

«Поліпшення навичок з лабораторної практики у фахівців агро-продовольчого сектору Східної Європи» (Ag-Lab)

Еразмус+ KA2 № 586383-EPP-1-2017-1-SI-EPPKA2-SBHE-JP(2017-2978/001-001)

Лабораторна практика

Посібник

*Під загальною редакцією **Клопчич Марії**, доктора наук, доцента та старшого наукового співробітника, Університет Любляни (Словенія) та **Іщенко Тетяни**, кандидата педагогічних наук, професора, Державна установа «Науково-методичний центр вищої та фахової передвищої освіти» (Україна)*

Автори:

Алексєєва Галина, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Арчвадзе Ніно, кандидат наук, викладач, Тбіліський державний університет (Грузія)

Богатко Надія, кандидат наук, доцент, Білоцерківський національний аграрний університет (Україна)

Кайсин Лариса, кандидат наук, доцент, Державний аграрний університет Молдови (Молдова)

Черкезія Єлена, кандидат наук, викладач, Тбіліський державний університет (Грузія)

Кошелева Ольга, магістр сільського господарства, викладач, Комратський державний університет (Молдова)

Де Флавіо Рікардо, доктор наук, професор, Університет Терамо (Італія)

Домненко Любов, керівник метрологічної служби, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Дзюба Ярослав, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Федотова Людмила, доктор наук, доцент, Комратський Державний університет (Молдова)

Гаркавенко Тетяна, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Жерар Робер, керівник метрологічної служби VetAgroSup Ліон (Франція)

Гетя Андрій, доктор сільськогосподарських наук, професор, Національний університет біоресурсів і природокористування (Україна)

ГотсїрїдзеОланї, доктор наук, професор, Кавказький міжнародний університет (Грузія)

Грищенко Наталїя, кандидат наук, доцент, Національний університет біоресурсів і природокористування (Україна)

Грищенко Сергїй, кандидат наук, доцент, Національний університет біоресурсів і природокористування (Україна)

Гулбанї Анна, кандидат наук, науковий співробітник, Лабораторія Міністерства сільського господарства (Грузія)

Гуледанї Іраклї, кандидат наук, науковий співробітник, Лабораторія Міністерства сільського господарства (Грузія)

Якімова Тетяна, кандидат наук, науковий співробітник, Республіканський центр ветеринарної діагностики (Молдова)

Іщенко Тетяна, кандидат педагогічних наук, професор, Державна установа «Науково-методичний центр вищої та фахової передвищої освіти» (Україна)

Інсарїдзе Ніно, кандидат біологічних наук, викладач, Тбіліський державний університет (Грузія)

Кандефер-Гола Мальгоржата, кандидат наук, асистент, Вроцлавський університет навколишнього середовища та наук про життя (Польща)

Кандїба Наталїя, кандидат наук, доцент, Сумський національний аграрний університет (Україна)

Карпуленко Максим, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Хїтська Оксана, кандидат наук, доцент, Білоцерківський національний аграрний університет (Україна)

Хоменко Микола, кандидат наук, професор, Державна установа «Науково-методичний центр вищої та фахової передвищої освіти» (Україна)

Київська Ганна, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Клопчич Марїя, доктор наук, доцент та старший науковий співробітник, Університет Любляни (Словенія)

Кондратюк Вадим, кандидат наук, доцент, Національний університет біоресурсів і природокористування (Україна)

Козек-Пажковська Катаржина, кандидат наук, доцент, Вроцлавський університет навколишнього середовища та наук про життя (Польща)

Коваленко Ігор, кандидат наук, доцент, Сумський національний аграрний університет (Україна)

Козицька Тамара, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Кучукашвілі Зураб, кандидат біологічних наук, доцент, Тбіліський державний університет (Грузія)

Курчі Діана, кандидат наук, науковий співробітник, Республіканський центр ветеринарної діагностики (Молдова)

Курта Христина, науковий співробітник, Українська лабораторія безпеки та якості харчових продуктів, Національний університет біоресурсів і природокористування (Україна)

Лапай Наталія, кандидат наук, науковий співробітник, Державний центр сертифікації та експертизи сільськогосподарської продукції (Україна)

Ложкіна Олена, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Литвиненко Олег, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Мардар Марина, професор, доктор наук, Одеська національна академія харчових технологій (Україна)

Мдінарадзе Ірма, доктор наук, професор, Кавказький міжнародний університет (Грузія)

Меженський Андрій, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Меженська Наталія, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Мікіашвілі Маріка, кандидат наук, науковий співробітник лабораторії Міністерства сільського господарства (Грузія)

Нейковчена Юлія, доктор наук, викладач, Комратський державний університет (Молдова)

Поварова Наталія, кандидат наук, доцент, Одеська національна академія харчових технологій (Україна)

Рубан Сергій, доктор сільськогосподарських наук, професор, Національний університет біоресурсів і природокористування (Україна)

Рубленко Ірина, кандидат наук, доцент, Білоцерківський національний аграрний університет (Україна)

Рубленко Михайло, доктор наук, академік Академії сільськогосподарських наук України, Білоцерківський національний аграрний університет (Україна)

Ружинська Ірина, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Сапачова Марія, кандидат наук, науковий співробітник, Державний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Україна)

Скрипник Єлена, кандидат наук, професор, Державний аграрний університет Молдови (Молдова)

Семанюк Володимир, кандидат наук, доцент, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького (Україна)

Шабан Нідал, доктор наук, професор, Софійський лісотехнічний університет, член ISLE (Болгарія)

Сімонов Мар'ян, кандидат наук, доцент, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького(Україна)

Соболта Андрій, кандидат наук, доцент, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького (Україна)

Стефаник Василь, кандидат наук, доцент, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького (Україна)

Стибель Володимир, доктор ветеринарних наук, професор, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького (Україна)

Тітлова Ольга, кандидат наук, доцент, Одеська національна академія харчових технологій (Україна)

Ткаченко Наталія, доктор наук, професор, Одеська національна академія харчових технологій (Україна)

Царенко Тарас, кандидат наук, доцент, Білоцерківський національний аграрний університет (Україна)

Турко Ігор, кандидат наук, доцент, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького (Україна)

Ушкалов Валерій, кандидат наук, науковий співробітник, Українська лабораторія якості та безпеки сільськогосподарської продукції, Національний університет біоресурсів і природокористування (Україна)

Вовкотруб Наталія, кандидат наук, доцент, Білоцерківський національний аграрний університет (Україна)

Виговська Лілія, кандидат наук, викладач - науковець, Національний університет біоресурсів і природокористування (Україна)

Зміст

Глава 1. ОСНОВИ РОБОТИ В ХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1.1. Підготовка лабораторії до проведення випробувань.

Правила безпеки /Н. Лапай/

1.2. Хімічний лабораторний посуд

1.2.1. Піпетки

1.2.2. Скляні колби

1.2.3. Мірні колби

1.3. Розчинники

1.3.1. Правила роботи з органічними та неорганічними розчинниками

1.3.2. Сильні та слабкі кислоти

1.3.3. Концентрація розчинів та розведень

1.4. Аналітична техніка та принципи їх виявлення

1.4.1. рН-метр: характеристики, використання та обслуговування

1.5. Оптичні методи аналізу

1.5.1. Фотоелектричні колориметри

1.5.2. Спектрофотометрія

1.6. Атомна спектроскопія

1.7. Хроматографічні методи аналізу

1.8. ІФА, ELISA-імуноферментний аналіз

1.8.1. Експериментальні методи визначення ферментативної активності

1.8.2. Класифікація методів ІФА

1.9. Гігієна та безпека в хімічній лабораторії

1.9.1. Охоронне обладнання

1.10. Управління відходами

Глава 2. ОСНОВИ РОБОТИ В БІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

2.1. Класифікація лабораторій. Рівні біологічної безпеки мікробіологічних лабораторій та основні вимоги до їх роботи

/І. Рубленко, М. Рубленко/

2.2. «Мале» лабораторне обладнання для мікробіологічних лабораторій /Л. Федотова, О. Кошелева/

2.2.1. Мікроскопи

2.2.2. Автоклав

2.2.3. Термостати

2.2.4. Сушильна шафа

2.2.5. Центрифуги

2.2.6. рН-метри

2.3. Бактерії та віруси, класифікація та небезпека /І. Рубленко,

Т. Царенко/

2.4. Різні поживні середовища. Особливості росту мікроорганізмів на поживних середовищах /В. Семанюк, І. Турко/

2.4.1. Типи поживних середовищ

2.4.2. Вимоги, що виставляють до поживних середовищ

2.4.3. Поживні середовища загального і спеціального призначення

2.4.4. Ріст мікроорганізмів на поживних середовищах

2.5. Принципи аналітичних методів /Л. Федотова, О. Кошелева/

2.5.1. Гравіметричний аналіз

2.5.2. Титрометричний аналіз

2.5.3. Спектрофотометричний аналіз

2.5.4. Електрохімічні методи аналізу

2.5.5. Хроматографічні методи аналізу

2.5.6. Види хроматографічних методів

2.6. Принципи молекулярної діагностики /Л. Іщенко, В. Ушкалов, Л. Виговська/

2.6.1. Теоретичні основи методів молекулярної діагностики

2.6.2. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

2.7. Паразитологічні аналізи /А. Соболта, В. Стибель/

2.7.1. Діагностування гельмінтозів та протозоозів у фекаліях тварин. Підбір розчинів та процедура проведення

2.7.2. Додаткові методи досліджень для ідентифікації специфічних паразитарних інвазій

2.7.3. Диференційне діагностування псевдопаразитів

2.8. Гігієна і безпека в біологічних лабораторіях

/О. Хіцька, Н. Богатко, Н. Вовкотруб/

2.8.1. Принципи біологічної безпеки в лабораторіях

2.8.2. Гігієнічні вимоги до приміщень лабораторій. Правила безпеки роботи на обладнанні

