

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ  
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

**щодо організації роботи фітосанітарних лабораторій при дослідженні  
рослин та продукції рослинного походження з використанням методу  
полімеразної ланцюгової реакції**

**Київ – 2024**

Рекомендації розглянуті, затверджені та прийняті на засіданні  
Науково-методичної ради Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів  
(протокол № 3 від 29.05.2024 р.)

**Розробники:**

Чайковський В.М., Челомбітко А.Ф., Башинська О.В., Галюк В.П., Костриця В.О., Кіш Н.М., Лихач Є.А., Крупеник М.Ф., Клещова С.Л., Коваленко Н.О., Панчишин Г.М., Дацишин М.Є., Хоменко І.О., Ящук В.А., Шаблій Г.В., Гончар М.В.

**Рецензенти:**

Гнатуш С.О. - професор, завідувач кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка;

Артюх М.М. - к.с.-г.н., завідувач лабораторії фізіології винограду ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова»;

Козуб Н.О. - д.б.н., с.н.с., завідувач лабораторією екологічної генетики рослин та біотехнології Інституту захисту рослин НААН;

Доля М.М. - д.с.-г.н., професор, завідувач кафедри ентомології Інтегрованого захисту та карантину рослин НУБіП України;

Олійник Т.М. - к.с.г.н., с.т.н.с, доцент, заступник директора з наукової роботи Інституту картоплярства НААН;

Малишева Х.В. - к.б.н., старший викладач кафедри біотехнології та радіології ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького

**Методичні рекомендації щодо організації роботи фітосанітарних лабораторій при дослідженні рослин та продукції рослинного походження з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції / [Чайковський В.М., Челомбітко А.Ф., Башинська О.В., Галюк В.П., Костриця В.О., Кіш Н.М., Лихач Є.А., Крупеник М.Ф., Клещова С.Л., Коваленко Н.О., Панчишин Г.М., Дацишин М.Є., Хоменко І.О., Ящук В.А., Шаблій Г. В., Гончар М.В.]. – Київ: «Державна служба України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів», 2024 рік – 28 с.**

Методичні рекомендації призначені для організації роботи фітосанітарних лабораторій при дослідженні рослин та продукції рослинного походження з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції на виконання Закону України «Про карантин рослин» від 30 червня 1993 року № 3348-ХІІ та відповідно до законодавства України у сфері генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО.

Для впровадження єдиного підходу щодо організації роботи фітосанітарних лабораторій при дослідженні рослин та продукції рослинного походження з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1. Загальні положення.....	5
2. Терміни та визначення.....	7
3. Вимоги до організації роботи методом полімеразно-ланцюгової реакції .....	8
3.1. Загальні вимоги.....	8
3.2. Вимоги до приміщень ПЛР-лабораторії.....	9
3.3. Вимоги до лабораторного обладнання в ПЛР-лабораторії....	12
4. Документація ПЛР-лабораторії.....	14
5. Вимоги до проведення робіт в ПЛР-лабораторії.....	15
6. Порядок обробки спецодягу при роботі.....	18
7. Вимоги до обробки приміщень і знезараження матеріалу в ПЛР-лабораторії.....	18
8. Правила роботи в боксах біологічної безпеки при виділенні нуклеїнових кислот .....	19
9. Профілактика контамінації та порядок дій при виникненні контамінації ПЛР-лабораторії нуклеїновою кислотою .....	20
10. Контроль якості досліджень і оцінка роботи ПЛР-лабораторії..	22
Додаток № 1 Орієнтовний перелік обладнання ПЛР-лабораторії...	25
Додаток № 2 Орієнтовний перелік обладнання ПЛР-лабораторії для проведення досліджень методом NASBA-Real-Time.....	27
Література.....	28

## ВСТУП

Обсяги експортно-імпортних операцій України щороку зростають. Географія країн-експортерів розширюється, збільшується також і видовий склад імпортованої продукції. Все більше завозиться в Україну екзотичних фруктів, овочів, квітково-декоративних, лісових та інших культур, з якими можливе ввезення регульованих шкідливих організмів (шкідники, збудники хвороб рослин, насіння бур'янів) відсутніх на території нашої держави, і які можуть завдати величезних збитків сільськогосподарському виробництву. Тому, своєчасно виявити і не допустити занесення їх на територію України - одне з основних завдань фітосанітарної лабораторії.

