленові мікроцентрифужні пробірки з кришками, що загвинчуються або щільно закриваються, об'ємом 1,5 мл.
9. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму з аерозольним бар'єром до 20, 200 та 1000 мкл.
10. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму до 200 мкл.
11. Штативи для наконечників та мікропробірок об'ємом 1,5 мл.
12. Холодильник з камерами, що підтримують температуру плюс $(6 \pm 2)^\circ \text{C}$ та мінус $(18 \pm 2)^\circ \text{C}$ (при необхідності - мінус 70°C).
13. Ємкість з дезінфекційним розчином.

Для приготування ПЛР-суміші і проведення ампліфікації

1. Настільний ПЛР-бокс з бактерицидною лампою.
2. Ампліфікатор (термоциклер).
3. Центрифуга-вортекс.
4. Детектор флуоресценції типу "Джин" або "Ала 1/4" (у разі потреби).

5. Твердотільний термостат (у разі потреби приготування реакційних пробірок для "гарячого старту" з окремих компонентів).
6. Набір автоматичних піпеток змінного об'єму (мінімум 2 шт.).
7. Одноразові поліпропіленові пробірки для ампліфікації об'ємом 0,5 або 0,2 мл (залежно від марки ампліфікатора).
8. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму з аерозольним бар'єром до 20 та 100 мкл.
9. Штативи для наконечників та мікропробірок на 0,5 або 0,2 мл.
10. Холодильник з камерами, що підтримує температуру плюс $(6 \pm 2)^\circ \text{C}$ та мінус $(18 \pm 2)^\circ \text{C}$.
11. Ємкість для відпрацьованих витратних матеріалів.

Для електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР

1. Камера для горизонтального електрофорезу.
2. Джерело постійного струму з напругою 150 - 460 В.
3. Трансільюмінатор з кабінетом або камерою для перегляду гелів.
4. Відеосистема з цифровою відеокамерою для реєстрації результатів.
5. Комп'ютер для аналізу результатів електрофорезу та передачі їх до "чистої" зони.
6. Мікрохвильова піч для плавлення агарози.
7. Колба конічна з термостійкого скла для плавлення агарози об'ємом 250 мл.
8. Мірні циліндри об'ємом 1 л та 100 мл.
9. Штатив для мікропробірок на 0,5 або 0,2 мл.
10. Окрема автоматична піпетка до 20 мкл.
11. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму до 20 мкл.
12. Холодильник з камерою, що підтримує температуру плюс $(6 \pm 2)^\circ \text{C}$.
13. Ємкості для відпрацьованих витратних матеріалів, дезактивації буферу та гелів з бромистим етидієм.

Для детекції продуктів ПЛР методом ГІФА

1. Термостат планшетний, що підтримує температуру 37°C .
2. Вошер (не обов'язково).

3. Планшетний спектрофотометр.
4. Комп'ютер (повинен бути зв'язаний через комп'ютерну мережу з комп'ютером, розташованим у "чистій" зоні, застосовується для аналізу результатів гібридизації).
5. Восьмиканальна піпетка до 200 мкл та до 50 мкл.
6. Окремий набір одноканальних автоматичних піпеток змінного об'єму.
7. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму.
8. Мірний циліндр об'ємом 1 л, 10 мл та 100 мл.
9. Холодильник з камерою, що підтримує температуру плюс $(6 \pm 2) ^\circ \text{C}$.
10. Ємкість для відпрацьованих витратних матеріалів.

Додаток 2
до Державних санітарних норм і правил
"Організація роботи лабораторій при
дослідженні матеріалу, що містить
біологічні патогенні агенти I - IV груп
патогенності молекулярно-генетичними
методами"

**Примірний перелік
обладнання ПЛР-лабораторії для проведення досліджень методом NASBA-
Real-Time**

Для обробки матеріалу і виділення НК

1. Бокс біологічної безпеки не нижче II класу.
2. Центрифуга клінічна для пробірок об'ємом 5 - 100 мл.
3. Центрифуга-вортекс.
4. Мікроцентрифуга від 12 до 16000 g для пробірок об'ємом 1,5 мл.
5. Твердотільний термостат для пробірок об'ємом 1,5 мл з діапазоном робочих температур 25 - 100° C.
6. Вакуумний відсмоктувач з колбою-пасткою.
7. Набір автоматичних піпеток змінного об'єму (мінімум 3 піпетки: до 20 мкл, до 200 мкл і до 1000 мкл).