2.8.3. Основи транспортування та методи роботи з біологічним матеріалом

2.8.4. Дезінфекція та стерилізація

2.8.5. Хімічна, протипожежна і електробезпека. Гігієнічні вимоги до освітлення, водопостачання, вентиляції, газопостачання, рівнів шуму та вібрації

2.8.6. Організація безпечної роботи та навчання персоналу

2.8.7. Оцінювання ризиків у біологічній лабораторії та алгоритм дій щодо управління ними

2.8.8. Порядок дій під час ліквідації наслідків аварій та нещасних випадків у лабораторіях

2.9. Видалення відходів /М. Сімонов, В. Стефанік/

2.9.1. Типи відходів у лабораторній практиці

2.9.2. Ризики, зумовлені відходами

2.9.3. Збирання, сортування та тимчасове зберігання

[2.9.4. Загальні вимоги до інвентарю та ємностей для зберігання відходів](#)

[2.9.5. Видалення та транспортування](#)

[2.9.6. Ведення документації](#)

Глава 3. ВЗЯТТЯ ЗРАЗКІВ

[3.1. Відбір зразків \(включаючи сипучі та упаковані зразки\), транспортування, зберігання, обробка та переробка /А. Гулбані, І. Гуледані/](#)

[3.2. Матриці та прикладні технології](#)

[3.2.1. Агропродовольство](#)

[3.2.1.1. М'ясні продукти /М. Мікіашвілі/](#)

[3.2.1.2. Морепродукти та риба /Н. Поварова/](#)

[3.2.1.3. Продукти рослинного походження /І. Мдінарадзе/](#)

[3.2.1.4. Молочні продукти /Н. Ткаченко/](#)

[3.2.1.5. Вино та алкогольні напої /О. Готсірідзе/](#)

[3.2.2. Ветеринарна медицина /Т. Гаркавенко, А. Меженський, М. Карпуленко, Г. Київська, О. Ложкіна, Н. Алексеева, М. Сапачова, Е. Дзюба, Т. Кожицька, Н. Меженська, О. Литвиненко, І. Ружинська/](#)

[3.2.2.1. Кров](#)

[3.2.2.2. Фекалії](#)

[3.2.2.3. Сеча](#)

[3.2.2.4. Тканини від трупів тварин](#)

[3.2.2.5. Епітеліальна тканина](#)

[3.2.2.6. Проби з ока](#)

[3.2.2.7. Проби з репродуктивних органів](#)

[3.2.2.8. Назальна рідина, слина та везикулярна рідина](#)

[3.2.2.9. Мокротиння](#)

[3.2.2.10. Молоко](#)

[3.2.2.11. Проби з абсцесів, лімфовузлів та виділення з ран](#)

[3.2.2.12. Кістки](#)

[3.2.2.13. Проби з мозку](#)

[3.2.2.14. Відбір проб за підозри на захворювання з ознаками ураження нервової системи](#)

[3.2.2.15. Проби від медових бджіл](#)

[3.2.2.16. Проби від риби](#)

[3.2.3. Біопсія /М. Кандефер - Гола/](#)

[3.3. Агрономія](#)

[3.3.1. Ґрунт /Н. Кандиба, І. Коваленко/](#)

[3.3.2. Насіння](#)

[3.3.2.1. Відбір зразків насіння та рослинного матеріалу для аналізу /Н. Кандиба, І. Коваленко/](#)

[3.3.2.2. Відбір проб та визначення параметрів якості насіння /Н. Шабан/](#)

Глава 4. АНАЛІЗИ ТА ЇХ ПРОВЕДЕННЯ

4.1. Поняття аналізу (прикладні дослідження) /З. Кучукашвілі, Н. Інасарідзе/

4.1.1. Вступ

4.1.2. Загальні лабораторні та процедурні вимоги

4.2. Методи валідації /Т. Якімова, Д. Курчі/

4.2.1. Використання кваліфікаційних досліджень та інших міжлабораторних порівнянь у процесі акредитації

4.2.2. Вибір і використання референтних матеріалів

4.3. Результати аналізу /Р. Жерар/

4.3.1. Простежуваність

4.3.2. Невизначеність результатів

4.3.3. Контроль під час аналізу

4.3.4. Необроблені дані

4.3.5. Контроль після аналізу

4.3.6. Редагування звіту про аналіз

4.4. Отримані результати та їх узгодженість. Якість аналітичних результатів

4.5. Обговорення з клієнтом /Р. Жерар/

4.6. Етика в лабораторії /Н. Арчвадзе, Е. Черкешія/

4.6.1. Загальні твердження

4.6.2. Етика під час роботи з тваринами

4.6.3. Етика під час роботи з людьми

4.6.4. Лабораторна безпека та лабораторна етика

Глава 5. СТАНДАРТИ

5.1. Лабораторні стандарти /Р. Жерар/

5.2. Національне та міжнародне визнання (акредитація, НЛП, НВП тощо)

5.3. Документи та робота з ними /О. Хітська/

5.4. Метрологічне забезпечення лабораторії /Л. Домненко/

5.4.1. Структура метрологічної служби, цілі та основні принципи роботи

5.4.2. Забезпечення компетентності метрологічних лабораторій підприємств у сучасних умовах

5.4.3. Система менеджменту якості лабораторії, документи

5.4.4. Документація лабораторії

5.5. Акредитація /Р. Жерар, К. Козек - Пазжковська/

5.6. Міжнародні організації в галузі лабораторної практики: Асоціація офіційних хіміків-аналітиків, мікробіологів, ISO, Європейські норми /Т. Якімова/

Глава 6. ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ

6.1. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) як метод молекулярно-генетичного аналізу /С. Рубан, А. Гетя, С. Грищенко, Х. Курта, С. Ведмідь, Н. Грищенко, О. Скрипник, Л. Кайсин, М. Хоменко/

6.2. Вимоги до інструментів та обладнання

6.2.1. Опис інструментів та обладнання з їх характеристикою та призначенням для проведення лабораторних робіт

6.3. Основні технічні вимоги до лабораторій, облаштування робочих місць, вимоги до приміщення

6.4. Рекомендації ICAR щодо акредитації лабораторій. Світові вимоги до лабораторій, правила акредитації. Принципи роботи референс-лабораторій

6.4.1. Генетичні маркери

6.4.2. Використання ДНК технологій

6.4.3. Технічні аспекти

6.4.4. Акредитація лабораторій, що надають послуги із генотипування ДНК

6.5. Методики відбору середніх проб біологічного матеріалу

6.5.1. Техніка відбору середніх проб та способи їх короткотермінового або довготривалого зберігання для визначення показників якості

6.5.2. Відбір проб для проведення ДНК-досліджень

6.5.3. Основні принципи формування банків біологічного матеріалу

6.6. Методики лабораторних досліджень під час здійснення цитогенетичного аналізу

6.6.1. Опис методів роботи з підготовки препаратів та їх дослідження на мікроскопі

6.7. Методики молекулярно-генетичного аналізу

6.7.1. Опис основних методик виділення ДНК та РНК

6.7.2. Методика очищення розчину за допомогою методів органічної екстракції (за допомогою фенолу, хлороформу) з послідуєчим осадом ДНК спиртами і розчиненням у воді та ТЕ-буфері. Методика диференційованої сорбції ДНК на твердих носіях

6.8. Методики аналізу отриманих генетичних даних та їх верифікація

6.8.1. Методи математичної обробки отриманих даних для підтвердження робочої гіпотези

Глава 7. СЕНСОРНИЙ АНАЛІЗ

7.1. Вступ до сенсорного аналізу /Р. де Флавіз, О. Тітлова, Л. Федотова, І. Нейковчена/

7.1.1. Застосування сенсорного аналізу в сучасних харчових технологіях

7.1.2. Основні визначення і терміни

7.2. Сенсорні ознаки та їх сприйняття

7.3. Вимоги до лабораторій сенсорного аналізу. Національне та міжнародне визнання

7.3.1. Оформлення кімнат для випробувань

[7.3.1.1. Оформлення сектора для випробувань](#)

[7.3.1.2. Оформлення сектора підготовки зразків](#)

[7.3.1.3. Офіс](#)

[7.3.2. Вибір панелей та навчання](#)

[7.3.2.1. Підбір оцінювачів](#)

[7.3.2.2. Довідкова інформація та попередній вибір](#)

[7.3.2.3.Скринінг](#)

[7.3.2.4. Навчання](#)

[7.3.3. Процедури обслуговування](#)

[7.4. Основні сенсорні випробування](#)

[7.4.1. Якісні дискримінаційні тести](#)

[7.4.1.1. Тест на відмінності в парі](#)

[7.4.1.2. Метод трикутника](#)

[7.4.1.3. Duo-trio тест](#)

[7.4.2. Дискримінаційні якісні та кількісні тести](#)

[7.4.2.1. Класифікаційне випробування](#)

[7.4.2.2. Тест з класифікації діапазону](#)

[7.4.2.3. Тест множителів \(шкали відгуків\)](#)

Вступ

Цей посібник видано в рамках проєкту ЄС Еразмус + «Поліпшення навичок з лабораторної практики у фахівців агро-продовольчого сектору Східної Європи» (Ag-Lab). Колектив авторів складається з викладачів університетів та фахівців агропродовольчих лабораторій Словенії, Франції, Італії, Польщі, України, Грузії та Молдови. Видання призначене для підготовки студентів-магістрів факультетів ветеринарної медицини, агрономії, тваринництва та харчових технологій, які спеціалізуються на лабораторній практиці, для фахівців-початківців, які починають свою роботу в лабораторіях агропродовольчого сектору, а також для фахівців, які вже працюють у лабораторіях, з метою оновлення їхніх професійних знань.

