

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**MINISTRY OF PUBLIC HEALTH OF UKRAINE  
ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE**

**ІНСТРУКЦІЯ  
З ОРГАНІЗАЦІЇ РОБОТИ ЛАБОРАТОРІЙ З ЗАСТОСУВАННЯ  
ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ВІЛ ТА  
ІНШИХ ГЕМОТРАНСМІСИВНИХ ІНФЕКЦІЙ СТАНЦІЙ  
ПЕРЕЛИВАННЯ КРОВІ (ЦЕНТРІВ КРОВІ)**

**(ПРОЕКТ)**

**INSTRUCTION  
ON ORGANIZATION OF WORK OF LABORATORIES IN  
APPLICATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR REVEALING HIV  
AND OTHER HAEMOTRANSMISSIVE INFECTIONS OF BLOOD  
TRANSFUSION STATIONS (BLOOD CENTRES)**

**ЛЬВІВ 2007  
LVIV 2007**

**Розробник:**

**ДУ “Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України”  
Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького**

**Список виконавців:**

Головний спеціаліст МОЗ України	В.С. Ярошевський
Директор ДУ ІПКТМ АМН України д-р мед. наук, професор, завідувач кафедри гематології та трансфузіології ЛНМУ ім. Данила Галицького	В.Л. Новак
Заступник директора з наукової роботи ДУ ІПКТМ д-р мед. наук, професор	В.О. Логінський
Доцент кафедри гематології та трансфузіології ЛНМУ ім. Данила Галицького, канд. мед. наук	П.В. Гриза
Заступник директора ДУ ІПКТМ з поліклінічної роботи	В.І. Мосейчук

## ВСТУП

В останні роки епідемічна ситуація з ВІЛ/СНІДу, гепатитів В, С та інших інфекційних захворювань, що можуть поширюватись гемотрансмісивним шляхом, тобто через кров, її компоненти та виготовлені з них препарати, в країні продовжує загострюватись. Зростає кількість інфікованих осіб серед потенційних донорів.

Збільшується ризик здавання крові, її компонентів особою, яка є інфікованою і перебуває в стадії “серологічного вікна”, коли специфічні антитіла відсутні або їх кількість ще не виявляється імуноферментними методами діагностики. У такій ситуації існує реальна загроза інфікування реципієнтів через компоненти донорської крові та виготовлені з них препарати.

Останніми десятиліттями спостерігається стрімкий розвиток методів оцінки генетичних особливостей живих систем, серед яких одним із найпотужніших та найчутливіших став метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а тому він отримав широке визнання у світі.

Впровадження в мікробіологічну діагностику ПЛР дало змогу більш точно та швидше оцінити генетичні особливості мікроорганізмів, що покращило ефективність виявлення збудників гепатиту В, С та ВІЛ у донорів крові. Цей метод придатний для виявлення присутності збудників гострих і латентних інфекцій, а також патогенних мікроорганізмів, які важко або неможливо культивувати на поживних середовищах.

Полімеразна ланцюгова реакція використовується з:

1. Виробничою метою – робота з виробництва та контролю геннодіагностичних препаратів (при умові дотримання вимог GMP).
2. Діагностичною метою (дослідження клінічних матеріалів і об'єктів навколишнього середовища).
3. Експериментальною метою.

Виходячи з того, що лабораторія діагностики ВІЛ та інших гемотрансмісивних інфекцій є однією з ланок виробничого процесу в закладах служби крові, основним її завданням є забезпечення інфекційної безпеки донорської крові, її компонентів та виготовлених із них препаратів.

## 1. ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ

1.1. Інструкція з організації роботи лабораторії ПЛР в службі крові:

- встановлює вимоги щодо забору, обліку, приготування та тимчасового зберігання зразків плазми (сироватки) крові донорів на станціях переливання крові (центрах крові) і відділеннях трансфузіології лікувально-профілактичних закладів та установ незалежно від форми власності та підпорядкування;
- регламентує порядок передачі, доставки (транспортування) зразків плазми (сироватки) крові донорів для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції;
- визначає принципи біологічної безпеки громадян та захисту навколишнього середовища від впливу біологічних патогенних агентів (БПА);
- регламентує виконання досліджень із використанням ПЛР – аналізу, який здійснюється тест-системами та устаткуванням, що зареєстровані в Україні, пройшли експертну оцінку та рекомендовані для застосування.

## 2. НОРМАТИВНІ ПОСИЛАННЯ

2.1. Закон України “Основи законодавства України про охорону здоров'я”. Постанова Верховної Ради України від 19.11.1992 р.

2.2. Закон України “Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення”. Постанова Верховної Ради України від 24.02.1994 р.

2.3. Закон України “Про метрологію та метрологічну діяльність”.

2.4. Закон України “Про донорство крові та її компонентів”.

2.5. Закон України “Про захист населення від інфекційних хвороб”.

2.6. Закон України “Про внесення змін до Закону України “Про запобігання захворюванню на СНІД та соціальний захист населення” (з наступними змінами).

2.7. Постанова Кабінету Міністрів України від 22.06.1999 р. №1109 “Положення про державний санітарно-епідеміологічний нагляд в Україні”.

2.8. Постанова Кабінету Міністрів України від 18.12.1998 р. №2026 “Перелік і нормативи застосування засобів індивідуального захисту працівників закладів охорони здоров'я, що проводять діагностичні дослідження на ВІЛ-інфекцію, надають медичну допомогу ВІЛ-інфікованим і хворим на СНІД, а також контактують з кров'ю та іншими біологічними матеріалами від ВІЛ-інфікованих осіб”.

2.9. Постанова Кабінету Міністрів України від 16.10.1998 р. №1642 “Порядок та умови обов'язкового страхування медичних працівників та інших осіб на випадок інфікування ВІЛ під час виконання ними професійних обов'язків, а також на випадок настання у зв'язку з цим інвалідності або смерті від захворювання, зумовленого розвитком ВІЛ-інфекції”.

2.10. Постанова Кабінету Міністрів України від 21.08.2001 р. №1094 “Положення про порядок розслідування і ведення обліку нещасних випадків, професійних захворювань і аварій на виробництві”.

2.11. Наказ МОЗ України від 14.12.1992 р. “Про режим роботи з патогенними мікроорганізмами”.

2.12. Наказ МОЗ України від 22.02.2002 р. №71 “Про затвердження Інструкції з організації роботи лабораторій діагностики ВІЛ-інфекції”.

2.13. Наказ МОЗ України від 25.05.2000 р. №120 “Про удосконалення організації медичної допомоги хворим на ВІЛ-інфекцію / СНІД”.

2.14. ДСП № 9.9.5.035-99. Безпека роботи з мікроорганізмами I-II групи патогенності.

2.15. ДСП № 9.9.5-064-2000. Порядок видачі дозволів на роботу з мікроорганізмами I-IV групи патогенності та рекомбінантними молекулами ДНК.

2.16. Методические указания МУ 1.3.1794-03 “Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности” (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 5 декабря 2003 года) – рекомендаційно.

2.17. Методические указания МУ 1.3.1888-04 “Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности” (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 года) – рекомендаційно.

2.18. СП 1.2.036-95 Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов III-IV групп патогенности, утв. Постановление Госкомсанэпиднадзора России от 28 августа 1995 года № 14 – рекомендаційно.

2.19. ДНАОП №0.03-4.02-94 Положення про медичний огляд працівників певних категорій, затвержені наказом МОЗ України від 31.03.1994 р. №45.

2.20. ДНАОП №0.00-4.26-96 Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту, затвержені наказом Держнаглядохоронпраці від 29.10.1996 р. №170.

2.21. ГОСТ 12.3.002-75. ССБТ “Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки” зі змінами 1980, 1991 рр.