З 47-и Міжнародних стандартів з фітосанітарних заходів (далі – МСФЗ) прийнятих Міжнародною конвенцією із захисту рослин (МКЗР) один з основних стандартів, що стосується фітосанітарної лабораторної діагностики це МСФЗ 27 «Діагностичні протоколи для регульованих шкідливих організмів». Цим стандартом затверджені діагностичні протоколи для регульованих шкідливих організмів згідно з МКЗР (додатки до МСФЗ 27). Наразі затверджено 33 діагностичних протоколи, які описують процедури та методи офіційної діагностики регульованих шкідливих організмів, що мають значення для міжнародної торгівлі, танадають мінімальні вимоги для надійної діагностики шкідливих організмів, що регулюються.

Відповідно до рекомендацій даних діагностичних протоколів при проведенні лабораторних досліджень об'єктів регулювання, крім інших важливих методів, використовується метод полімеразної ланцюгової реакції (далі – ПЛР). У багатьох випадках цей метод є референтним та обов'язковим до використання.

Відомо, що ПЛР-дослідження є найбільш точним, швидким та сучасним методом виявлення фітопатогенів у рослинному матеріалі, який дозволяє виявити збудників хвороб рослин, навіть у їх латентному стані.

Підвищена чутливість і можливість, у деяких модифікаціях ПЛР, провести кількісну оцінку присутності фітопатогена робить цей метод набагато ефективнішим при діагностиці шкідливих організмів.

Багато компаній розробили діагностичні набори для діагностики ряду карантинних фітопатогенів методом ПЛР із флуоресцентною детекцією результатів (FLASH-ПЛР, ПЛР у реальному часі). Застосування таких діагностичних наборів дозволяє впродовж декількох годин одержати надійні, швидкі й достовірні результати, що дозволяють проводити перевірку продукції на наявність регульованих шкідливих організмів.

Метод ПЛР є лідером серед сучасних технологій дослідження продуктів рослинного походження на наявність або відсутність генетичних модифікацій. ПЛР в реальному часі дає можливість проводити якісне визначення відсутності або наявності цільових послідовностей нуклеотидів, що використовуються при створенні трансгенних рослин.

Тому за допомогою цього випробування можна виявити в найкоротші терміни переважну більшість генетично модифікованих сортів рослин, які існують у світі, що є важливо для виробників, імпортерів та експортерів рослинної продукції.

## 1. Загальні положення

1.1. Методичні рекомендації з організації роботи фітосанітарних лабораторій при дослідженні рослин та продукції рослинного походження з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції (далі – Правила), розроблені на підставі Закону України «Про карантин рослин», законодавства України у сфері генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО та наказу Міністерства охорони здоров'я України від 24.01.2008 № 26 «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» та стосуються роботи фітосанітарних лабораторій при дослідженні рослин та продукції рослинного походження з використанням методу ПЛР (далі – ПЛР-лабораторії).

1.2. Правила встановлюють вимоги до приміщень фітосанітарних лабораторій і порядку організації проведення в них робіт з біологічними фітопатогенними агентами далі (БФА) 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.

1.4. Правила поширюються на фітосанітарні лабораторії та їх відділи, що проводять молекулярно-генетичні дослідження рослин та продуктів рослинного походження, а також дослідження на наявність генетично модифікованих джерел.

1.5. Контроль за виконанням цих Правил здійснює особа, яка уповноважена на проведення досліджень методом ПЛР в конкретній ПЛР-лабораторії.

1.6. В основі ПЛР лежить багаторазове 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, включно з харчовими продуктами, є швидким та точним методом, який дозволяє виконувати аналіз впродовж 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 та специфічність тест-систем для виявлення НК методом ПЛР повинна відповідати сертифікату якості від виробника тест-систем.

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 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. В 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 Acid Sequence Based Amplification) у «реальному часі». На відміну від ампліфікації в ПЛР, NASBA є ізотермічною реакцією, яка здійснюється за температури 41<sup>0</sup>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 добудовування 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. Для видалення РНК додається РНК-аза додатково до зворотної транскриптази, оскільки її власної РНК-азної активності недостатньо. Фермент ДНК-залежна РНК-полімераза транскрибує за один цикл (5-15 хвилин) ( $10^5$ ) копій фрагментів РНК. Таким чином, впродовж 40-50 хвилин ізотермічної транскрипційно опосередкованої ампліфікації ДНК або РНК в розчині утворюється  $10^8 - 10^9$  копій.