Посібник охоплює всі сфери агропродовольчого виробництва та загальну інформацію, пов'язану з лабораторною практикою, таку як основи роботи в хімічній та біологічній лабораторіях, лабораторне обладнання, методи лабораторних аналізів, методи відбору проб для різних матриць, міжнародні норми, пов'язані з лабораторною практикою, управління якістю та питання метрології. Дві конкретні частини присвячені генетичним аналізам, що застосовують у тваринництві, та сенсорним аналізам, що застосовують у контролі харчових продуктів.

Видання містить основну інформацію, необхідну для роботи в лабораторіях, і зроблено у формі посібника. Для глибшого вивчення деяких конкретних наукових, правових і технічних питань, слід використовувати додаткові джерела. Цей посібник може використовуватися на міжнародному рівні та містить норми, правила, прийоми, методи, що застосовуються в країнах ЄС та в країнах, що гармонізують своє законодавство і системи контролю з європейськими стандартами.

Глава 1. ОСНОВИ РОБОТИ В ХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1.1. Підготовка лабораторії до проведення випробувань. Правила безпеки

/Н. Лапай/

Робота в хімічній лабораторії для необізнаних людей іноді нагадує чаклунство чарівника, а для інших вона нічим не відрізняється від звичайних дій господині на кухні. І дійсно, хімік у лабораторії – це все одно, що кухар на кухні. Але хімік орудує не звичайним посудом, а спеціальним – хімічним – і змішує не харчові продукти, а хімічні реактиви.

Для того щоб успішно впоратися з виконанням хімічних експериментів, необхідно чітко знати, яке обладнання є в хімічній лабораторії, який посуд використовують хіміки і для чого він потрібний. Хімічні методи, як правило, засновані на хімічних реакціях досліджуваної речовини з певними реагентами в присутності відповідних індикаторів з використанням вагового чи об'ємного аналізів.

Виконання вимірювальних робіт в хімічній лабораторії пов'язано з низкою небезпечних та шкідливих виробничих чинників. Основою безпечної роботи є дотримання правил безпеки і протипожежних заходів.

У лабораторіях постійно проводять дослідження із застосуванням хімічних речовин. У разі неправильного поводження з речовинами хімічного походження можливе отруєння працівників, хімічні опіки, розвиток професійних захворювань.

У правилах охорони праці регламентовано вимоги щодо показників мікроклімату, вмісту шкідливих речовин, рівня шуму та вібрації, освітленості у хімічних лабораторіях.

Приміщення лабораторій забезпечують природним, штучним та суміщеним освітленням залежно від характеристики зорової роботи. Місцеве освітлення мають застосовувати у комбінації із загальним освітленням. Застосування лише місцевого освітлення заборонено. Світильники місцевого освітлення за своїм улаштуванням мають відповідати категорії та групі вибухонебезпечних речовин і бути влаштовані таким чином, щоб працівник міг за бажанням змінити напрям світлового потоку.

Показники мікроклімату в робочій зоні хімічних лабораторій мають відповідати вимогам «Державних санітарних норм мікроклімату виробничих приміщень». У робочій зоні хімічних лабораторій вміст пилу, газів і пари шкідливих речовин не має перевищувати ГДК, встановлених чинними нормативними документами.

Роботи в лабораторії мають проводити тільки за справної вентиляції, необхідно передбачити автоматичне включення та блокування вентиляції. У разі виявлення будь-яких несправностей вентиляції працівник зобов'язаний повідомити про це керівника лабораторії, а також службу охорони праці.

Приміщення хімічних лабораторій, призначені для робіт з надзвичайно небезпечними (1-й клас безпеки) і високонебезпечними (2-й клас безпеки) речовинами, мають бути ізольовані від інших приміщень лабораторії, мати окремий вхід і витяжні шафи, не пов'язані з вентиляцією інших приміщень. Усі роботи з їдкими, отруйними, з різким запахом, легкозаймистими та вибухонебезпечними речовинами проводять в ізольованих (від загального приміщення лабораторії) і забезпечених ефективними вентиляційними пристроями у приміщеннях або витяжних шафах. Витяжні шафи обладнують відсмоктувачами.

Для захисту працівників хімічних лабораторій від дії небезпечних та шкідливих чинників необхідно використовувати засоби колективного захисту відповідно до вимог діючої нормативної документації. У приміщенні хімічних лабораторій мають бути у наявності первинні засоби пожежогасіння (ящики з сухим піском, вогнегасники, пожежні покривала з негорючого теплоізоляційного матеріалу тощо), для зазначення місця розміщення яких встановлюють вказівні знаки відповідно до ISO 6309:2007 «Протипожежний захист. Знаки безпеки. Форма та колір» (ISO 6309:1987, IDT).

Працівники хімічних лабораторій мають бути забезпечені спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту (ЗІЗ) відповідно до вимог «Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту».

Під час виконання своїх обов'язків працівник лабораторії зобов'язаний дотримуватися вимог санітарних норм та особистої гігієни: приступати до роботи тільки у засобах індивідуального захисту; приймати і утримувати протягом зміни робоче місце чистим і у належному стані.

Для нейтралізації пролитих кислот або лугів у хімічній лабораторії мають бути склянки із заздалегідь приготовленими нейтралізуючими розчинами (харчової соди – для кислот та оцтової кислоти – для лугів) тощо. Тверді відходи, що накопичуються в хімічній лабораторії, необхідно збирати в окрему тару і знищувати у місцях, узгоджених з органами санітарного і пожежного нагляду.

Роботи, під час проведення яких можливий бурхливий перебіг процесу, підвищення тиску, перегрів скляного приладу або його пошкодження з розбризуванням гарячих або їдких продуктів, а також роботи під вакуумом мають виконуватися у витяжних шафах на спеціальних листах. За місцем таких робіт необхідно встановлювати прозорі запобіжні щитки. У разі змішування або розведення речовин, що супроводжується виділенням тепла, слід користуватися термостійким скляним або фарфоровим посудом. Скляний термостійкий посуд заборонено нагрівати на відкритому вогні без термостійкої сітки; тонкостінні хімічні склянки і колби зі звичайного скла не можна нагрівати на відкритому вогні та електроплитках.

Хімічні речовини зберігають у хімічних лабораторіях відповідно до сертифіката про термін та умови зберігання заводу-виготовлювача. Основну (запасну) кількість хімічних речовин зберігають у спеціальному ізолюваному приміщенні за межами хімічної лабораторії. На кожній посудині має бути етикетка з чіткою назвою речовини та з написом, що свідчить про наявність у речовині отруйних, вогненебезпечних властивостей: червона – «Вогненебезпечно», жовта – «Отрута», зелена – «Берегти від води» або інших. Зберігати хімічні речовини із нерозбірливими написами та без етикеток заборонено. Речовини у склянках, що не мають етикеток, підлягають знищенню. Під час зберігання вогне- і вибухонебезпечних речовин, враховуючи їх фізико-хімічні властивості, необхідно дотримуватися додаткових заходів безпеки, а саме: діетиловий (сірчаний) ефір потрібно зберігати ізолювано від інших речовин у холодному і темному місці; металічний натрій має зберігатись у товстостінних скляних банках з широкими шийками, які щільно закриваються пробкою під шаром сухого (без вологи) гасу, парафіну або трансформаторного мастила в ящиках з піском; гідроген пероксиду, перхлоратну кислоту (концентровану) та інші окисники не можна зберігати разом з відновниками – вугіллям, сіркою, крохмалем тощо; металічний натрій і фосфор не можна зберігати разом з бромом і йодом. Скляна посудина для зберігання легкозаймистих рідких речовин, ємність якої більша за 1 л, має бути розміщена у герметичному металевому футлярі.

Під час виконання низки робіт у хімічній лабораторії використовують гази, які перебувають під тиском. Це можуть бути інертні гази (наприклад, аргон, азот, гелій, вуглецю діоксид) або вибухонебезпечні, які здатні до горіння (водень, кисень). Гази поміщають, як правило, в балонах під тиском до 250 атм. Залежно від вмісту газу балони пофарбовані у певний колір.

Гази відбирають з балонів за допомогою редукторів, які пофарбовані у колір відповідний до кольору балона. Відбір газів без відповідного редуктора категорично забороняється.

У разі використання стисненого газу (в деяких випадках скрапленого) насамперед необхідно ретельно перевірити справний стан балона та редуктора і те, що термін придатності балона ще не сплив. У разі спливу терміну чергової придатності балона, а також пошкодження корпусу балона або редуктора ними користуватися заборонено.

Балони з газом треба оберегти від поштовхів, механічних пошкоджень та нагріву. Їх вміщують у металеві ящики, які знаходяться поза приміщенням, а газ підводять в лабораторію спеціальним трубопроводом, який монтують згідно з певними правилами.

Категорично забороняється залишати балон з газом без нагляду з незакритим вентиляем.

1.2. Хімічний лабораторний посуд

Хімічний лабораторний посуд можна поділити на групи.

За призначенням:

- загальний;
- спеціальний;
- мірний.

За матеріалом: із простого скла, спеціального, із кварцу.

До групи загального призначення належать ті предмети, які завжди мають бути в лабораторії і без яких не можна провести більшість робіт. Такими є: пробірки, лійки прості та мірні, склянки, плоскодонні колби, кристалізатори, конічні колби (Ерленмейєра), колби Бунзена, холодильники, реторти, колби для дистильованої води, трійники, крани тощо.

До групи спеціального призначення належать ті предмети, які використовують для певної мети, наприклад: апарат Кіппа, апарат Сокслета, прилад К'ельдаля, дефлегматори, склянки Вульфа, склянки Тищенко, пікнометри, ареометри, круглодонні колби, спеціальні холодильники, прилади для визначення температури плавлення і кипіння тощо.