2.22. Наказ МОЗ України від 22.10.1993 р. №223 “Про затвердження інструкції про збір, знезараження, зберігання і здачу використаних медичних виробів одноразового застосування із пластичних мас”.

2.23. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях (второе издание) ВОЗ, Женева, 1994 г.

2.24. ДСП № 9.9.5-080-2002. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю, затвержені постановою Головного державного санітарного лікаря України від 28.01.2001 № 1.

2.25. Наказ МОЗ України від 24.04.99 № 97 “Про затвердження Положення про порядок спеціалізованої оцінки (експертизи) та обліку дезінфекційних засобів в Україні та Положення про обліковий перелік дезінфекційних засобів в Україні”.

### 3. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

3.1. ПЛР являє собою процес багаторазового збільшення числа копій (ампліфікації) фрагментів ДНК-мішені (кДНК), що каталізується *in vitro* термостабільною ДНК-полімеразою, і дозволяє знайти (виявити) специфічну ділянку геному біологічного агента. ПЛР – це один із методів лабораторної молекулярної діагностики.

3.2. ПЛР характеризується високою чутливістю та специфічністю. Забезпечує можливість роботи практично з будь-яким видом біологічного матеріалу.

3.3. Тривалість дослідження методом ПЛР становить 4-8 год.

3.4. Аналітична чутливість тест-систем для виявлення ДНК (РНК) мікроорганізмів методом ПЛР складає  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^4$  м.к. (геномеквівалент/мл), специфічність – 85-100 %.

3.5. За результатами аналізу надають попередню відповідь про наявність у пробі специфічних ділянок (фрагментів) ДНК або РНК, що мають гомологію з відповідними ділянками геному збудника того чи іншого інфекційного захворювання.

3.6. ІФА – скринінг донорської крові на маркери ВІЛ, HCV, HBV є обов'язковим у всьому світі, а в країнах Європи, США, Канаді, Японії, Австралії плазма (сироватка) і кров донорів додатково підлягає NAT- скринінгу з метою вибраковування донацій, отриманих від донорів, що перебувають в періоді “серологічного вікна”.

3.7. Біологічні патогенні агенти (БПА) – патогенні для людини мікроорганізми, генно-інженерно-модифіковані мікроорганізми, отрути біологічного походження (токсини), гельмінти, які можуть викликати захворювання, інтоксикацію або загибель людини чи тварини, а також матеріал (враховуючи кров, її компоненти, інші біологічні рідини організму), підозрілий на вміст перерахованих агентів.

3.8. Донорська кров та її компоненти належать до біологічних патогенних агентів і розглядаються як потенційно небезпечний матеріал.

3.9. Віруси ВІЛ 1, 2, 3, 4, ВГВ, ВГС належать до II групи патогенності (небезпеки), збудник сифілісу – до III групи патогенності (небезпеки).

3.10. Забір зразків крові (плазми) на дослідження методом ПЛР на наявність маркерів інфекційних захворювань дозволяється в акредитованих закладах і установах служби крові України, що мають відповідну ліцензію на певний вид господарської діяльності за конкретними медичними спеціальностями з підготовленим медичним персоналом.

3.11. Забір зразків крові (плазми, сироватки) донорів для проведення досліджень методом ПЛР пов'язаний з необхідністю забезпечення дотримання вимог біологічної безпеки і недопущення забруднення навколишнього середовища, запобігання контамінації зразків нуклеїновими кислотами іншого походження.

3.12. ПЛР – скринінг донорської крові на наявність маркерів ВІЛ, ВГВ, ВГС проводиться у всіх донаціях крові (плазми) поряд з обов'язковим проведенням дослідження (скринінгу) донацій методом ІФА на наявність маркерів чотирьох гемотрансмісивних інфекцій (ВІЛ/СНІД, ВГВ, ВГС, сифіліс).

#### 4. ПРИНЦИП І МЕХАНІЗМ ПЛР ТА ЇЇ ПЕРЕВАГИ

4.1. Нуклеїнові кислоти (ДНК та РНК) є універсальними носіями генетичної інформації. В основі ПЛР лежить комплементарна добування ДНК-матриці *in vitro* в присутності ферменту термостабільної ДНК-полімерази із чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів, які є структурними компонентами будь-якої ДНК, і коротких олігонуклеотидних затравок.

4.2. Комплементарна добування ланцюга починається не в будь-якій точці, а тільки в певному стартовому блоці. Для утворення такого стартового блока в заданих ділянках ДНК використовують дві олігонуклеотидні затравки (розміром 20-30 нуклеотидних пар), які називаються праймерами. Праймери комплементарні послідовності ДНК на лівій і правій межі специфічного фрагмента і орієнтовані так, що добування нового ланцюга ДНК відбувається тільки між ними. Для проведення реакції використовуються два праймери, які обмежують з двох боків (фланкують) заздалегідь обрану специфічну ділянку подвійної спіралі ДНК, яку треба виявити, – один праймер приєднується до однієї, а другий – до іншої нитки нуклеїнової кислоти. При проведенні реакції ця обрана, специфічна для даного організму ділянка геному, ампліфікується (помножується) шляхом багаторазового копіювання нуклеотидної послідовності. Утворення в результаті ПЛР фрагментів ДНК певного розміру і послідовності свідчить про наявність у пробі, що досліджується, підозрюваного мікроорганізму.

4.3. В ході реакції виділяють три стадії, які потребують певних температурних режимів: денатурація (або плавлення) – розплетення подвійної спіралі і розходження комплементарних ниток ДНК, відбувається при температурі 93-95 °С; приєднання праймерів (або відпалювання) до одноститкових ланцюгів ДНК (матриць) відбувається при температурі 50-65 °С; синтез (або елонгація) – нарощування фрагментів ДНК в присутності термостабільної ДНК-полімерази на матриці з приєднаними до неї праймерами. Цей процес відбувається при температурі 72 °С. Повторюючи ці три стадії 30-40 разів, протягом 2-3 год отримують мільйони копій специфічної ділянки ДНК мікроорганізму.

4.4. Метод ПЛР має низку переваг:

- висока специфічність, яка зумовлена нуклеотидною послідовністю праймерів;
- висока чутливість методу (10-1000 клітин в пробі);
- швидкість отримання результату дослідження (до 4-6 год, тобто протягом робочого дня);
- можливість діагностики не тільки гострих (маніфестних) форм захворювання, але й латентних;
- для ПЛР-дослідження придатний будь-який матеріал (тампони з мазками, кров, сеча тощо), виділення чистої культури не обов'язкове;
- досліджуваний матеріал може бути продезінфікований хімічними або термічними методами в момент відбору, що дозволяє виключити можливість інфікування персоналу в ході проведення ПЛР.

4.5. Існує декілька варіантів проведення ПЛР:

- якісні методи виявлення, які свідчать про наявність або відсутність очікуваного фрагмента геному;
- напівкількісні методи виявлення, які дають змогу визначити орієнтовну кількість очікуваного фрагмента геному;
- кількісні методи виявлення, які дають змогу визначити точну кількість очікуваного фрагмента геному в пробі.

Найпоширенішим на даному етапі впровадження є якісний метод – найпростіший, економний, досить чутливий, специфічний та відтворювальний.

## 5. ЗАВДАННЯ ТА ФУНКЦІЇ ЛАБОРАТОРІЇ

5.1. Лабораторія проводить первинний скринінг донорської крові на наявність маркерів гемотрансмісивних інфекцій (ВІЛ-інфекція, гепатити В і С, сифіліс тощо).

5.2. Робота лабораторії планується і здійснюється відповідно до плану роботи станції переливання крові (центру крові), враховується кількість аналізів, штатний розклад.