1.9. ПЛР використовують як швидкий та точний метод діагностики грибкових, вірусних та бактеріальних хвороб, шкідників, нематод, ГМО індикації БФАв зразках рослин та продукції рослинного походження, для здійснення фітосанітарного контролю та молекулярно-генетичних досліджень.

1.9.1 Проведення досліджень методом ПЛР 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, внаслідок цього, хибнопозитивних або хибнонегативних результатів.

## 2. Терміни та визначення

У цих Правилах застосовуються такі терміни, визначення та скорочення:

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

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

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

**Біологічні фітопатогенні агенти** - патогенні для рослин мікроорганізми (бактерії, віруси, найпростіші, гриби, мікоплазми), генетично модифіковані мікроорганізми.

**Біологічна безпека** - стан середовища життєдіяльності людини, при якому відсутній негативний вплив його чинників (біологічних, хімічних, фізичних) на біологічну структуру і функцію людської особи в теперішньому і майбутніх поколіннях, а також відсутній незворотній негативний вплив на біологічні об'єкти природного середовища (біосферу) та сільськогосподарські рослини і тварини.

**«Брудна» зона ПЛР-лабораторії** - приміщення з високою ймовірністю 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.

**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 пробо підготовки, виділення НК, приготування реакційної суміші та ампліфікації).

### **3. Вимоги до організації роботи методом ПЛР**

#### **3.1. Загальні вимоги**

3.1.1. Роботу з ПЛР - діагностики організовує і проводить спеціаліст з відповідною вищою освітою (захист рослин, карантин рослин, біолог, мікробіолог та ін.), який пройшов курси спеціалізації, стажування або інші види підготовки, має необхідну теоретичну і практичну підготовку за своєю спеціальністю. Приймання матеріалу, ведення записів у журналах, виконання допоміжних маніпуляцій при проведенні досліджень та деяких етапів аналізу, дезінфекцію, знешкодження матеріалу тощо здійснюють лаборанти та (або) фахівці.

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

3.1.3. Результати та протоколи досліджень реєструють на паперових та електронних носіях, згідно з якими формується результат досліджень.

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

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

«чиста» зона:

- приміщення розбору, первинної обробки матеріалу та роботи з документами;

- приміщення для виділення НК;

- приміщення приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР-ампліфікаційна (у випадку об'єднаних кімнат);

«брудна» зона:

- ПЛР-ампліфікаційна (у випадку організації окремої кімнати);

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

3.2.2. Робочі приміщення ПЛР-лабораторії повинні бути непрохідними і створеними за типом боксів з перед боксами. Якщо площа не дозволяє обладнати окремі приміщення з 4 кімнат, у такому випадку потрібно створити щонайменше 3 кімнати з 2 окремими зонами (робочими поверхнями) для проведення етапів ПЛР.

1 кімната: підготовка зразків, виділення НК;

2 кімната: приготування реакційної суміші та ампліфікаторна;

3 бокс (кімната): для електрофорезу (класичний метод).

Як додатковий контроль, (в разі виконання деяких етапів ПЛР в одній кімнаті) - необхідно встановити розклад з розділенням процесів у часі. Площа кожного із робочих приміщень ПЛР-лабораторії повинна бути достатньою для розміщення в ній необхідного обладнання та комфортної роботи фахівця.

3.2.3. ПЛР-лабораторія, що функціонує як самостійна структура, повинна мати додатково такі приміщення:

- кімнату для роботи з документами (кімнату персоналу);

- кабінет завідувача лабораторії (може бути об'єднаний з кімнатою персоналу);

- роздягальні для співпрацівників;

- кімнату приймання їжі;

- туалет;

- для «чистої» та «брудної» зон ПЛР-лабораторії окремо, підсобні (складські) приміщення, приміщення для знезараження матеріалу та автоклавну;

- а також приміщення, вказані в підпункті 3.2.1 цих Правил, для проведення ПЛР-аналізу.

3.2.4. У приміщенні розбору і первинної обробки матеріалу проводять попередню пробопідготовку (візуальний огляд зразка, відбір біологічного матеріалу, потенційно зараженого фітопатогенними агентами, зважування зразка, забезпечення гомогенності зразка, маркування, та інше), зберігання.

3.2.5. Зону виділення НК розташовують в окремому приміщенні. При організації ПЛР-лабораторії на базі діючої фітосанітарної лабораторії допускається виділення НК в інших приміщеннях. 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. Крім того, доцільно розмежувати процеси виділення ДНК/РНК (в окремих боксах безпеки або розділити в часі після проведення попередньої обробки).