До мірного посуду належать: мірні циліндри і мензурки, піпетки, бюретки та мірні колби. Призначений для вимірювання об'єму рідини.

1.2.1. Піпетки

Піпетки являють собою порожню трубку з витягнутим носиком і є незамінним інструментом дозування рідини, застосовують у хімічних, екологічних, мікробіологічних та медичних лабораторіях.

Види піпеток:

- градуйовані піпетки;
- піпетки Мора;
- піпетки Салі;
- піпетки Пастера;
- піпетки Панченкова;
- піпетки-крапельниці;
- електронні або механічні пневматичні дозатори.

Як правило, їх виробляють з хімічно стійкого скла або полімерних матеріалів.

В аналітичній хімії найчастіше застосовують градуйовані піпетки (з поділками) і піпетки Мора (з однією поділкою). Серед градуйованих піпеток окремо виділяють мікропіпетки – вони призначені для дозування рідин об'ємом 0,1 і 0,2 мл.

Для забору рідини в піпетку використовують груші з гуми або ПВХ. Також існують спеціальні груші для піпеток з клапанами.

Градуйовані піпетки було винайдено ще в середині ІХХ століття і дотепер є незамінним інструментом для точного відмірювання певного об'єму рідини. Шкала піпеток відградуйована в кубічних сантиметрах (см³) за температури 20 °С. Градуйовані піпетки випускають двох класів точності (1-й і 2-й) Градуйовані піпетки виготовляють декількох видів:

- 1 – піпетки з поділками прямі;
- 1а – піпетки з поділками прямі із запасним резервуаром;
- 2 – піпетки з поділками з розширенням;
- 2а – піпетки з поділками з розширенням і запасним резервуаром.

Крім цього, піпетки поділяють на типи. Найбільш популярні піпетки трьох типів:

тип 1– піпетки на слив від верхньої нульової позначки до будь-якої позначки. Нижня позначка на піпетці відповідає номінальній місткості. Такі піпетки називаються піпетками на неповний слив. Піпетки такого типу можуть бути 1 і 2 класу точності;

тип 2– піпетки на злив рідини від будь-якої позначки до зливного кінчика. Верхня відмітка відповідає значенню місткості. Це піпетки на повний злив. Піпетки такого типу можуть бути 1 і 2 класу точності;

тип 3– піпетки на злив рідини від верхньої нульової позначки до зливного кінчика. Нижня частина зливного кінчика відповідає номінальним обсягом. Піпетки такого типу можуть бути тільки 2-го класу точності.

На сьогоднішній день в усіх сучасних лабораторіях використовують кілька типів автоматичних піпеток(дозаторів), а саме:

- механічні дозатори змінного обсягу;
- механічні дозатори фіксованого обсягу;
- електронні дозатори.

Механічні дозатори виготовляють в різних модифікаціях, мають різні обсяги дозування, різну кількість каналів (як правило, це 1, 8, 12 або 16), деякі моделі можна піддавати повному або частковому автоклавуванню.

Механічні дозатори змінного і фіксованого обсягу мають схожий принцип дії, головною відмінною особливістю є те, що в першому випадку можна вибрати необхідний для цього аналізу обсяг в заданих параметрах приладу (наприклад, від 100 до 1000 мкл), а в останньому тільки той обсяг, який передбачений саме цією моделлю (наприклад, 100 мкл). Вибір обсягу дозування відбувається за допомогою обертання спеціального регульовального коліщатка (барабана) на корпусі приладу, при цьому на дисплеї відображається значення обраного обсягу. Виробники зазвичай розташовують регульовальний барабан під основною робочою кнопкою приладу.

Наконечники для дозаторів рекомендовано використовувати одноразово, після роботи утилізуючи їх. Якщо ви дозуєте одну і ту саму рідину, то в ході роботи можна не міняти наконечник, але в разі переходу до інших розчинів, обов'язково слід змінити наконечник. За акуратної роботи наконечники можна

використовувати повторно, попередньо промивши їх і піддавши стерилізації та сушінню. Наконечники виготовляють з поліпропілену, який витримує автоклавовання 121 °С.

Наконечники є двох основних видів: стерильні і нестерильні.

Для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та інших медичних аналізів, яким важлива чистота і виключення чужорідних ДНК і РНК, потрібно, звичайно, використовувати стерильні наконечники. Наконечники можуть бути упаковані в пакети розсипом або розфасовані в спеціальні штативи. Кількість наконечників в упаковці формують залежновід об'єму одного наконечника, тобто що більше об'єм, то менше їх міститься в пакеті. Для кожної фірми і типу дозаторів існують свої, унікальні наконечники, але є також і універсальні, а їх розмір має відповідати розміру і об'єму використовуваного дозатора.

Нижня частина дозатора оснащена, так званим, «посадковим конусом», до якого необхідно герметично приєднати наконечник. Не варто одягати наконечник руками, особливо якщо ви працюєте зі стерильними наконечниками. Для зручності роботи можна використовувати спеціальні штативи для наконечників.

Під час роботи необхідно уникати перепаду температур між приладом, наконечником і дозованою рідиною, щоб уникнути пошкодження приладу. Також перепад температур може позначитися на точності дозування.

Механічні піпетки (дозатори) мають високу перевагу перед скляними у швидкості дозування, точності та зручності. Але поряд із перевагами, механічні піпетки (дозатори) мають також і недоліки. Наприклад, більшість з цих пристроїв не можна використовувати для відбирання агресивних речовин (концентрованих кислот, лугів, розчинників тощо). Під час роботи з такими речовинами відбувається псування дозувального механізму і піпетка виходить із ладу.

1.2.2. Скляні колби

Хімічний лабораторний посуд виготовляють з різних природних та штучних матеріалів: скла, порцеляни, корунду, шамоту, кварцу, металу, пластмас та ін. Найбільш поширений у лабораторіях посуд загального призначення, який виготовляють із скла. Завдяки термічній стійкості скло є придатним матеріалом для виготовлення хімічного посуду. В тих випадках, коли його хімічної або термічної стійкості недостатньо, застосовують посуд з інших матеріалів.

Під термічною стійкістю розуміють здатність скла витримувати (без руйнування) різкі коливання температури. За термічною стійкістю скло поділяють на групи, виходячи з коефіцієнтів їх термічного розширення (КТР) в інтервалі температур 20–300 °С.

Під хімічною стійкістю розуміють здатність скла протистояти руйнівній дії води, кислот, лугів та інших хімічних реагентів.

Колба – скляна посудина з круглим або плоским дном і видовженою шийкою. Колби є різної місткості – від 50 см³ до кількох дм³, зі шліфами і без них:

- плоскодонні;
- конічні;
- круглодонні;
- грушоподібні.

Плоскодонні і конічні колби зазвичай використовують як приймач під час перегінки рідин, для приготування розчинів і кристалізації. Їх не можна застосовувати в разі нагрівання речовин до високих температур і використовувати за зниженого тиску.

Круглодонні колби використовують для перегінки речовин, а також і під вакуумом. Довжина і діаметр горла круглодонних колб можуть бути різними. Такі колби є дво-, тригорлими і т. інше. Круглодонні колби з відвідною трубкою називають колбами В'юрца. Вони призначені для перегінки атмосферного тиску. Для перегінки зниженого тиску застосовують колби Кляйзена.

Колби для відсмоктування (Бунзена) використовують для фільтрування під вакуумом.

1.2.3. Мірні колби

Зазвичай плоскодонні з довгими шийками, призначені для приготування розчинників визначеної концентрації, розчинення речовин, розбавлення розчинів, мають кільцеву позначку на циліндричній частині шийки.

Правила роботи з мірними колбами

Колбу беруть за верхню частину горла, уникаючи торкання руками до її опуклою частини. Від тепла, що передається руками стінкам колби, ємність колби і, отже, обсяг рідини в ній збільшується. Перед заповненням колбу ставлять на рівну, поверхню столу, щодобре освітлюється.

Для розчинення в мірній колбі твердої речовини його поміщають у колбу, яку заповнюють розчинником не більше ніж на 1/2 або 2/3. Потім вміст колби збовтують плавними круговими рухами до повного розчинення речовини. Лише після цього додають у колбу решту порції розчинника.

Останні порції розчинника додають краплями за допомогою піпетки, забезпеченої гумовим ковпачком. Під час додавання останніх крапель рідини очі експериментатора і позначка колби мають бути на одному рівні. Увігнутий меніск поверхні рідини своєю нижньою частиною має зливатися з лінією позначки, а опуклий меніск має зливатися з лінією позначки своєю верхньою частиною. Краплі розчинника, утримувані на внутрішній поверхні шийки колби, вищі за позначку, обережно видаляють за допомогою згорнутою трубкою

фільтрувального паперу. Закоркувавши колбу корком, розчин дуже ретельно перемішують.

Під час відбору з мірної колби частини розчину за допомогою піпетки нижній кінець її занурюють у розчин майже до дна колби. Якщо піпетка опущена не до дна колби, то під час засмоктування розчину разом з рідиною в піпетку проскакуватиме повітря.

Не рекомендується:

а) заповнювати мірні колби розчинами речовин, що важко відмиваються, або, що утворюють на стінках колби гелі, що важко видаляються;

б) зберігати в мірних колбах упродовж тривалого часу приготовані розчини;

в) нагрівати мірні колби, зливати в них залишки реактивів, використати їх не за призначенням.

Обслуговування хімічного посуду

Першою і головною вимогою до співробітників лабораторії є заборона користуватися брудним посудом і обладнанням.

Вміннямитихімічний посуд є тією частиною лабораторної техніки, знання якої обов'язкове для кожного працівника лабораторії.