5.3. Лабораторія повинна бути забезпечена відповідними приміщеннями, обладнанням, мати “Паспорт лабораторії”, “Положення про лабораторію”, “Настанову з якості”, “Галузь атестації” та інші документи атестації.

5.4. Проведення лабораторних досліджень крові донорів організовується відповідно до даної Інструкції та інструкцій з використання конкретної тест-системи.

5.5. Співробітники лабораторії проводять облік роботи у журналі реєстрації результатів обстеження донорської крові на гемотрансмісивні інфекції ф.495о та додатків 1, 2, 4, 5 і щоденно вносять в картки донора ф.431о та ф.432о результати проведених досліджень.

5.6. Співробітники лабораторії регулярно проводять внутрішньо-лабораторний контроль якості роботи, а також беруть участь в періодичних міжлабораторних контролях якості.

5.7. Лабораторія складає та подає щомісячні звіти про кількість та результати досліджень (в міську, обласну СЕС чи в Центр профілактики СНІДу), а також щоквартальний звіт, який надсилає в Центр з питань інфекційної безпеки донорської крові, її компонентів та виготовлених з них препаратів.

5.8. Лікарі лабораторії проходять спеціальну підготовку та підвищують свою кваліфікацію з питань діагностики гемотрансмісивних інфекцій методом ПЛР на курсах вдосконалення лікарів, а також на курсах стажування та інформації Центру з питань інфекційної безпеки донорської крові, її компонентів та виготовлених з них препаратів. Навчання середнього медичного персоналу проводять лікарі на місцях або на курсах вдосконалення середнього медичного персоналу.

5.9. Співробітники лабораторії повинні суворо дотримувати правил протиепідемічного режиму, техніки безпеки, особистої гігієни, внутрішнього трудового розпорядку, а також протипожежних правил. Відповідальність за це покладається на завідувача лабораторії (відповідального лікаря).

5.10. Співробітники лабораторії підлягають диспансеризації, обстеженню на наявність маркерів гемотрансмісивних інфекцій (ВІЛ-інфекція, гепатити В і С, сифіліс) 2 рази на рік та обов'язковому державному стахуванню.

## 6. ПОРЯДОК ЗАБОРУ ЗРАЗКІВ ДОСЛІДЖУВАНОВОГО МАТЕРІАЛУ

6.1. Взяття матеріалів проводять згідно з інструктивно-методичною документацією, яка регламентує виконання досліджень для кожного виду збудників інфекцій.

6.2. Кров. Використання плазми крові допустиме для проведення кількісних та якісних досліджень, використання сироватки крові – тільки для проведення якісних досліджень методом ПЛР.

6.3. Взяття матеріалу. Для отримання плазми забір крові проводиться натще з ліктьової вени одноразовою голкою (діаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовий шприц об'ємом 5 мл або спеціальну вакуумну систему "Venoject" або Vacutainer і т.ін. (з 6 % розчином ЕДТА або цитратом натрію). При заборі в шприц кров з нього обережно (без утворення піни) переносять в одноразову пластикову пробірку з антикоагулянтом (6 % розчин ЕДТА у співвідношенні 1:20 або 3,8 % розчин цитрату Na у співвідношенні 1:9). Гепарин як антикоагулянт використовувати забороняється. Пробірку закривають корком і обережно збовтують декілька разів (для змішування з антикоагулянтом).

6.4. Для отримання сироватки забір крові проводять натще з ліктьової вени одноразовою голкою (діаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовий шприц об'ємом 5 мл або в скляну пробірку типу Vacuette без антикоагулянту. При взятті в шприц кров з нього обережно (без утворення піни) переносять в одноразову скляну пробірку.

## 7. ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА ПРОБ

7.1. Попередня обробка проб перед дослідженням або доставкою (транспортуванням) в ПЛР-лабораторії проводиться у лабораторії закладу (установи) служби крові або в клініко-діагностичній лабораторії лікувально-профілактичного закладу, де проводилося здавання крові донором після реєстрації у спеціальному журналі лабораторії.

7.2. Плазму крові отримують центрифугуванням пробірок із цільною кров'ю при 800-1600g (3000 об/хв) протягом 20 хв при кімнатній температурі.

7.3. Плазму відбирають у кількості не менше 1 мл окремим наконечником з аерозольним бар'єром (пастерівськими піпетками) в стерильні пробірки об'ємом 1,5 мл.

7.4. Для отримання сироватки пробірки з кров'ю відстоюють при кімнатній температурі протягом 30 хв до повного утворення згустка.

7.5. Після чого згусток обводять пастерівською піпеткою і залишають при кімнатній температурі до утворення сироватки.

7.6. При іншому варіанті кров із згустком центрифугують при 800-1600g (3000 об/хв) протягом 10 хв при кімнатній температурі.

7.7. Потім сироватку в кількості 1 мл переносять окремим наконечником з аерозольним бар'єром (пастерівськими піпетками) в стерильні пробірки об'ємом 1,5 мл.

7.8. Маркування (перемаркування) пробірок послідовно переноситься в ході роботи.

7.9. Відповідність за якістю попередньої підготовки проб покладається на завідувача лабораторії, де проводилася ця підготовка.

## 8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ ЗРАЗКІВ КРОВІ

8.1.1. Зразки цільної крові зберігаються:

- при температурі 2-25 °С – протягом 6 год від часу взяття матеріалу для кількісного визначення нуклеїнових кислот; протягом 12 год – для якісного визначення нуклеїнових кислот;

- при температурі 2-8 °С – протягом 1 доби для якісного визначення ДНК/РНК інфекційних агентів.

8.1.2. Недопустиме заморожування зразків цільної крові.

8.1.3. Зразки плазми і сироватки зберігаються:

- при температурі 2-8 °С – протягом 5 діб;

- при температурі мінус 20 °С – 1 рік;

- при температурі мінус 70 °С – тривалий термін (10-15 років).

8.1.4. Допускається тільки однократне заморожування – відтаювання матеріалу, тому зразки плазми або сироватки для довготривалого зберігання бажано розлити невеликими порціями (0,1-0,2 мл) в окремій стерильній пробірці 1,5 мл.

8.1.5. Транспортування досліджуваного матеріалу здійснюється в спеціальному термоконтейнері з охолодженими елементами.

## 9. ВИМОГИ ДО ОРГАНІЗАЦІЇ РОБОТИ ЛАБОРАТОРІЇ ПЛР

9.1. Не дозволяється проведення досліджень методом ПЛР у приміщеннях, де проводять роботи з накопичення патогенних біологічних агентів (ПБА).

9.2. Роботу з ПБА методом ПЛР виконують спеціалісти з вищою та середньою спеціальною освітою, які пройшли підготовку на ліцензованих курсах спеціалізації (підвищення кваліфікації) з молекулярно-генетичних методів діагностики.

9.3. Персонал допускається до роботи з ПБА тільки після проведення інструктажу з виконання вимог біологічної безпеки.

9.4. В ПЛР-лабораторії, яка виконує роботу з ПБА, використовують дезінфікуючі речовини, дозволені до використання у встановленому порядку.

9.5. Кожне приміщення для проведення досліджень методом ПЛР має бути оснащено індивідуальним набором відповідного лабораторного устаткування, розхідного матеріалу та одягу, що використовується тільки в даному приміщенні.

9.6. При проведенні досліджень методом ПЛР виконуються такі правила послідовної обробки матеріалу:

9.6.1. Весь матеріал, який надходить у лабораторію, направляють в кімнату приймання матеріалу.

9.6.2. Матеріал, який надходить в лабораторію, маркують і реєструють в спеціальному журналі.

9.6.3. Первинну обробку матеріалу (взяття, маркування, центрифугування і т.ін.) проводять тільки в кімнаті приймання біологічного матеріалу.