3.2.6. Приміщення ампліфікаційної має бути окремим. У ньому проводять приготування контролів; внесення до пробірки для ПЛР реакційної суміші, виділеної із зразків ДНК/РНК та контролів. В цій кімнаті зберігаються матеріали для приладів ПЛР (тобто термоциклерів) та витратні матеріали які використовуються для виконання етапів ампліфікації. Пробірки з продуктами ампліфікації ПЛР забороняється відкривати. Для приготування реакційної суміші і внесення в реакційну суміш препаратів НК встановлюють окремі ПЛР-бокси (у випадку об'єднання кімнат).

Приміщення «чистої» зони, ПЛР - кімната приготування реакційної суміші, призначена для підготовки, аліквотування реагентів та приготування реакційної суміші. Щоб зменшити ймовірність зараження «чистої» зони, екстраговані ДНК/РНК та/або продукти ПЛР ніколи не повинні бути присутніми в кімнаті.

3.2.7. 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.

3.2.8. При необхідності використання для детекції продуктів ампліфікації разом з методом електрофорезу і методу ГІФА 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 ГІФА використання піпеток і посуду, призначених для електрофорезу.

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

3.2.10. 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.

3.2.11. 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. Однонапрямний рух - всі кроки повинні відбуватися послідовно, переходячи від однієї кімнати (приміщення) до іншої.

До прикладу:



\*при застосуванні класичного ПЛР – форезна.

Під час проведення випробувань заборонено повертатися у попередню кімнату.

3.2.12. ПЛР - лабораторія повинна бути забезпечена електро- та водопостачанням, каналізацією, опаленням відповідно до чинного законодавства. Усі приміщення лабораторії повинні бути забезпечені достатнім природним і штучним освітленням. В ПЛР-лабораторії повинна бути раковина для миття рук.

3.2.13. При будівництві нових або реконструкції діючих ПЛР-лабораторій приміщення слід обладнувати припливно-витяжною або витяжною вентиляцією. Різниця в тиску повітря в приміщеннях ПЛР-лабораторії досягається за рахунок різного за кратністю обміну повітря в них. Витяжні вентиляції приміщення або боксів біобезпеки для різних зон ПЛР лабораторії мають бути підключені до окремих повітропроводів, кожен з яких веде до окремого місця для випуску повітря.

Кратність обміну повітря в приміщеннях ПЛР-лабораторії визначається залежно від об'єму приміщення, кількості робочого персоналу, а також типу обладнання та повинна регламентуватися чинними нормами ДБН для лабораторних приміщень

3.2.14. Припливно-витяжна вентиляція повинна бути обладнана окремо для «чистої» та «брудної» (форезна та зона ГІФА) зон ПЛР-лабораторії.

3.2.15. При відсутності системи вентиляції зменшення ризику контамінації проб досягають заходами щодо обмеження обміну повітря між приміщеннями ПЛР-лабораторії (територіальне розмежування).

3.2.16. 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.

3.2.17. Внутрішнє оздоблення приміщень виконують відповідно до їх функціонального призначення. Поверхні стін, підлоги й 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.

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

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

3.2.20. Приміщення для усіх етапів ПЛР-аналізу повинні бути обладнані бактерицидними лампами, які встановлюють з розрахунку 2,5 Вт/м<sup>3</sup>. Рекомендується додатково використовувати ультрафіолетовий бактерицидний опромінював-рециркулятор.

3.2.21. ПЛР-лабораторія може бути забезпечена телефонним зв'язком, комп'ютерною та оргтехнікою, підключенням до локальної комп'ютерної мережі.

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

3.2.23. 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 й засоби вимірювальної техніки повинні мати технічний паспорт та робочу інструкцію з експлуатації. Засоби вимірювальної техніки і обладнання підлягають регулярному метрологічному контролю (калібрування).

Прилади, що використовуються, повинні відповідати нормам безпеки і електромагнітної сумісності. Все лабораторне обладнання повинне бути заземлено, перевага віддається застосуванню трьох контактних 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 спеціальний детектор, який доцільно встановити в ампліфікаційній, з'єднавши його з комп'ютером із системою Windows і USB портами.

3.3.3. Ампліфікатор, що дозволяє працювати у форматі «RealTime», також встановлюють в ампліфікаційній кімнаті разом зі звичайними ампліфікаторами.

3.3.4. Для виконання досліджень за методом NASBA-Real-Time потрібне відповідне обладнання, орієнтовний перелік якого наведений в додатку 2 до цих Правил, та 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.