Видалити забруднення зі стінок посуду можна різними методами: механічними, фізичними, хімічними, фізико-хімічними або комбінованими.

Для вибору способу миття посуду кожному окремому випадку треба володіти такою інформацією:

1. знати властивості забруднюючих посуду речовин;
2. використовувати розчинність забруднення в воді (холодній або гарячій), у розчинах лугів, різних солей та кислот;
3. використовувати властивості окиснювачів, окиснювати в певних умовах органічні та неорганічні забруднення, руйнувати їх з утворенням легко розчинних сполук;
4. для миття можуть бути використані всі речовини, які мають поверхнево-активні властивості (мило, синтетично-мийні речовини, мийні глини тощо);
5. якщо осад, який забруднює посуд, хімічно стійкий, для його видалення можна використати механічне очищення (за допомогою юржів тощо);
6. із реактивів для миття слід застосовувати лише дешеві матеріали;
7. треба завжди пам'ятати про техніку безпеки і можливості нещасних випадків під час миття посуду. Кожний новий працівник лабораторії має бути ознайомлений з правилами техніки безпеки.

Під час миття хімічного посуду слід дотримуватися таких правил:

1. мити посуду слід одразу після її використання, в решті-решт – в кінці робочого дня. Не можна відкладати миття забрудненого посуду на наступний день;

2. вибираючи спосіб очищення слід виходити з природи забруднення – його розчинності у воді або водних розчинах, органічних розчинниках, здатності окиснюватися;

3. якщо попередньо невідомо, якому методу очищення надати перевагу, починати слід з найбільш простого і доступного способу – миття гарячою або мильною водою. Використовувати більш сильні засоби – гарячі розчинники, концентровані кислоти і луги, хромову суміш – слід тільки в тих випадках, коли забруднення не відмиваються водою;

4. миючи посуд, слід обов'язково одягати гумові рукавички, а в разі використання агресивних рідин, особливо хромової суміші, концентрованих лугів тощо – захисні окуляри чи маску;

5. бажано, щоб очищення посуду здійснювалось безпосередньо працівником, який його використовує. Доручати цю операцію іншим особам дозволяється лише у тих випадках, коли в лабораторії працюють з однотипними речовинами, забруднення не агресивні, не токсичні і легко змиваються будь-яким одним засобом. Якщо властивості забруднень лаборанту невідомі, перед миттям посуду він має одержати інструктаж;

6. посуд, який призначено для проведення особливо точних операцій і для аналітичних цілей, після миття водопровідною водою слід декілька разів прополоскати дистильованою водою.

Мірні колби, піпетки вважаються чистими тільки у тому випадку, якщо на них немає яких-небудь видимих на око забруднень і якщо дистильована вода стікає з внутрішніх стінок посудини, не залишаючи капель. Якщо на склі залишаються краплі води, то це свідчить про забруднення його жировими речовинами. Жирові забруднення сильно спотворюють результати виміру місткостей усіх об'ємно-вимірвальних посудин, і тому їх присутність неприпустимо.

Для видалення жирових забруднень колби, піпетки миють хромовою сумішшю, лужним розчином перманганату, сумішшю спирту з ефіром, спиртовим розчином їдкого калію, гарячим розчином тринатрійфосфату (пральним порошком) і т. інше. Хромову суміш готують змішенням рівних об'ємів насиченого на холоді розчину біхромату калію і концентрованої сірчаної кислоти.

В аналітичній лабораторії не можна використовувати неперевірений мірний посуд. Перевірка мірного посуду полягає у визначенні його дійсного вмісту ($V_{\text{дійсн.}}$). Як результат перевірки знаходять поправку ΔV до його номінального об'єму, що позначений на вимірвальному посуді $\Delta V_{\text{ном.}} = V_{\text{дійсн.}} - V_{\text{нам.}}$. Перед перевіркою мірний посуд старанно миють і сушать, потім заповнюють до позначки дистильованою водою за певної температури і барометричного тиску. Воду виливають у завчасно зважений на вагах посуд з точністю, яка відповідає місткості мірного посуду, щоб похибка зважування не перевищувала 0,1 % від маси води.

Якщо ΔV виходить за межі допустимих похибок, то посуд поправляють введенням у розрахунки похибки або нанесенням нової позначки.

1.3. Розчинники

Розчинник – індивідуальна хімічна сполука або суміш, здатна розчиняти різні речовини, тобто утворювати з ними однорідні системи змінного складу, що складаються з двох або більшого числа компонентів – розчини.

Вимоги до розчинників

Здебільшого будь-яка речовина може бути розчинником для якої-небудь іншої речовини. Проте на практиці до розчинників відносять тільки такі речовини, які відповідають певним вимогам. Наприклад, розчинники повинні мати гарну, т. з. активну розчинювальну здатність, бути досить хімічно інертними відносно речовини, що розчиняється, і апаратури.

Хімічна класифікація розчинників

Найбільш споживана хімічна класифікація, відповідно до якої всі розчинники підрозділяють, це:

- неорганічні;
- органічні.

Неорганічні розчинники

Найпоширенішим неорганічним розчинником, вживаним для великого числа неорганічних і органічних з'єднань, є вода. До неорганічних розчинників відносять також: рідкий аміак – гарний розчинник для лужних металів, фосфору, сірки, солей, амінів та інших речовин; рідкий сірчистий ангідрид – розчинник для багатьох органічних і неорганічних сполук.

Органічні розчинники

Велике значення мають численні органічні розчинники. Це перш за все розчинники нафтові (у тому числі і їх галогенотвірні), спирти, прості і складні ефіри, кетони, нітросполуки. Як розчинники поширені і суміші різних індивідуальних речовин, наприклад бензини, петролейний ефір, суміші спиртів і ефірів, також діетиловий ефір, ацетон, скипидар, чотирихлористий вуглець та інші речовини.

Розчинники умовно класифікують за характеристиками:

- за температурою кипіння – низькокиплячі розчинники (наприклад, етиловий спирт, метилацетат) і висококиплячі розчинники (наприклад, ксилол);
- відношній швидкості випаровування – з його урахуванням виділяють такі види:
 - низьколеткі (скипидар);
 - зі середньою леткістю (гас);
 - високолеткі (бензин, уайт-спірит та ін.).

ВАЖЛИВО ЗНАТИ! Що вища леткість розчинника, то він вогне- й вибухонебезпечніший.

- полярності – неполярні (вуглеводні, сірковуглець) і полярні (наприклад, вода, спирти, ацетон).

Технічні умовина розчиннику зазвичай містять дані і щодо температури спалаху, і меж вибухонебезпечних концентрацій пари в повітрі, тиску пари за стандартних температур, а також щодо розчинювальної здатності – для якого типу речовин можна використовувати цей розчинник (для розчинення масел і жирів, смол, каучуків натуральних і синтетичних тощо).

1.3.1. Правила роботи з органічними та неорганічними розчинниками

Всі розчинники застосовують у рідкому стані. Спосіб нанесення залежить від його типу та густоти і може бути таким: пензльовим, струменевим, а також зануренням, витримуванням в парах, електроосадженням і розпорошенням (пневматичне / безповітряне / електростатичне).

Важливо завжди враховувати можливість займання і тому дотримуватися певних правил під час вантажно-транспортних процесів, зберігання й, безпосередньо, роботи.

Крім того, неправильне поводження з розчинником може негативно відбитися на здоров'ї людини (тяжкість такого впливу залежить від виду речовини). Ураження шкіри, слизових, травного тракту, нудота, аритмія, шум у вухах, підвищене потовиділення – це лише частина можливих згубних наслідків. Щоб уникнути отруєння або хоча б мінімізувати токсичний ефект, необхідно суворо дотримуватися техніки безпеки і використовувати ЗІЗ (окуляри, маски, респіратори). Не допускати контакту речовини зі шкірними покривами і проникнення її в дихальні шляхи. Якщо вона все ж таки потрапить на шкіру, якомога швидше витерти і промити місце контакту проточною водою.

Слідкувати, щоб приміщення, де виконуються роботи, добре провітрювалося, щоб температура повітря в робочому боксі не перевищувала допустимих меж, адже частина розчинників є вибухонебезпечною. Також у зв'язку з цим уникати сусідства гарячих (розпечених) джерел.

Зберігання та транспортування мають здійснювати в прохолодних умовах за обов'язкового вертикального положенні тари.

За ступенем небезпечності розчинники, що застосовують у лабораторіях, належать до трьох груп:

- розчинники, що зумовлюють здебільшого гострі отруєння з переважаючим явищем наркозу: бензин, етиловий і бутиловий спирти, ацетон;
- розчинники більш токсичні, що спричинюють гострі отруєння; до цієї групи розчинників належать метиловий спирт (метанол), дихлоретан та інші;

- розчинники, що мають високу токсичність, крім гострих отруєнь, спричиняють стійкі зміни функцій кровоносних органів і нервової системи; до цієї групи належать бензол, толуол, ксилол та інші.

За ступенем пожежної безпеки більшість з них належить до легкозаймистих. Під час роботи з розчинниками завжди треба бути дуже обережним, не можна допускати навіть незначної недбалості, бо це може призвести до нещасного випадку.

Основні правила безпеки під час роботи з органічними розчинниками такі:

- Роботу з розчинниками виконують обов'язково у витяжній шафі.
- Під час роботи з легкозаймистими розчинниками всі горілки, що є у витяжній шафі, де виконується дослід, треба загасити, а електричні нагрівники з відкритою спіраллю – вимкнути.
- Посуд, у якому виконують дослід з органічними розчинниками, перед заповненням має бути чистим і сухим.
- Роботу, пов'язану з небезпекою загорання, спалаху або вибуху, треба виконувати стоячи.
- Не можна під час дослідів з розчинниками залишати робоче місце без нагляду.
- Нагрівання й перегінку легкозаймистих і горючих органічних розчинників дозволяється виконувати тільки на водяній або повітряній бані, використовуючи електронагрівники із закритою спіраллю.
- Забороняється виливати органічні розчинники в каналізацію. Відпрацьовані рідини потрібно збирати у призначену для цього тару, що герметично закривається, і знищувати в місцях, погоджених із санітарною та пожежною інспекціями.