9.6.4. У приміщення виділення нуклеїнових кислот матеріал доставляють тільки в зачинених одноразових пробірках у вигляді маркованих аліквот.

9.6.5. Передавання і доставка аліквотпроб обробленого та знезараженого матеріалу, а також пробірки з продуктами ПЛР з одного приміщення в інше транспортуються в зачинених металевих або пластмасових контейнерах.

9.6.6. Після проведення детекції та обліку результатів дослідження пробірки з продуктами ПЛР і використання наконечників з мікродозаторами підлягають первинній обробці дезінфікуючими розчинами, які викликають деградацію ДНК (наприклад: 0,2 % розчин ДП-2Т або інші аналогічні цьому, дозволені до використання з цією метою у встановленому порядку). Процедура проводять безпосередньо в кімнаті обліку результатів ампліфікації.

9.6.7. Кінцеву дезактивацію використаних розхідних матеріалів і реагентів (гель, буфер для електрофорезу) проводять в автоклавній кімнаті.

9.6.8. Дотримують поточність руху досліджуваного матеріалу і його продуктів (проб ДНК або РНК, продуктів ПЛР).

9.7. Суворо дотримуються умов зберігання всіх реагентів і зразків ДНК згідно з інструкцією до наборів реагентів. Зразки ДНК зберігають окремо від реагентів. Не дозволяється використання реагентів із закінченим терміном зберігання та в умовах, які не відповідають вимогам інструкцій.

9.8. Після закінчення роботи всі об'єкти, які містять БПА, забирають у сховище (холодильник, шафи і т.ін.), всі робочі поверхні в обов'язковому порядку обробляють дезінфікуючими розчинами.

9.9. Залишки ПБА і посуд, який використовувався на етапі приймання, первинної обробки матеріалу, підготовки проб, виділення нуклеїнової кислоти, приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР, збирають в закриті ємності і передають в автоклавну. Злив незнезаражених рідин у каналізаційну систему забороняється.

9.10. Перенос ПБА і використання посуду для знезараження проводиться в закритих ємностях, які виключають інфікування під час транспортування.

9.11. У всіх приміщеннях лабораторії регулярно проводиться вологе прибирання. Кожну робочу зону ПЛР-аналізу забезпечують індивідуальним промаркованим набором прибирального інвентарю. Не дозволяється використання прибирального інвентарю для прибирання інших приміщень.

9.12. Лабораторію забезпечують аптечкою стандартної комплектації для першої медичної допомоги.

## 10. ВИМОГИ ДО ПРИМІЩЕНЬ ТА УСТАТКУВАННЯ ПЛР-ЛАБОРАТОРІЇ

10.1. Приміщення, в яких проводять дослідження на наявність мікроорганізмів I-IV груп патогенності, розміщують в "заразній" зоні лабораторії, яка проводить діагностичні та інші дослідження із вказаними мікроорганізмами.



10.2. При наявності можливості приміщення розміщують у вигляді окремого блоку. При будівництві нових або реконструкції приміщень лабораторію ПЛР розміщують в окремій споруді (ізольованій частині будівлі).

10.3. Робоча зона ПЛР-лабораторії відповідно до етапів ПЛР-аналізу має включати такий мінімальний набір послідовно розміщених самостійних приміщень або окремо видалених робочих зон (у складі інших функціональних приміщень):

- приміщення приймання, розробки, первинної обробки матеріалу;
- приміщення підготовки проб, виділення нуклеїнових кислот;
- приміщення приготування реакційних сумішей, проведення ПЛР і оберненої транскрипції;
- приміщення обліку результатів методом електрофорезу.

10.4. Кімнату для виділення нуклеїнових кислот розміщують поблизу від кімнати приймання матеріалу, приміщення для обліку результатів – по можливості у віддаленому від інших перерахованих приміщень для забезпечення умов, які виключають попадання в них продуктів ампліфікації (ампліконів) з повітряним потоком.

10.5. Не дозволяється виконання ПЛР-досліджень у приміщеннях для проведення робіт із використанням культуральних (накопичення патогенних біологічних агентів) і генно-інженерних методів дослідження.

10.6. Зону приймання, реєстрації, сортування, первинної обробки матеріалу (об'єднання або розділення проб, центрифугування, інактивація і т.ін.) розміщують в кімнаті приймання матеріалу.

10.7. Зону для підготовки проб та виділення нуклеїнових кислот розміщують у боксованому приміщенні (мікробіологічний бокс із передбоксом). У робочій зоні розміщують устаткування і предмети, необхідні тільки для попередньої обробки, виділення нуклеїнової кислоти (додаток 2).

10.8. Зону приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР-ампліфікації розміщують у боксованому приміщенні.

10.9. Роботу з підготовки реакційних сумішей для ПЛР проводять до надходження проб у бокс, які потрапляють з зони виділення нуклеїнових кислот. Зону детекції результатів розміщують у боксованому приміщенні. При відсутності боксованого приміщення роботу проводять в окремій кімнаті, при можливості в ПЛР-боксі.

10.10. При використанні методики “ПЛР в реальному часі” приміщення для детекції не потрібне, оскільки пробірки не відкривають, а детекція продуктів ампліфікації іде безпосередньо із реакційних пробірок (у закритій системі).

10.11. Приміщення ПЛР-лабораторії покривають кафелем (підлога, стіни) або масляною фарбою (стіни, стелі), яка стійка до дії мийних і дезінфікуючих засобів.

10.12. У всіх приміщеннях встановлюють бактерицидні лампи. Додатково рекомендується установити переносного ультрафіолетового бактерицидного випромінювача-рециркулятора.

10.13. Вікна мають бути щільно закриті. Для захисту робочих столів від проникнення прямого сонячного світла використовують світлозахисну плівку з матеріалу, стійкого до дезінфікуючих засобів. Використання жалюзі не рекомендовано в зв'язку з адсорбцією пилу.

10.14. Кожна робоча зона має мати свій набір меблів, лабораторного устаткування, реагентів, автоматичних піпеток, наконечників, пластикового та скляного посуду, захисного одягу, взуття, гумових рукавичок, збирального інвентарю та інших предметів, які використовуються тільки в даному приміщенні (робочій зоні).

10.15. Майно кожної робочої зони повинно бути марковане за вказаною зоною. Використання його в інших приміщеннях або для інших видів дослідження забороняється.

10.16. У робочій зоні має бути свій набір холодильників із такими температурними режимами:

- в кімнаті приймання матеріалу: від 4 до 8 °С, мінус 20 °С і мінус 70 °С (при необхідності тривалого зберігання матеріалу);

- в кімнаті виділення нуклеїнових кислот: від 4 до 8 °С і мінус 20 °С для зберігання наборів виділення нуклеїнових кислот; від 4 до 8 °С – для зберігання препаратів нуклеїнових кислот; не допускається зберігання проб матеріалів або препаратів нуклеїнових кислот в одному холодильнику з компонентами набору для виділення нуклеїнових кислот;

- в кімнаті ПЛР-ампліфікації: від 4 до 8 °С і мінус 20 °С – для зберігання наборів ампліфікації нуклеїнових кислот;

- в кімнаті детекції продуктів ампліфікації: від 4 до 8 °С – для зберігання наборів електрофоретичної детекції.

10.17. Приміщення ПЛР-лабораторії устатковують приточно-витяжною або витяжною вентиляцією, відповідно до вимог “Безпеки роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності”.