У випадку необхідності переміщення витратних матеріалів/обладнання, першочергово проводиться дезінфекція та перевірка відсутності контамінації (відсутні залишки продуктів ампліфікації). Дана інформація фіксується у відповідних журналах із зазначенням: дати, причини переміщення та ПІБ фахівця, який здійснив переміщення.

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 й наконечники з аерозольним бар'єрним фільтром до мікродозаторів;
- наконечники, які точно відповідають за розміром та видом автоматичним піпеткам, а пробірки для ампліфікації - термоциклерам (відповідно до інструкції фірми-виробника приладу).

Необхідно встановити на робочих місцях спеціальні контейнери для збору 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:

- для зберігання наборів тест-систем, реактивів;
- для набору реагентів для виділення НК;
- для виділених НК.

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

При необхідності тривалого (близько 1 року) зберігання виділених і підготовлених для дослідження препаратів НК потрібна морозильна камера з температурою мінус 20<sup>0</sup>С.

В кімнаті приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР необхідна холодильна камера та морозильна камера відповідно до вимог зберігання реагентів, тест-систем відповідно до вимог виробника; в кімнаті детекції продуктів ампліфікації - холодильне/морозильне обладнання відповідно до вимог зберігання реагентів та тест-систем (відповідно до вимог виробника).

При зберіганні в холодильниках (морозильних камерах) зараженого матеріалу необхідно вживати заходи для запобігання забрудненню 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 знезараженні шляхом автоклавування і видалені з лабораторії.

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

#### **4. Документація ПЛР-лабораторії (як окрема структурна одиниця)**

4.1. ПЛР-лабораторія повинна мати:

4.1.1. Документацію щодо організації лабораторії:

- положення про лабораторію, затверджене керівником установи;
- паспорт лабораторії, затверджений керівником установи;
- атестат про акредитацію лабораторії (ПЛР-лабораторії).

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

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 охорони праці та техніки безпеки;

- журнал реєстрації контамінації лабораторії (ПЛР-лабораторії) нуклеїновими кислотами;

- 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 виміральної техніки;
  - графіки та посвідчення/свідоцтва про калібрування засобів виміральної техніки
- 4.1.6. Документацію щодо персоналу лабораторії (ПЛР-лабораторії):
- посадові інструкції;
  - документи на (підтвердження) кваліфікації.
- 4.1.7 Облікову та звітну документацію.

## **5. Вимоги до проведення робіт в ПЛР-лабораторії**

5.1. Персонал з відповідною професійною підготовкою допускають до роботи з БФА після проведення інструктажу щодо дотримання вимог біологічної безпеки та безпеки праці.

5.2. Матеріал, що надходить для дослідження, приймають в кімнаті прийому/реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу. Кожний зразок маркують відповідно до реєстраційного журналу.

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

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

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

5.6. 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 чи пластмасових контейнерах. Контейнери після кожного використання дезінfectують.

5.7. 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.

5.8. У кімнаті приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР готують компоненти реакційної суміші та складають власне реакційну суміш (якщо не використовуються готові тест-системи або комерційні готові суміші для ПЛР (PCR міх з різними концентраціями), додають виділені препарати НК. Всі маніпуляції проводять у окремих 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 дезінфікуючим засобом та опромінюють ультрафіолетом не менше 30 хвилин.

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.

5.9. При використанні праймерів з флуорофорами - після постановки реакції проводять детекцію, облік та реєстрацію результатів дослідження. Відпрацьовані пробірки з дотриманням вимог пункту 5.6 видаляють з приміщення, де проводилась ампліфікація, у форезну або спеціально виділене приміщення для автоклавування і подальшої утилізації.

5.10. При використанні класичного формату реакції або ГІФА-реакційні пробірки передають у «брудну» зону до кімнати для детекції продуктів ампліфікації для подальшого електрофорезу або ГІФА.

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

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

5.13. 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 спричиняють деградацію ДНК, дозволеними до застосування в установленому порядку. Процедуру проводять безпосередньо у форезній або спеціально виділеному приміщенні для первинної дезінфекції відпрацьованого матеріалу, яке розташоване якомога далі від «чистої» зони. Остаточне знезараження використаних витратних матеріалів і реагентів проводять в автоклавній кімнаті.

5.14. Результати досліджень оформляють і зберігають в ПЛР-лабораторії.