1.3.2. Сильні та слабкі кислоти

Всі кислоти поділяють на:

- сильні;
- слабкі.

Силу кислоти за Бренстедом визначають здатністю до протолізу, що залежить від того, як сильно виражена готовність речовини віддавати або приймати протони. Реагент визначає, яку функцію — кислоти чи основи — виконує речовина в реакції. У цьому випадку важливим реагентом є вода, оскільки вона виконує роль основи або кислоти:

Кислоти, які дисоціюють без остачі у водних розчинах, називаються сильними.

Приклади сильних кислот

- HCl – соляна кислота;

- HBr – бромоводень;
- HI – йодоводень;
- HNO₃ – азотна кислота;
- HClO₄ – хлорна кислота;
- H₂SO₄ – сірчана кислота.

Всі кислоти (за винятком сірчаної), представлені в списку вище, є монопротоновими, оскільки їх атоми віддають по одному протону; молекули сірчаної кислоти можуть віддавати два своїх протона, тому сірчана кислота є дипротоною.

У слабких кислот дисоціація є неповною. Внаслідок цього в розчині є недисоційовані молекули.

1.3.3. Концентрація розчинів та розведень

У практиці хімічного аналізу переважно використовують водні розчини хімічних сполук (реактивів).

Розчин – це однорідна система, в якій молекули розчиненої речовини розподіляються між молекулами розчинника. Розчини є насиченими і ненасиченими. Насиченим – називається розчин, в якому за певної температури речовина більше не розчиняється. Ненасиченим – називається розчин, в якому за певної температури речовина ще може розчинитися.

Концентрація розчину – це кількість хімічної сполуки, яка міститься в певній масі або певному об'ємі розчину.

Концентрація може бути масовою (у частках або відсотках) або об'ємною (молярною чи нормальною).

Розчинність – виражається масою речовини, що здатна розчинитися у певній масі або об'ємі розчинника, утворюючи насичений розчин. Найчастіше розчинність виражають кількістю грамів речовини, що може за певної температури розчинитися у 100 г розчинника, утворюючи насичений розчин. Інколи масу розчинника беруть 1000 г. Для важкорозчинних речовин розчинність виражають у грамах на кубічний дециметр.

Для більшості речовин з підвищенням температури розчинність зростає. Якщо насичений за вищої температури розчин охолодити до нижчої температури, за якої розчинність речовини менша, то надлишок цієї речовини викристалізується.

За призначенням розчини є:

- *робочі* – (з наближеною концентрацією) – використовують для проведення загальних підготовчих операцій аналізу. Вони можуть бути досить концентровані;

- *титровані* – (з точною концентрацією) – використовують на завершальній стадії аналізу для одержання кількісних показників. Ці розчини досить розбавлені.

Найчастіше розчини готують змішуванням певної маси реактиву (наважки) з розрахованим об'ємом дистильованої води (або іншого розчинника): реактив зважують на технохімічних або аналітичних терезах, а розчинник відміряють мірним циліндром, піпеткою або бюреткою. Оскільки робочі розчини готують із реактивів класифікації «ч», їх рекомендовано фільтрувати.

Для титрованих розчинів наважку реактиву обов'язково зважують на аналітичних терезах.

Приготування розчинів з відсотковою концентрацією

Відсоткова концентрація (%) – чисельно дорівнює кількості грамів розчиненої хімічної сполуки, що міститься в 100 грамах розчину.

Приготування розчинів з нормальною концентрацією

Нормальна концентрація виражається кількістю еквівалентних мас речовини, що міститься в 1 л (1000 мл) розчину.

Еквівалент хімічної сполуки чисельно дорівнює її еквівалентній масі в реакції, але виражається у грамах.

Еквівалентна маса елемента дорівнює його молярній масі, поділеній на валентність.

Еквівалентна маса оксиду дорівнює його молекулярній масі, поділеній на кількість атомів кисню, помножених на 2, або сумі еквівалентних мас кисню та елемента. Наприклад, еквівалентна маса оксиду алюмінію дорівнює:

$$E_{Al_2O_3} = \frac{102}{3 \times 2} = 17 \quad \text{або} \quad E_{Al_2O_3} = 9 + 8 = 17$$

Еквівалентна маса кислоти дорівнює її молекулярній масі, поділеній на основність кислоти в цій реакції, або сумі еквівалентних мас кислотного залишку і водню. Наприклад, еквівалентна маса сірчаної кислоти дорівнює:

$$E_{H_2SO_4} = \frac{98}{2} = 49 \quad \text{або} \quad E_{H_2SO_4} = 48 + 1 = 49$$

Еквівалентна маса основи дорівнює її молекулярній масі, поділеній на кількість гідроксильних груп, що беруть участь у цій реакції. Наприклад, еквівалентна маса $Al(OH)_3$ дорівнює:

$$E_{Al(OH)_3} = \frac{78}{3} = 26 \quad \text{або} \quad E_{Al(OH)_3} = 9 + 17 = 26$$

Еквівалентна маса іона дорівнює його молярній масі, поділеній на величину його заряду без урахування знака заряду. Наприклад, еквівалентні маси іона алюмінію і сульфат-іона дорівнюють:

$$E_{Al^{3+}} = \frac{27}{3} = 9 \quad \text{або} \quad E_{SO_4^{2-}} = \frac{96}{2} = 48$$

Еквівалентна маса солі дорівнює її молярній масі, поділеній на добуток кількості атомів металу в молекулі на його валентність у цій солі, або сумі еквівалентних мас катіона та аніона. Наприклад, еквівалентна маса сульфату алюмінію дорівнює:

$$E_{Al_2(SO_4)_3} = \frac{342}{2 \times 3} = 57 \text{ або } E_{Al_2(SO_4)_3} = 9 + 48 = 57$$

Приготування розчинів з молярною концентрацією

Молярна концентрація (М) – чисельно дорівнює кількості молів речовини, що міститься в 1 л (1000 мл) розчину. Моль (молярна маса) – чисельно дорівнює молекулярній масі речовини, але виражається у грамах.

Наприклад: $M_{KOH} = 56,11$ г/моль, $M_{HCl} = 36,46$ г/моль.

Перерахунок концентрацій розчинів з одних одиниць в інші

Під час перерахування відсоткової концентрації в молярну і навпаки, слід пам'ятати, що відсоткову концентрацію розраховують на певну масу розчини, а молярна і нормальна – на об'єм, тому для перерахунку необхідно знати щільність розчину. Якщо ми позначимо: с – відсоткова концентрація; М – молярна концентрація; N – нормальна концентрація; е – еквівалентна маса, г – щільність розчину; m – молярна маса, то формули для перерахунку з відсоткової концентрації будуть такими:

$$M = (c \cdot \rho \cdot 10) / m$$

$$N = (c \cdot \rho \cdot 10) / e$$

Цими самими формулами можна скористатися, якщо потрібно перерахувати нормальну або молярна концентрація на відсоткову.

Наприклад:

Яка молярна і нормальна концентрація 12 %-ного розчину сірчаної кислоти, густина якого $\rho = 1,08$ г/см³?

Рішення

Молярна маса сірчаної кислоти дорівнює 98. Отже,

$m(H_2SO_4) = 98$ і $e(H_2SO_4) = 98:2 = 49$.

Підставляючи необхідні значення у формулу, отримаємо:

а) Молярна концентрація 12 % розчину сірчаної кислоти дорівнює

$$M = (12 \cdot 1,08 \cdot 10) / 98 = 1,32 \text{ М}$$

б) Нормальна концентрація 12 % розчину сірчаної кислоти дорівнює

$$N = (12 \cdot 1,08 \cdot 10) / 49 = 2,64 \text{ Н}$$

Іноді в лабораторній практиці доводиться перераховувати молярну концентрацію в нормальну і навпаки. Якщо еквівалентна маса речовини дорівнює молярній масі (Наприклад, для HCl, KCl, KOH), то нормальна концентрація дорівнює молярній концентрації. Так, 1 н. розчин соляної кислоти буде одночасно 1 М розчином. Однак для більшості з'єднань маса не дорівнює

молярній і, отже, нормальна концентрація розчинів цих речовин не дорівнює молярній концентрації.

Для перерахунку з однієї концентрації в іншу можна використовувати формули:

$$M = (N \cdot e) / m$$

$$N = (M \cdot m) / e$$

Наприклад:

Нормальна концентрація 1 М розчину ссірчаної кислоти

$$N = (1 \cdot 98) / 49 = 2 \text{ Н.}$$

Наприклад:

Молярна концентрація 0,5 н. Na_2CO_3

$$M = (0,5 \cdot 53) / 106 = 0,25 \text{ М.}$$

Приготування розчинів із фіксаналів

Фіксанал – це ампула, в яку запаяна, точно зважена, речовина.

На кожній коробці та ампулі написана формула речовини та її концентрація (0,1 Н, 0,01 Н та ін.). Вміст ампули, який кількісно перенесено і розчинено в мірній колбі на 1 л дає точно 0,1 Н, 0,01 Н та ін. розчин.

1.4. Аналітична техніка та принципи їх виявлення

Засоби аналітичної техніки, за допомогою якої тепер реалізують фізико-хімічні дослідження, становить велику область вимірювальної техніки. За допомогою їх здійснюють як новітні наукові, так і рутинні дослідження в фізиці, хімії, біології, медицині та інших сферах. Засоби аналітичної техніки використовують у сільському господарстві, в системах контролю навколишнього середовища, в медицині.