10.18. При виконанні ПЛР повітрообмін всередині та між приміщеннями може збільшувати небезпеку контамінації проб внаслідок вірогідного проникнення молекул нуклеїнових кислот і продуктів ампліфікації через фільтр. Зниження цієї небезпеки досягається вказаною вище системою вентиляції лабораторії:

- необхідно повністю виключити повітрообмін між приміщеннями для детекції продуктів ампліфікації з іншими кімнатами ПЛР-лабораторії, а також іншими приміщеннями установи (тиск повітря в приміщенні детекції продуктів ампліфікації повинен бути нижчий, ніж у вказаних приміщеннях);

- при суміжному розміщенні кімнат приймання матеріалу та кімнати виділення нуклеїнових кислот тиск в останній повинен бути не нижчий, ніж в кімнаті приймання матеріалів;

- якщо дві названі кімнати, які входять в пре-ПЛР-приміщення, мають суміжне розміщення з приміщенням для проведення ПЛР, тиск повітря в них має бути нижчий, ніж в ПЛР-приміщенні; при віддаленому розміщенні ПЛР-приміщення тиск повітря в ньому має бути не нижчий, ніж в пре-ПЛР-приміщенні.

10.19. Різниця в тиску повітря в приміщеннях ПЛР-лабораторії створюється за рахунок різниці в кратності повітрообміну в них.

Найменування приміщення	Кратність повітрообміну (куб. м/год)	
	Приток	Витяжка
Зона приймання та первинної обробки матеріалу	5	6
Зона підготовки проб і виділення нуклеїнових кислот	5	6
Зона приготування реакційних сумішей, проведення ПЛР	5	5
Зона обліку результатів методом електрофорезу	5	7

10.20. При відсутності системи вентиляції в пп. 10.17-10.18, зменшення вірогідності контамінації проб досягається засобами для обмеження повітрообміну між приміщеннями ПЛР-лабораторії.

10.21. При необхідності в ПЛР-лабораторії можуть бути встановлені кондиціонери.

## 11. ВИМОГИ ДО ЗАХИСНОГО ОДЯГУ

11.1. Вибір типу захисного одягу проводиться в суворій відповідності до безпеки роботи з мікроорганізмами I-IV груп патогенності і визначається видом збудника, робочої зони ПЛР, оснащенням її боксів, біологічною безпекою.

11.2. Співробітники кожної робочої зони забезпечуються спецодягом: медичними халатами, шапочками, рукавичками та змінним взуттям.

11.3. Приймання та первинна обробка матеріалу, доставленого на дослідження (об'єднання або розділення проб, центрифугування, інактивація та ін.), виконується в захисному одязі, доповненому рукавичками і, при необхідності, респіратором.

11.4. При роботі в приміщенні детекції продуктів ампліфікації необхідно надягати бахіли.

11.5. Надягати та знімати захисний одяг необхідно в передбоксах. У кожному з них має бути окремий комплект захисного одягу та взуття.

11.6. Переміщення одягу з зони в зону категорично забороняється. Рекомендовано використання одноразового одягу.

11.7. Найбільш забрудненими продуктами ампліфікації вважається захисний одяг зони детекції і передусім – гумові рукавички. Перед зняттям одягу необхідно змінити використані рукавички на чисті.

11.8. Обробку одягу з кімнат підготовки проб, ПЛР-ампліфікації і обліку результатів проводять окремо.

## 12. ВИМОГИ ДО ОБРОБКИ ПРИМІЩЕНЬ ТА ЗНЕЗАРАЖЕННЯ МАТЕРІАЛУ

12.1. Обробку приміщень проводять відповідно до безпеки роботи з мікроорганізмами I-IV груп патогенності. В кімнатах, в яких проводять роботу з виділення нуклеїнових кислот, робочі поверхні, штативи, устаткування необхідно знезаражувати щодня ультрафіолетовим випромінюванням протягом 1 год до початку і після неї, здійснюється щоденне вологе прибирання підлоги дезінфікуючими розчинами, регламентованими вказаними санітарними правилами, або 0,2 % розчином ДПІ-2Т, який має влас-

тивість інактивувати амплікони. Перед початком роботи робочу поверхню столів додатково обробляють 70 % етиловим спиртом. Щомісячно проводять профілактичну обробку робочих поверхонь столів, устаткування, штативів 0,2 % розчином ДП-2Т.

12.2. Двічі на рік (при необхідності частіше) проводять обробку автоматичних дозаторів. Дозатори розбирають, обробляють мийними розчинами для знешкодження жирового забруднення, після чого залишки мийного розчину видаляють ганчіркою, змоченою водою. Потім проводять обробку 1 N соляною кислотою; час експозиції – 1 год. Залишки розчину видаляють змоченою ганчіркою і проводять знезараження вологих поверхонь ультрафіолетовим випромінюванням протягом 1 год. Після закінчення обробки дозатори збирають і проводять калібрування відповідно до інструкції з використання дозаторів. Дозатори, які піддаються автоклавуванню, знезаражують парою під тиском 2,0 кГс/см<sup>2</sup> (щ.2 МПа) – при температурі 132±2 °С, протягом 1 год. Режими дезактивації при постановці ПЛР представлені в додатку № 6.

12.3. Знезараження досліджуваного матеріалу:

12.1.1. Матеріал, підозрілий на зараження бактеріями I-II груп патогенності, які не утворюють спор: до досліджуваних зразків додають мертіолят натрію до концентрації 1:10 000 (0,01 %) з наступним прогріванням їх при 56 °С протягом 30 хв. Після обробки мертіолятом натрію 100 мкл зразки переносять в мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл, додають лізуючий розчин на основі 6М гуанідинтіоізоціанату в об'ємі, вказаному в інструкції до тест-системи, і інкубують 15 хв при температурі 65 °С. Після виконання цього етапу матеріал вважається знезараженим.

12.1.2. Знезараження проб, підозрілих на зараження збудником холери: проби досліджуваного матеріалу знезаражують шляхом їх нагрівання при 100 С° протягом 30 хв.

12.1.3. Матеріал, підозрілий на зараження бактеріями, які утворюють спори (*Bacillus anthracis*): досліджуваний матеріал в кількості 0,1 мл засівають у пробірку з 0,9 мл бульйону Хоттингера (рН 7,2) і інкубують з аерацією при температурі 37 °С протягом 2,5 год. Додають пеніцилін до кінцевої концентрації 1000 од/мл і інкубують при 37 °С протягом 15 хв. Потім підігрівають на водяній бані 10 хв при температурі 100 °С, після чого 100 мкл оброблених, як описано вище, зразків переносять в пробірку об'ємом 1,5 мл, додають лізуючий розчин (в п. 13.3.1) і інкубують 15 хв при температурі 65 °С.

### 13. ВИМОГИ ДО ВИКОРИСТАННЯ ТЕСТ-СИСТЕМ

13.1. Для скринінгових досліджень донорської крові на наявність маркерів гемотрансмісивних інфекцій повинні використовуватися тест-системи, що зареєстровані в Україні, пройшли експертну оцінку та рекомендовані для застосування.

13.2. Тест-системи, які надходять в лабораторію, повинні мати паспорт кожної серії діагностикуму.

13.3. Тест-системи транспортуються та зберігаються згідно з вимогами інструкції. Контроль температурного режиму зберігання тест-систем проводиться 2 рази на день на верхній та нижній полицях холодильника. Порушення температурного режиму приводить до погіршення якісних характеристик тест-систем, можливості отримання недостовірних результатів скринінгових досліджень.

13.4. У випадках претензій до якісних характеристик тест-систем керівник лабораторії складає рекламацию, яку надсилає в Центр із питань інфекційної безпеки донорської крові, її компонентів та виготовлених з них препаратів Інституту патології крові та трансфузійної медицини АМН України та на фірму-виробник. До рекламации додається схема розміщення досліджуваних сироваток та стрічка з результатами спектрофотометрії.

13.5. Надходження тест-систем та їх використання реєструється у відповідному журналі (додаток 3).