5.15. За результатами аналізу надають звіт про випробування щодо наявності/чи відсутності у досліджуваній пробі специфічних ділянок (фрагментів) ДНК або РНК, що мають гомологію з певною ділянкою генома збудника відповідного фітопатогену, або про наявність в досліджуваному матеріалі генетичних маркерів або генетично модифікованої НК.

5.16. 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 невідповідних умовах.

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

5.18. 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.

5.19. 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.

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

5.21. Залишки БФА (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, що закриваються і передають в автоклавну.

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

5.23. 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.

5.24. Працівників кожної робочої зони забезпечують відповідним спецодягом: лабораторним (медичним) халатом, шапочкою, рукавичками й змінним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту. 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.

5.25. 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).

5.26. Одягання і зняття захисного одягу проводять у перед боксах. У кожному з них повинен бути окремий персональний комплект захисного одноразового одягу.

5.27. Захисний одяг зони детекції продуктів ампліфікації й 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).

## **6. Порядок обробки спецодягу при роботі.**

6.1. Використаний одяг перуть у воді з додаванням прального порошку.

6.2. При використанні одноразового робочого одягу його, після використання, автоклавують і утилізують.

6.3. Забороняється одночасно проводити прання спецодягу з різних зон. При передачі використаного спецодягу та одержанні чистого спецодягу, слід дотримуватись розділення цих процесів у часі.

6.4. Захисні окуляри та змінне взуття (у разі відсутності бахіл) протирають розчином дезінфекційного засобу. Ультрафіолетове опромінення вологих поверхонь проводять щонайменше 30 хв.

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

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

7.2. В кімнатах, в яких проводять роботу з виділеними НК, робочі поверхні та обладнання щодня опромінюють ультрафіолетовим промінням впродовж 30 хвилин до та після роботи. Підлогу щодня піддають вологому прибиранню із застосуванням дезінфікуючих засобів. Перед початком роботи робочу поверхню боксів додатково обробляють 70% етиловим спиртом.

7.3. На кожному робочому місці розташовують спеціальний контейнер, до якого скидають одноразовий пластиковий посуд (пробірки у відкритому стані, наконечники). Після випробування відпрацьований пластик упаковують у термостійкий пакет для подальшого автоклавування. Після автоклавування пакет може бути утилізований.

7.4. Посуд, штативи для пробірок та наконечників обробляють дезінфекційними розчинами.

7.5. Відпрацьовані гелі з електрофоретичної камери поміщають в пакет для автоклавування, після чого знезаражують шляхом автоклавування. Буфери з електрофоретичної камери поміщають у спеціальний контейнер для подальшої утилізації безпечним шляхом.

7.6. Обробку автоматичних дозаторів здійснюють двічі на рік (при необхідності частіше).

Дозатори, які можна автоклаувати (бажано використовувати саме такі), знезаражують паром під тиском згідно з інструкції виробника. В інших випадках обробку автоматичних дозаторів проводять згідно з інструкцією виробника, користуючись для деконтамінації спеціальними розчинами для

деконтамінації чи іншими дезінфікуючими засобами, рекомендованими в інструкціях з експлуатації приладу.

## **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 документа 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).

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 й знову вводячи руки в бокс. Рухи повинні бути плавними та 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 стільниці боксу і бути видимими через оглядову панель.

Система подачі стерильного повітря не повинна блокуватися записами, піпетками або іншими матеріалами, оскільки це порушує повітряний потік і може викликати контамінацію матеріалу та оператора.

Документи поміщати усередину боксу безпеки заборонено.

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 дослідним матеріалом у процесі роботи слід перенести вміст у чисту пробірку, а пошкоджену пробірку скинути в окрему ємкість для використаного 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, включно з обладнанням, повинні бути деконтаміновані. Обробку проводять робочим розчином дезінфектанту з відповідною експозицією, після чого протирають одноразовими серветками, змоченими в стерильній воді для зняття залишків дезінфекційного засобу.

8.10.1. Через наконечник відсмоктувача в кінці роботи пропускають дезінфекційний розчин, шланг відсмоктувача зовні обробляють серветкою, змоченою в 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 30 хвилин.

## **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 внаслідок 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 пробамі 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 скопійовані 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 нехтувати і забрудненням, що відбуваються поза лабораторією під час збору зразків, їх первинною обробкою (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°C призведе до деградації

ампліконів. УДГ є активною при температурі 20-50°C, тому вона не руйнує амплікони під час ПЛР, але вимагає ретельного підбору концентрації ферменту і негайного проведення електрофорезу або ГІФА 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 гібридизаційні 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) в 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.