Сучасне забезпечення лабораторій засобами аналітичної техніки є результатом тривалого відбору вимірювальних приладів і установок, які використовувались у різних галузях науки та техніки, а також багаторічних розробок спеціалізованих методів і засобів аналізу.

Теоретичні основи і практичні можливості фізико-хімічних методів аналізу:

- визначення фізичної (хімічної) величини, на якій заснований метод аналізу;
- зв'язок між хімічним складом і фізичними властивостями речовини;
- методи перетворення аналізованої речовини у концентрацію або масу: метод градувального графіка, метод еталона (стандарту), метод добавок, розрахунковий метод.

Класифікація інструментальних методів аналізу:

- прямиєспособи;
- непрямиєспособи;
- інверсійнієспособи.

1.4.1. рН-метр: характеристики, використання та обслуговування

рН– це показник кислотності розчину. Точніше кажучи, показник співвідношення кислоти і лугу.

Потенційний водень/PotentialHydrogen/сила водню/рН– це водневий показник, що характеризує концентрацію вільних іонів водню у воді.

Якщо спрощувати поняття, то величина рН визначається кількісним співвідношенням у воді іонів Н⁺ і ОН⁻. Наприклад: що більше у воді Н⁺, то вода більш кислотна. Що більше ОН⁻ (тобто менше Н⁺), то більше лужна вода.

Рівень рН схильний самотійно підвищуватися.

В ідеально чистій дистильованій воді ці іони будуть врівноважувати один одного. У таких випадках вода нейтральна і рН = 7.

Під час розчинення у воді різних речовин цей баланс може бути порушений, що і призводить до зміни рівня рН.

ВАЖЛИВО! Не намагатися тримати рН у суворій цифрі. Припустимо рН розчину = 6.0, і ми за щонайменшої зміни в бік, калібруємо його назад у 6.0. **РОБИТИ ЦЕ НЕПРАВИЛЬНО!** Необхідно підтримувати тільки крайні значення цього діапазону 5,5–6,5. Таким чином, жодному елементу не віддаватиметься перевага.

Дуже часто показник рН плутають з кислотністю і лужністю води. Важливо розуміти різницю між ними. рН– це показник інтенсивності, але не кількості. Тобто, рН відображає ступінь кислотності або лужності середовища, водночас кислотність і лужність характеризують кількісний вміст у воді речовин, здатних нейтралізувати відповідно до лугу і кислоти. Для наочності ось аналогія з температурою, яка характеризує ступінь нагріву речовини, але не кількість тепла. Наприклад, опустивши руку в воду, ми можемо сказати яка вода – холодна або гаряча, але при цьому не зможемо визначити, скільки в ній тепла (тобто, умовно кажучи, як довго ця вода буде остигати).

Залежно від величини рН може змінюватися швидкість протікання хімічних реакцій, ступінь корозійної агресивності води, токсичність забруднювальних речовин і т. інше.

Методи визначення рН

Для визначення рН розчинів широко використовують кілька методик. Водневий показник можна приблизно оцінювати з допомогою індикаторів або визначати аналітичним шляхом, проведенням кислотно- основного титрування.

- **Кислотно-основні індикатори.** Для грубого оцінювання концентрації водневих іонів широко використовують кислотно-основні індикатори – органічні

речовини – барвники, колір яких залежить від рН середовища. До найбільш відомих індикаторів належать лакмус, фенолфталеїн, метиловий оранжевий та інші. Зміна кольору кожного індикатора відбувається в своєму інтервалі кислотності, зазвичай становить 1-2 одиниці.

- **Іонометричний метод.** Визначення рН ґрунтується на вимірюванні мілівольтметром – іонометрії ЕРС гальванічного ланцюга, що містить спеціальний електрод, потенціал якого залежить від концентрації іонів H^+ у навколишньому розчині. Спосіб відрізняється зручністю і високою точністю, особливо після калібрування індикаторного електрода в обраному діапазоні рН, дозволяє вимірювати рН непрозорих і кольорових розчинів і тому широко використовується.

- **Аналітичний об'ємний метод.** Кислотно-основне титрування – також дає точні результати визначення кислотності розчинів. Розчин відомої концентрації (титрант) краплями додають до досліджуваного розчину. За їх змішування протікає хімічна реакція.

Як правильно відкалібрувати рН-метр

рН-електроди – це не ідеальні системи. Вони можуть мати різну довжину, недосконалу геометричну форму, порушення в складі внутрішнього електроліту і т. інше. Все це впливає на їх характеристики і, водночас, це цілком нормально, так як в будь-якому виробництві існують певні допуски. Тому кожен рН-метр потребує калібрування, яке допомагає приладу встановити співвідношення між сигналом від електрода і значенням рН в розчині.

Калібрування – дуже відповідальний момент! Треба розуміти про неможливість вимірювання рН з точністю більшою, ніж використовувані стандарти. Наприклад, якщо Ви хочете працювати з точністю 0,01 рН, то необхідно виконання таких умов: сумарна похибка рН-метра і електрода не мають перевищувати 0,005 рН і проводити калібрування слід з особливою увагою на спеціальних високоточних буферних розчинах. Купити такі розчини не можна, оскільки вони не зберігаються. Їх доводиться готувати самостійно, з використанням спеціально підготовлених реактивів і води.

Якщо немає можливості приготувати буфер з точністю $\pm 0,005$ рН, то працюємо з буферними розчинами, точність яких забезпечується на рівні $\pm 0,02$ рН. За калібрування за такими стандартами сумарна похибка не перевищуватиме 0,04–0,03 рН, за умови, що похибка приладу знаходиться на рівні 0,01 рН.



Сучасні рН-електроди як правило комбіновані, тобто в одному корпусі знаходяться і рН-електрод, і електрод порівняння. Крім зручності в роботі, це забезпечує більш швидкий відгук і знижує сумарну помилку.

Ізоелектрична точка для таких електродів знаходиться на рН = 7 (0 мВ). Тому, в першу чергу, прилад слід калібрувати за буфером з нейтральним рН (наприклад, 6,86 або 7,01). Другу точку слід вибирати на відстані приблизно Зодиниці рН, тобто рН = 4 або 10. Якщо прилад калібрується тільки за двома буферами, то вибір другої точки залежить від діапазону, в якому переважно працюєте. Якщо це лужні розчини, то необхідно скористатися буфером з рН = 10, якщо кислі – з рН = 4. Це пов'язано з деякою різницею в нахилах калібрувальних прямих у кислій та лужній області. Проблем не виникне, якщо прилад можна калібрувати за трьома і більше точками. У цьому випадку порядок калібрування не важливий, оскільки рН-метр самостійно його відстежує.

Найбільш досконалі моделі рН-метрів мають, так звану, підтримку GLP, яка крім дати останнього калібрування дозволяє оцінити стан електрода на підставі даних про відношення нахилу калібрувальної кривої до теоретичного значенням (59,16 за 25 °С) в%. Якщо у приладу немає підтримки GLP, але є режим вимірювання мВ, то нахил можна розрахувати самостійно, вимірявши значення мВ в буфері рН = 7 і рН = 4.

Наприклад:

рН 7 = -10 мВ

рН4 = +150 мВ

нахил = $150 - (-10) / 59,2 \times 3 = 90,1 \%$

95–102 % – електрод в робочому стані,

92–95 % – електрод потребує очищення,

менше 92 % – необхідно змінити електроліт або замінити електрод.

Важливий момент правильної роботи рН метра також є, як компенсації змін температури. Ця проблема одна з найважливіших і найбільш важко вирішуваних у рН-метрії. Похибка під час вимірювання виникає з трьох причин:

- у рівнянні Нернста входить температура;
- рівноважні концентрації іонів водню в буфері і зразках змінюються залежно від температури;

- характеристики рН-електрода залежать від температури.

1. Відповідно до рівняння Нернста, теоретичний нахил калібрувальної кривої змінюється з температурою. Якщо прилад не враховує цієї зміни, то до похибки вимірювань додається помилка в середньому, яка дорівнює 0,003 рН на кожен градус Цельсія і кожну одиницю рН від ізопотенціальної точки.

Наприклад:

Прилад відкалібрований за буфером рН = 7 за температури 25 °С.

Зразок з рН = 5 за 20°С, помилка = 0,003 x 5 x 2 = 0,03

Зразок з рН = 2.5 за 2°С, помилка = 0,003 x 23 x 4,5 = 0,31

Зразок з рН = 12 за 80°С, помилка = 0,003 x 55 x 5 = 0,82

2. Набагато більш складним завданням є компенсація змін рівноважних концентрацій іонів водню в зразках зі зміною температури. Проблема полягає в тому, що, не знаючи точного хімічного складу зразка, неможливо передбачити характер цих змін. Існує тільки загальна закономірність, що рН нейтральних і лужних розчинів сильніше залежить від зміни температури, ніж рН кислих розчинів. За зміни температури на 25–30 градусів рН може змінитися на 0,5–1 одиниці. Звичайні загально лабораторні рН-метри ніяк не враховують цей чинник, так його і неможливо врахувати, оскільки розчини бувають найрізноманітніші. Винятки не становлять і буферні розчини:

Температура	значення рН				
С	4,01	6,86	7,01	9,18	10,01
0	4,01	6,98	7,13	9,46	10,32
10	4,00	6,92	7,07	9,33	10,18
20	4,00	6,88	7,03	9,22	10,06
25	4,01	6,86	7,01	9,18	10,01
30	4,02	6,85	7,00	9,14	9,96
50	4,06	6,83	6,98	9,01	9,82
70	4,12	6,85	6,99	8,93	9,75

Для досягнення найкращих результатів вимірювання рН метр має бути калібрований у таких випадках:

- за регулярного використання, принаймні один раз у тиждень;
- якщо не використовувався – один раз на місяць;
- якщо ви припускаєте, що показання некоректні;
- якщо тестуються агресивні рідини (дуже кислотні або дуже лужні);
- якщо тестуються рідини в широкому діапазоні вимірювання;
- після заміни електрода.