13.6. Контроль якісних характеристик тест-систем проводиться щоквартально шляхом реєстрації кількості позитивних та від'ємних проб відповідно до кожної тест-системи та її серії.

### 14. ОЦІНКА І КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ РОБОТИ ПЛР-ЛАБОРАТОРІЇ

14.1. У ПЛР-лабораторії проводять внутрішньолабораторний контроль якості ПЛР-досліджень. ПЛР-лабораторія бере участь у зовнішньому контролі якості діяльності геннодіагностичних лабораторій.

14.2. Внутрішній лабораторний контроль проводять із періодичністю, яка залежить від об'єму виконаної роботи і встановлюється керівництвом лабораторії, але не менше ніж один раз на квартал.

14.3. Контроль якості проводиться шляхом дослідження шифрованих, атестованих контрольних панелей, які містять "позитивні" та "від'ємні" проби.

14.4. Кількість проб залежить від об'єму проведених досліджень і має бути достатньою для оцінки роботи співробітників і виявлення ознак контамінації лабораторії.

14.5. Для виявлення можливості контамінації лабораторії нуклеїновими кислотами контроль проводять шляхом взяття змивів із поверхонь. Змиви з поверхонь беруть стерильними ватними тампонами (зондами). Перед взяттям змивів тампони (зонди) змочують стерильним фізіологічним розчином, після чого обертальними рухами протирають робочі поверхні. Після взяття змивів зонд поміщають в мікропробірку типу "епендорф" з 300-400 мкл ТЕ-буфера, обертають протягом 10-15 с, потім віджимають надлишок рідини на стінку пробірки та видаляють. Отриману суспензію центрифугують при 8000 g (12 000 об./хв) протягом 1 хв. Рідину, яка утворилась над осадом, відбирають наконечником з аерозольним бар'єром в мікропробірку об'ємом 1,5 мл. Для виявлення нуклеїнових кислот використовують 0,1-0,2 мл надосадової фракції.

14.6. Як критерії оцінки якості досліджень методом ПЛР в лабораторії враховують результати внутрішнього та зовнішнього лабораторного контролів, а також відсутність випадків лабораторної контамінації нуклеїновими кислотами.

## 15. ДІЇ ПРИ ВИНИКНЕННІ КОНТАМІНАЦІЇ ЛАБОРАТОРІЇ НУКЛЕЇНОВИМИ КИСЛОТАМИ

15.1. Співробітників, які проводять дії з деконтамінації, забезпечують одноразовими халатами, шапочками, бахілами, рукавичками, емностями для приготування необхідної кількості мийних і дезінфікуючих речовин.

15.2. Кожну зону лабораторії обробляють співробітники, які в ній працюють.

15.3. Для обробки кожної зони використовують новий набір збирального інвентарю.

15.4. Кожну зону лабораторії поділяють на ділянки прибирання, наприклад:

- ділянка 1 – бокс біологічної безпеки й устаткування всередині нього;
- ділянка 2 – зовнішні поверхні боксу біологічної безпеки;
- ділянка 3 – шафи для розхідного матеріалу;
- ділянка 4 – холодильники для зберігання реагентів, зразків проб;
- ділянка 5 – устаткування, яке використовується в роботі, але знаходиться поза боксом біологічної безпеки;
- ділянка 6 – поверхні приміщень (стіни, вікна, батареї, стеля, двері);
- ділянка 7 – підлога.

15.5. Обробку проводять від ділянок до ділянок послідовно. Кожна ділянка обробляється окремою ганчіркою. Перед обробкою персонал надягає одноразовий одяг, бахіли, шапочки, рукавички; готує мийні та дезінфікуючі розчини.

15.6. Поверхні кожної ділянки спочатку обробляють мийним розчином для видалення жирового забруднення, після чого залишки мийних речовин видаляють ганчіркою, змоченою розчином.

15.7. Потім на поверхню наносять на 30 хв дезінфікуючий розчин (наприклад, 0,2 % розчин ДП-2Т або аналогічний розчин, дозволений до використання з цією метою у встановленому порядку). Залишки дезінфікуючого розчину видаляють ганчіркою, змоченою водою.

15.8. Після завершення даної обробки проводять знезараження ультрафіолетовим випромінюванням вологих поверхонь протягом 1 год.

15.9. Дії, описані в п. 15.7, 15.8, повторюють ще раз.

15.10. Кожний послідовний етап обробки проводять в новому одноразовому одязі з використанням нової ганчірки. Залишки дезінфікуючих розчинів, нанесених на поверхні, видаляють ганчіркою. Після кожного етапу обробки ганчірку утилізують.

15.11. Після завершення деконтамінації беруть повторні змиви, які досліджують на наявність нуклеїнових кислот збудників інфекційних хвороб, діагностику яких найбільш часто проводять в лабораторії, а також на виявлення нуклеїнових кислот збудників, які мають короткі – менше 300 п.н. – специфічні продукти ампліфікації (довжину специфічного фрагмента вказано в інструкції тест-системи).

15.12. Для проведення змивів стерильний зонд із ватним тампоном змочують у фізіологічному розчині, після чого обертальними рухами протирають робочі поверхні устаткування, меблі, телефони і т.ін. Особливу увагу приділяють приміщенням сумісного відвідування працівників зон детекції продуктів ампліфікації та інших співробітників лабораторії. Після взяття змивів зонд занурюють в мікропробірку типу "епендорф" з 300-400 мкл ТЕ-буфера, обертають протягом 10-15 хв, віджимають залишки рідини на стінку пробірки та видаляють.

15.13. У випадку отримання в зразках змивів позитивних результатів ПЛР-аналізу обробку повторюють.

15.14. Забруднений розхідний матеріал (пробірки, наконечники і т.ін.) утилізують.

**Додаток 1**

**ЖУРНАЛ**  
**реєстрації забору крові (плазми, сироватки) для дослідження**  
**на наявність маркерів трансмісивних інфекцій\***

Дата забору	№ з/п	ПІБ	Рік народження	Стать	Класифікаційна категорія донора	Дата направлення зразка	Результат дослідження	Примітка
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Примітка. \* – журнал ведеться в підрозділі, що проводить забір зразка крові на дослідження.

**Додаток 2**

**НАПРАВЛЕННЯ**  
**на дослідження зразків крові (плазми, сироватки) на наявність**

-----  
**(назва виду досліджень)**

№ з/п*	Реєстраційний номер в лабораторії**	Стать, дата народження донора*	Класифікаційна категорія донора*	Дата забору зразка*	Результат дослідження**
1	2	3	4	5	6

Примітка. \* – заповнюється в підрозділі, який направляє зразок в 2-х екземплярах; \*\* – заповнюється в лабораторії.