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

9.6. Проведення ПЛР-досліджень до завершення знезаражувальних заходів та до отримання позитивних результатів внутрішньолабораторного контролю знезараження не допускається.

9.7. Порядок дій персоналу при контамінації ПЛР-лабораторії НК наведений нижче. Фахівців, які проводять деконтамінаційні заходи, забезпечують одноразовими халатами, шапочками, бахілами і рукавичками, одноразовим бавовняним тканинним матеріалом для прибирання (ганчірками), ємкостями для приготування необхідних кількостей мийних і дезінфекційних розчинів.

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

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

9.7.3. 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.

9.7.4. 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.

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

9.7.6. 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 у воді.

9.7.7. Після завершення вказаної обробки проводять знезараження ультрафіолетовими променями вологих поверхонь впродовж 1 години.

9.7.8. 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.

9.7.9. Після завершення усіх заходів дезінфекції беруть повторні змиви, які досліджують на наявність НК фітопатогенних організмів, діагностику яких найчастіше здійснювали в цій лабораторії, а також на виявлення НК збудників, що мають короткі (менш як 300 пар нуклеотидів) специфічні продукти ампліфікації (довжина специфічногофрагмента вказана в інструкціях до тест-систем).

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

9.7.11. Забруднений витратний матеріал (пробірки, наконечники тощо) автоклавують, після чого утилізують як поточне сміття.

## **10. Контроль якості досліджень і оцінка роботи ПЛР-лабораторії**

10.1. Контроль якості досліджень є невід'ємною складовою правильною 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, міжлабораторного контролю та перевірки професійного рівня.

10.3. Періодичність проведення внутрішньолабораторного контролю якості деконтамінації визначається керівником або уповноваженою особою лабораторії залежно від обсягу виконуваної роботи, не рідше одного разу у квартал. У разі підозри на контамінацію внутрішньолабораторний контроль деконтамінації об'єктів довкілля лабораторії проводять негайно.

10.4. 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.

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

10.6. Як «позитивні» можуть бути використані:

- зразки, штучно контаміновані НК;
- зашифровані проби матеріалу, уже дослідженого в лабораторії раніше, які зберігалися в морозильній камері. У цих пробах визначають НК тих самих фітопатогенних або генетично модифікованих НК, що при первинному дослідженні;

- атестовані контрольні зразки, 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.

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.

10.8. Основними критеріями оцінки якості роботи ПЛР-лабораторії є результати внутрішнього і зовнішнього лабораторного контролю якості досліджень.

10.9 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 10x10 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 приймання їжі, туалет тощо).

Після відбору змиву тампон поміщають у мікропробірки типу «епендорф» з 300-400 мкл ТЕ-буфера, обертальними рухами змивають відібраний матеріал впродовж 10-15 секунд, уникаючи розбрикування розчину, і, відтиснувши надлишок рідини з тампону об стінки пробірки, видаляють. Одержані суспензії центрифугують при 8 000 g (12 000 об/хв) впродовж 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.



## Орієнтовний перелік обладнання ПЛР-лабораторії

### Для обробки матеріалу і виділення НК

1. Бокс біологічної безпеки не нижче II класу.
2. Центрифуга лабораторна з охолодженням для пробірок об'ємом 1,5-2,5 мл.
3. Центрифуга-вортекс.
4. Мікроцентрифуга від 12 до 16 000 g для пробірок об'ємом 1,5 мл.
5. Твердотільний термостат для пробірок об'ємом 1,5 мл з діапазоном робочих температур 25-100 °С.
6. Вакуумний відсмоктувач (аспіратор) з колбою-пасткою.
7. Набір автоматичних піпеток (дозаторів) змінного об'єму (мінімум 3 дозатори: 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 (дозаторів) змінного об'єму з аерозольним бар'єром до 20, 200 та 1 000 мкл.
10. Одноразові наконечники для піпеток(дозаторів) змінного об'єму до 200 мкл.
11. Штативи для наконечників та мікропробірок об'ємом 1,5 мл.
12. Холодильник з камерами.
13. Ємкість з дезінфекційним розчином.
14. Ваги електронні аналітичні II класу точності. Точність 0,0001 г.
15. Млин лабораторний (з водяним охолодженням камери для подрібнення).
16. Гомогенізатор цифровий або його еквівалент.
17. Спектрофотометр.
18. Бактерицидний рециркулятор.
19. УФ-лампи.
20. Термометри.
21. Гігрометр.
22. Морозильна камера мінус 20<sup>0</sup> С.