8. Одноразові поліпропіленові мікроцентрифужні пробірки з кришками, що загвинчуються або щільно закриваються, об'ємом 1,5 мл.
9. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму з аерозольним бар'єром до 20, 200 та 1000 мкл.
10. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму до 200 мкл.
11. Штативи для наконечників та мікропробірок об'ємом 1,5 мл.
12. Холодильник з камерами, що підтримують температуру плюс $(6 \pm 2)^\circ \text{C}$ та мінус $(18 \pm 2)^\circ \text{C}$ (при необхідності - мінус 70°C).
13. Ємкість з дезінфекційним розчином.

Для проведення ампліфікації методом NASBA-Real-Time

1. NucliSens EASYQ аналізатор і програмне забезпечення (версія 2.0 або вище) (bioMerieux) або інший аналізатор, здатний підтримувати цей формат реакції.
2. Настільний ПЛР-бокс з бактерицидною лампою.
3. Ємкість для скидання відпрацьованих наконечників.
4. Стріпи на 8 пробірок 0,2 мл з кришками або пробірки, що відповідають ампліфікатору.
5. Штатив-контейнер для пробірок 0,2 мл з кришкою.
6. Пристрій для закривання пробірок (при необхідності).
7. NucliSens EASYQ інкубатор (bioMerieux - у разі потреби).
8. Міні-центрифуга для стріпованих пробірок (± 6000 об/хв, 2000 g).
9. Окремий набір автоматичних піпеток змінного об'єму (від 5 до 200 мкл).
10. Одноразові стерильні наконечники з аерозольним фільтром у штативах ("RNase-free", "DNase-free").
11. Центрифуга-вортекс.
12. Центрифуга для пробірок на 1,5 мл (до 10000 g).

Додаток 3
до Державних санітарних норм і правил
"Організація роботи лабораторій при
дослідженні матеріалу, що містить
біологічні патогенні агенти I-IV груп
патогенності молекулярно-генетичними

Лист обліку температури в холодильнику (морозильнику)

1. Холодильник _____, зав. N _____, інв. N _____

марка

2. Відповідальний _____

П. І. Б.

3. Призначення _____

4. Температурні параметри (6 ± 2)° C

5. Місяць, рік _____

° C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
10																															
9																															
8																															
7																															
6																															
5																															
4																															
3																															
2																															
1																															
0																															
Відпис відповідальної особи																															

Рекомендації до заповнення листа обліку температури в холодильнику (морозильнику)

У пункті 1 - зазначається марка холодильника, наприклад: "Норд", заводський N, інвентарний номер.

У пункті 2 - указують прізвище та ініціали працівника, який відповідальний за облік температури.

У пункті 3 - зазначають призначення холодильника (морозильника), наприклад: "для зберігання досліджуваних проб" або "для зберігання наборів зворотної транскрипції і ампліфікації НК" тощо.

У пункті 4 - указують температуру, що регламентована, відповідно до підпункту 3.3.8 пункту 3.3 розділу 3 цих Правил, наприклад: $(6 \pm 2)^\circ \text{C}$ або мінус $(18 \pm 2)^\circ \text{C}$ тощо.

У пункті 5 - указують місяць та рік.

У графі " $^\circ \text{C}$ " таблиці зазначають діапазони температур, що регламентовані. Незатемнена зона - діапазон температур для холодильника, де регламентовані параметри $(6 \pm 2)^\circ \text{C}$. Аналогічно робиться лист обліку температури для морозильної камери.

Графи 1 - 31 у першому рядку таблиці означають дні місяця.

У останньому рядку таблиці - підпис співробітника (щодня), який відповідальний за облік температури.

**Директор
Департаменту державного
санітарно-епідеміологічного
нагляду МОЗ України**

А. М. Пономаренко

© Інформаційно-аналітичний центр «ЛІГА», 1991 - 2012
© ТОВ «ЛІГА:ЗАКОН», 2007 - 2012