**Додаток 3**

**ЖУРНАЛ**  
**обліку надходження та використання тест-систем**

Отримано				Використано				
Дата	Назва т/с та фірми виробника	Серія, термін придатності	Кількість	Дата	Назва т/с	Серія	Кількість	Залишок
1	2	3	4	5	6	7	8	9

**Додаток 4**

**ЖУРНАЛ**  
**реєстрації зразків, які надходять в лабораторію для**  
**проведення досліджень на наявність маркерів трансмісивних інфекцій \***

№ з/п	Дата надходження зразка	Реєстраційний номер в лабораторії	Кількість	Стать, дата народження	Класифікаційна категорія донора	Дата забору зразка	Дата дослідження	Результат	Примітка
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

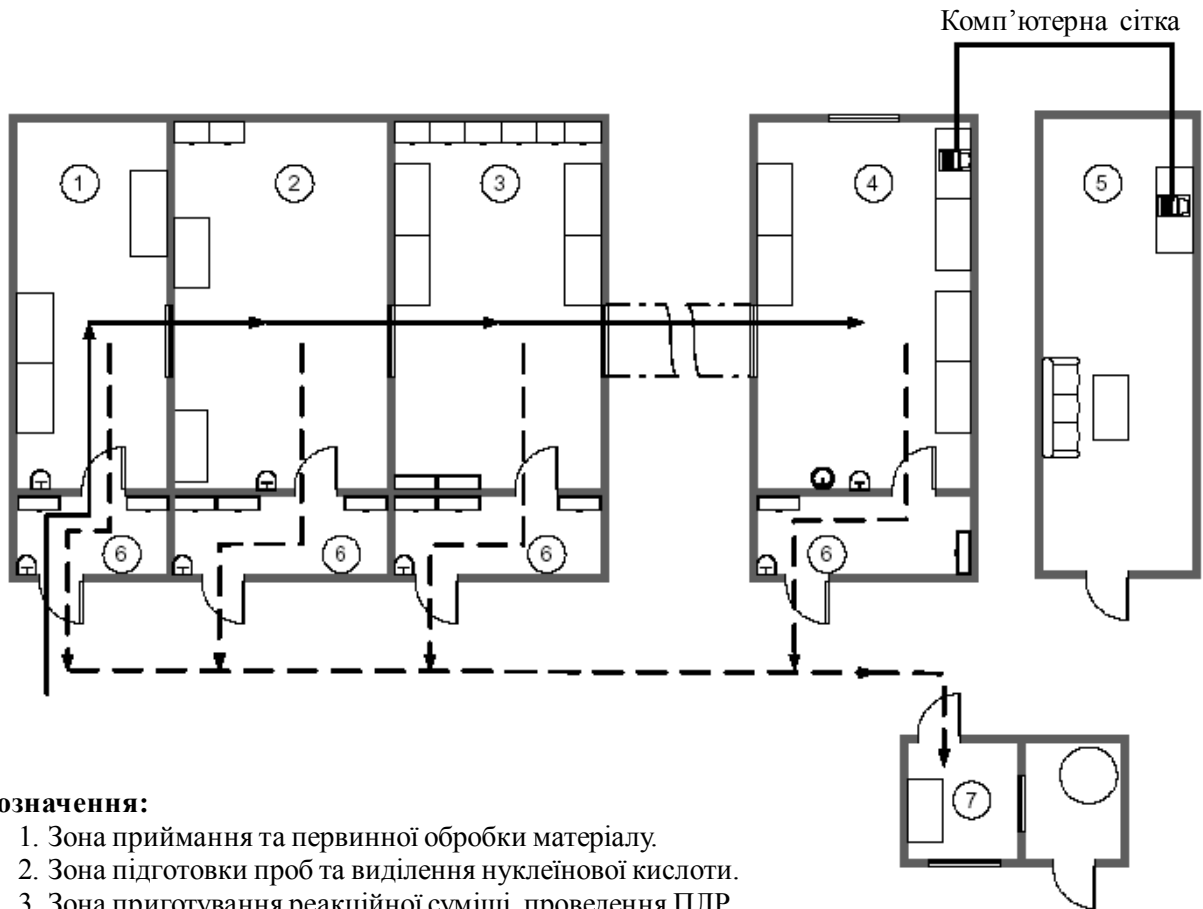
**Додаток 5**

**ЖУРНАЛ**  
**реєстрації позитивних зразків крові (сироваток, плазми) у первинному скринінгу,**  
**які скеровуються для верифікаційних досліджень**

№ з/п	Реєстраційний номер пацієнта у журналі діагностичної лабораторії	Категорії донорів	Дата забору зразка	Дата проведення ПЛР	Тип тестування, серія	Дата скерування для верифікації	Дата і вид обстеження	Результат верифікації досліджень	Рекомендації	Примітка
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Додаток 6

Принципова схема розміщення ПЛР-лабораторії,  
яка включає набір окремих робочих зон (в складі інших функціональних приміщень)



Позначення:

1. Зона приймання та первинної обробки матеріалу.
2. Зона підготовки проб та виділення нуклеїнової кислоти.
3. Зона приготування реакційної суміші, проведення ПЛР.
4. Зона детекції результатів методом електрофорезу.
5. Кімната обліку результатів.
6. Передбюкс.
7. Кімната знезараження матеріалу.



– умивальник



– автоклав



– пристрій для зливу  
води після вологого  
прибирання



– вікно, шлюз



– шафи для одягу

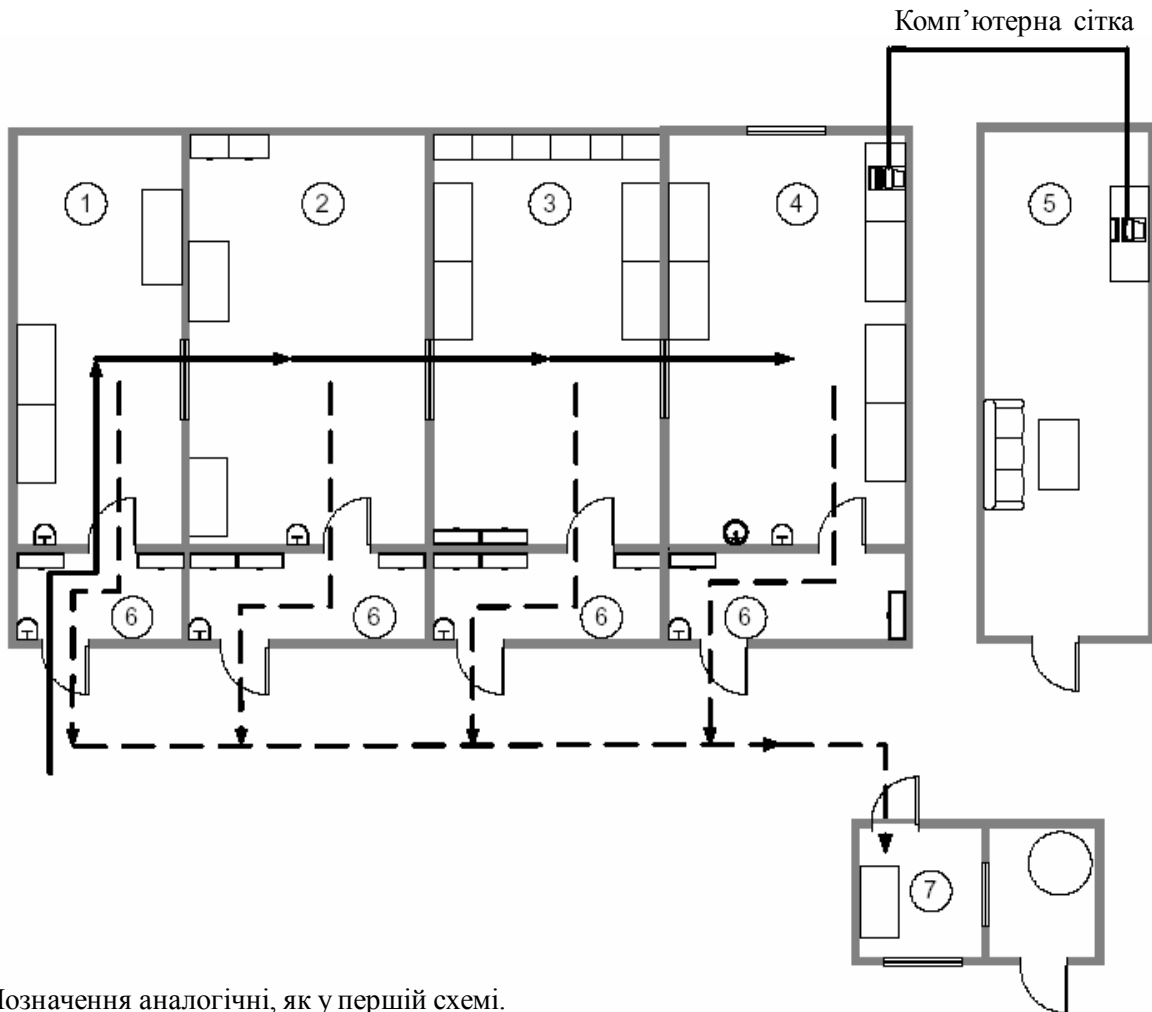


– рух досліджуваного матеріалу



– рух зворотного матеріалу

**Принципова схема розміщення ПЛР-лабораторії, яка включає набір послідовно розміщених самостійних приміщень**



Позначення аналогічні, як у першій схемі.