### 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 (дозаторів) 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.
11. Ємкість для відпрацьованих витратних матеріалів.
12. Бактерицидний рециркулятор.
13. УФ-лампи.
14. Термометри.
15. Гігрометр.
16. Морозильна камера мінус 20<sup>0</sup> С.

#### **Для електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР**

1. Камера для горизонтального електрофорезу.
2. Джерело постійного струму з напругою 150-460 В.
3. Трансілюмінатор з кабінетом або камерою для перегляду гелів.
6. Комп'ютер для аналізу результатів електрофорезу та передачі їх до «чистої» зони.
7. Мікрохвильова піч для плавлення агарози.
8. Колба конічна з термостійкого скла для плавлення агарози об'ємом 250 мл.
9. Мірні циліндри об'ємом 1 л та 100 мл.
10. Штатив для мікропробірок на 0,5 або 0,2 мл.
11. Окрема автоматична піпетка до 20 мкл.
12. Одноразові наконечники для піпеток (дозаторів) змінного об'єму до 20 мкл.
13. Холодильник з камерою.
14. Ємкість для відпрацьованих витратних матеріалів, дезактивації буферу та гелів з бромистим етидієм.
15. Бактерицидний рециркулятор.
16. УФ-лампи.
17. Термометри.
18. Гігрометр.
19. Дистилятор.
20. Ваги.
21. рН-метр.
22. Морозильна камера мінус 20<sup>0</sup> С.

#### **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 (дозаторів) змінного об'єму.

8. Мірний циліндр об'ємом 1 л, 10 мл та 100 мл.

9. Холодильник з камерою.

10. Ємкість для відпрацьованих витратних матеріалів.

11. Морозильна камера мінус 20<sup>0</sup> С.

Додаток №2

### **Орієнтовний 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 г для пробірок об'ємом 1,5 мл.

5. Твердотільний термостат для пробірок об'ємом 1,5 мл з діапазоном робочих температур 25-100<sup>0</sup>С .

6. Вакуумний відсмоктувач з колбою-пасткою.

7. Набір автоматичних піпеток (дозаторів) 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 (дозаторів) змінного об'єму з аерозольним бар'єром до 20, 200 та 1000 мкл.

10. Одноразові наконечники для піпеток (дозаторів) змінного об'єму до 200 мкл.

11. Штативи для наконечників та мікропробірок об'ємом 1,5 мл.

12. Холодильник з камерами (при необхідності - мінус 70<sup>0</sup>С).

13. Ємкість з дезінфекційним розчином.

14. Бактерицидний рециркулятор.

15. УФ-лампи.

16. Термометри.

17. Гігрометр.

18. Морозильна камера мінус 20<sup>0</sup> С.

#### **Для проведення ампліфікації методом NASBA-Real-Time**

1. NucliSens EASYQ аналізатор і програмне забезпечення (версія 2.0 або вище) (bioMérieux) або інший аналізатор, здатний підтримувати цей формат реакції.
2. Настільний ПЛР-бокс з бактерицидною лампою.
3. Ємкість для скидання відпрацьованих наконечників.
4. Стрипи 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 (за необхідності).
7. NucliSens EASYQ інкубатор (bioMérieux - у разі потреби).
8. Міні-центрифуга для стрипованих пробірок ( $\pm 6000$  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.
11. Центрифуга-вортекс.
12. Центрифуга для пробірок на 1,5 мл (до 10000 g).
13. Бактерицидний рециркулятор.
14. УФ-лампи.
15. Гігрометр.
16. Морозильна камера мінус 20<sup>0</sup> С.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Закон України «Про карантин рослин» (електронний ресурс). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3348-12#Text>.
2. Постанова Кабінету Міністрів України від 15 листопада 2019 р. № 1177 «Деякі питання реалізації Закону України «Про карантин рослин» (електронний ресурс). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1177-2019-%D0%BF#Text>.
3. Наказ Міністерства розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України «Про затвердження Методів інспектування, огляду, у тому числі відбору зразків, та проведення фітосанітарної експертизи (аналізів)» від 22.02.2021 року № 343 (електронний ресурс). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0317-21#Text>.
4. Наказ Міністерства охорони здоров'я 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» від 24.01.2008 № 26 (електронний ресурс). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0088-08#Text>.
5. ДСТУ EN ISO/IEC 17025 Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.