**Додаток 7**

**Перелік устаткування ПЛР-лабораторії**

**I. Для обробки матеріалів і виділення нуклеїнових кислот.**

1. Центрифуга для пробірок об'ємом 5-100 мл.
2. Центрифуга-вортекс.
3. Мікроцентрифуга від 12 до 16 000 g для мікроцентрифужних пробірок об'ємом 1,5 мл.
4. Термостат для пробірок об'ємом 1,5 мл із діапазоном робочих температур 25-100 °С.
5. Окремий набір автоматичних дозаторів варіабельного об'єму.
6. Одноразові поліпропіленові мікроцентрифужні пробірки, які закручуються або щільно закриваються кришками об'ємом 1,5 мл.
7. Одноразові наконечники для варіабельних дозаторів з аерозольним бар'єром до 200 і до 1000 мкл.
8. Одноразові наконечники для дозаторів варіабельного об'єму до 200 мкл.
9. Штативи для наконечників, мікропробірок об'ємом 1,5 мл.
10. Холодильник з камерами, які підтримують температуру від 2 до 8 °С, мінус 20 °С.
11. Ємність із дезінфікуючим розчином.

**II. Для приготування ПЛР-суміші і проведення ампліфікації.**

1. Настільний бокс із бактерицидною лампою.
2. Ампліфікатор.

3. Окремий набір автоматичних дозаторів варіабельного об'єму.
  4. Одноразові поліпропіленові пробірки для ампліфікації об'ємом 0,5 (0,2) мл.
  5. Одноразові наконечники для варіабельних дозаторів з аерозольним бар'єром до 100 мкл.
  6. Штативи для наконечників, мікропробірок на 0,5 (0,2) мл.
  7. Холодильник з камерами, які підтримують температуру від 2 до 8 °С, мінус 20 °С.
  8. Ємність для відпрацьованого розхідного матеріалу.
- III. Для електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР.
1. Камера для горизонтального електрофорезу.
  2. Джерело постійного струму з напругою 150-460 В.
  3. Трансілюмінатор із кабінетом для огляду гелів.
  4. Відеосистема з цифровою відеокамерою для реєстрації результатів.
  5. Комп'ютер для аналізу результатів електрофорезу.
  6. Мікрохвильова піч для плавлення агарози.
  7. Колба конічна з термостійкого скла для плавлення агарози об'ємом 250 мл.
  8. Мірний циліндр об'ємом 1 л.
  9. Штатив для мікропробірок на 0,5 мл.
  10. Окремий автоматичний дозатор 10-40 мкл.
  11. Одноразові наконечники для варіабельних дозаторів об'ємом до 200 мкл у штативі.
  12. Холодильник з камерами, які підтримують температуру від 2 до 8 °С.
  13. Ємність для використаного розхідного матеріалу.
- IV. Для гібридизаційно-ферментної детекції продуктів ПЛР.
1. Термостат плашковий, який підтримує температуру 37 °С.
  2. Вошер (не обов'язково).
  3. Комп'ютер (має бути зв'язаний через комп'ютерну сітку з комп'ютером, який розміщується в чистій зоні і використовується для обліку результатів гібридизації).
  4. Восьмиканальний дозатор до 200 мкл.
  5. Окремий набір одноканальних варіабельних дозаторів.
  6. Одноразові наконечники для варіабельних дозаторів.
  7. Мірний циліндр об'ємом 1 л.
  8. Холодильник із камерою, що підтримує температуру від 2 до 8 °С.
  9. Ємність для використаного розхідного матеріалу.

## Додаток 8

### Режими дезактивації при постановці ПЛР

- 1.1. Дезактивація буферів та гелів, які містять бромід етидію.
  - 1.1.1. Перший спосіб – необхідні реагенти для обробки 1 л буфера і гелів: 0,5 М перманганату калію – 1 л; 2,5 М соляної кислоти – 1 л; 2,5 М NaOH – 1 л.
  - 1.1.2. Хід виконання: відпрацьовані гелі і буфер з камери переміщують в пластикову ємність на 5 л, яку щільно закривають кришкою. Додають 1 об'єм 0,5 М розчину калію перманганату, а потім 1 об'єм 2,5 М соляної кислоти. Обережно перемішують і залишають при кімнатній температурі на 4-6 год. Додають 1 об'єм 2,5 М натрію гідроксиду, обережно перемішують. Нейтралізовані реагенти зливають в каналізацію.
  - 1.1.3. Другий спосіб – необхідний набір реагентів: скляна колонка ємністю на 1-2 л; активоване вугілля.
  - 1.1.4. Хід виконання: заповнюють колонку активованим вугіллям і пропускають відпрацьований буфер через нього невеликими порціями. Дезактивований розчин зливають в каналізацію. Гель дезактивується першим способом.
- 2.1. Дезактивація досліджуваного матеріалу і виділених нуклеїнових кислот.
  - 2.1.1. За відсутності прохідного автоклаву матеріал, виділені нуклеїнові кислоти знезаражують в одноразових пластикових ємностях шляхом замочування в дезінфікуючому розчині.
  - 2.1.2. Після закінчення часу експозиції дезінфікуючий розчин зливають, відкриту ємність з обробленим матеріалом упаковують у щільний термостійкий пакет і відносять в автоклавну для наступного знезараження парою під тиском.



2.1.3. Знезараження парою проводять під тиском в такому режимі: температура 132 °С, тиск 2,0 кГс/см<sup>2</sup>, час – 60 хв.

2.1.4. Після знезараження парою під тиском пакет з інактивованим матеріалом виносять у контейнер для сміття з наступним вивозом на полігон побутових відходів.

2.1.5. При наявності прохідного автоклаву матеріал збирають в одноразові термостійкі пластикові ємності і знезаражують, як вказано в п. 2.1.3.

3.1. Дезактивація пробірок з ампліконами, наконечниками, рукавичками.

3.1.1. Пробірки з ампліконами, наконечниками, рукавичками, ганчірки для обробки поверхонь в ПЛР-боксі після 1-го етапу ампліфікації з зони проведення ПЛР збирають в одноразові пластикові ємності і виносять в зону детекції результатів для подальшої інактивації.

3.1.2. В зоні детекції результатів наконечники, пробірки з ампліконами (з попередньо відкритими кришками), рукавички, ганчірки після закінчення роботи занурюють на 1 год в одноразову пластикову ємність, яка містить 5 % розчин хлораміну Б або 0,2 % розчин ДП-2Т.

3.1.3. Після закінчення часу експозиції дезінфікуючий розчин зливають, відкриту ємність з обробленим матеріалом упаковують у щільний термостійкий пакет для знезараження матеріалу парою під тиском в такому режимі: температура 132 °С, тиск 2,0 кГс/см<sup>2</sup>, час – 60 хв.

3.1.4. Після знезараження парою під тиском пакет з інактивованим матеріалом виносять в контейнер для сміття для вивозу на полігон побутових відходів.