Належне обслуговування рН метра

Хоча існують загальні методи з догляду за рН метрами, для кожної марки і моделі можуть існувати свої власні вимоги. Завжди необхідно дотримуватись інструкцій для рН метра і тоді ним можна користуватися протягом більш тривалого часу і з меншою кількістю питань.

На додаток до періодичності калібрування, правильний догляд за рН електродом забезпечить його довгий термін служби і більш точні результати. Багато електродів рН метрів складаються зі скляної колби з внутрішнім сенсором, який повинен міститися в спеціальному розчині. Під час використання портативного рН метра, розчин для зберігання має бути в захисному ковпачку приладу. Не допускається виливання цього розчину з ковпачка – це дійсно важливо! Для більшості електродів рН метрів дуже важливо, щоб він зберігався у вологому середовищі відповідного розчину для зберігання.

Щоб очистити більшість електродів рН метрів досить промити їх дистильованій (деіонізованою) водою. Струсити зайву воду і повернути його у вологе середовище розчину для зберігання. У разі вимірювання розчинів, які можуть забруднити поверхню електрода, використовуйте мийний розчин або навіть залиште електрод на деякий тривалий час в ньому.

1.5. Оптичні методи аналізу

Оптичні методи аналізу засновані на використанні явища випускання електромагнітного випромінювання атомами або молекулами досліджуваної речовини, або взаємодії електромагнітного випромінювання з речовиною. Оскільки природа випромінювання залежить від якісного та кількісного складу речовини, то це дозволяє проводити аналіз речовин.

Електромагнітне випромінювання оптичного діапазону – оптичне (світлове) випромінювання – термін поєднує видиме світло, інфрачервоне та ультрафіолетове випромінювання.

Найбільшого поширення набули фотометричні методи аналізу, засновані на поглинанні випромінювання у видимій області спектра, тобто в інтервалі довжин хвиль 400–780 нм. Це пояснюється можливістю отримання безлічі інтенсивно забарвлених органічних і неорганічних сполук, придатних для їх фотометричного визначення у видимій області спектра за допомогою досить нескладних і відносно недорогих приладів.

Залежно від характеру взаємодії речовини з електромагнітним випромінюванням оптичні методи розділяють на:

- абсорбційні (засновані на вимірюванні поглинання речовиною світлового випромінювання). До них відносять колориметрію, фотоколориметрію, спектрофотометрію, атомно-абсорбційні методи;

- емісійні (засновані на вимірюванні інтенсивності світла, випромінюваного речовиною). До них відносять флуориметрію, емісійний спектральний аналіз.

Оптичні методи аналізу обумовлюють використання сучасних приладів різної складності, що надає низку переваг порівняно з класичними хімічними методами: швидкість, простота методики, використання невеликої кількості речовини для аналізу, можливість аналізувати сполуки будь-якої природи. Крім того, вони підвищують чутливість, точність і відтворюваність результатів.

1.5.1. Фотоелектричні колориметри

Фотометричний аналіз оснований на відбірковому (селективному) поглинанні електромагнітних випромінювань різних ділянок спектра однієї системи. Фотометричний аналіз за умови використання монохромних випромінювань називають методом абсорбційної спектрофотометрії.

Залежно від структури у фотометричному аналізі розрізняють фото колориметричні і спектрофотометричні методи аналізу.

Фотоколориметричні методи, в яких вимірюється поглинання забарвлення розчинів, передбачають використання нескладних приладів та вимірювань.

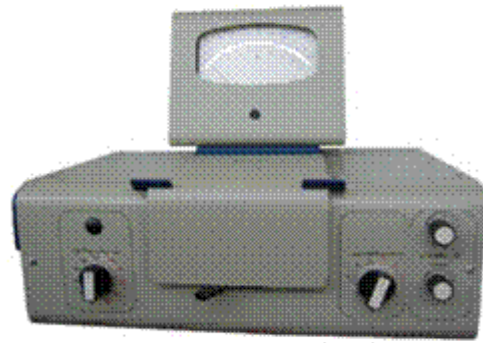
Колориметри фотоелектричні концентраційні КФК призначені для вимірювання коефіцієнтів пропускання і оптичної щільності прозорих рідких розчинів і твердих зразків, а також для визначення концентрації речовин у розчинах після попереднього градування приладів споживачем.

Спектральний діапазон роботи КФК від 315 до 990 нм. Джерело випромінювання – галогенні лампи; приймач випромінювання – фотодіоди.

Принцип дії колориметрів цього типу заснований на порівнянні світлового потоку, що пройшов через розчинник або контрольний розчин, стосовно якого проводиться вимір, і світлового потоку, що пройшов через досліджуване середовище.

Світлові потоки фотоприймачами перетворюються в електричні сигнали, які обробляються мікро-ЕОМ колориметра і представляються на цифровому табло у вигляді коефіцієнта пропускання, оптичної щільності, концентрації.

Вимірювання концентрації досліджуваного розчину можливо за дотримання основного закону світлопоглинання, тобто за лінійної залежності оптичної щільності від концентрації.



Вимірювання на колориметрі слід проводити за температури навколишнього повітря від 10 до 35 °С, за вологості повітря 50–80 %.

Поблизу колориметра не має перебувати потужні джерела електричних, магнітних полів, потужні джерела світла і нагрівальні пристрої.

Не допускається потрапляння прямих сонячних променів на колориметр.

Установлення довжин хвиль необхідно виконувати підведенням з боку коротких хвиль до більш довгих.

Робочі поверхні кювет мають перед кожним вимірюванням ретельно протирати спиртоєфірною сумішшю.

Під час установлення кювет у кюветотримач не можна торкатися пальцями робочих ділянок поверхні. Рідина наливається у кювети до позначки на бічній стінці кювети. Під час установлення в кюветотримач не нахилити кювету з рідиною. Накривати кювети накривкою. Після зміни світлофільтра, а також після перебування колориметра за відкритоїнакривкикюветного відділення понад 5 хв, вимірювання починають після 5-хвилинної витримки фотоприймача за закритоїнакривкикюветного відділення.

Після закінчення роботи прилад обов'язково вимкнути.

Вибір світлофільтра

Наявність у колориметрі вузла світлофільтрів і набір кювет дозволяє підібрати таке їхнє сполучення, за якого похибка у визначенні концентрації буде найменшою.

Вибір світлофільтра проводять таким чином:

- налити розчин у кювету і визначити оптичну щільність для всіх світлофільтрів колориметра;

- за отриманими даними побудувати криву, відкладаючи вздовж горизонтальної осі довжини хвиль, що відповідають максимуму коефіцієнта пропускання світлофільтрів, а по вертикальній осі – відповідні значення оптичної щільності розчину;

- відзначити ту ділянку кривої, для якої виконують такі умови: оптична щільність має максимальну величину; хід кривої приблизно паралельний горизонтальній осі, тобто оптична щільність мало залежить від довжини хвилі.

Світлофільтр для роботи вибрати так, щоб довжина хвилі, що відповідає максимуму коефіцієнта пропускання світлофільтра, припадала на ділянку

спектральної кривої досліджуваного розчину, для якої виконуються зазначені вище умови.

Вибір кювети

Попередній вибір кювет проводиться візуально, відповідно інтенсивності забарвлення розчину. Якщо розчин інтенсивно забарвлений (темний), слід користуватися кюветами з малою робочою довжиною (1–3 мм). У разі слабозабарвлених розчинів рекомендується працювати з кюветами з більшою робочою довжиною (30–100 мм).

У попередньо підібрану кювету налити розчин і виміряти його оптичну щільність, ввівши в хід променів відповідний для цього розчину світлофільтр.

Під час вимірювання декількох розчинів кювету заповнити розчином середньої концентрації. Якщо отримане значення оптичної щільності становить приблизно 0,3–0,5, вибрати цю кювету для роботи з цим розчином. У тому випадку, коли ця умова не виконується, слід випробувати іншу кювету. Якщо величина вимірюваної оптичної щільності більше 0,5–0,6, беруть кювету меншої робочої довжини, якщо величина оптичної щільності менше 0,3–0,2, слід вибрати кювету з більшою робочою довжиною.

Вимірювання концентрації речовини в розчині

Для цього слід виконати такі операції: вибрати довжину хвилі; вибрати кювету; побудувати градувальний графік для цієї речовини; виміряти концентрацію речовини в розчині.

Для побудови градувального графіка необхідно приготувати декілька стандартних розчинів цієї речовини з відомими концентраціями, що охоплюють область можливих змін концентрацій цієї речовини в досліджуваному розчині.

Виміряти оптичну щільність всіх розчинів і побудувати градувальний графік, відкладаючи вздовж горизонтальної осі відомі концентрації, а вздовж вертикальної – відповідні їм значення оптичної щільності.

Слід переконатися в тому, що залежність концентрації від оптичної щільності – лінійна, тобто виражається на графіку прямою лінією.

Досліджуваний розчин налити в кювети тієї самої робочої довжини, з якою проводилося градування, встановити відповідну довжину хвилі λ і виміряти оптичну щільність розчину.

1.5.2. Спектрофотометрія

Метод аналізу, що базується на визначенні спектра поглинання або вимірюванні світлопоглинання за певної довжини хвилі, яка відповідає максимуму кривої поглинання досліджуваної речовини. Аналіз здійснюють за поглинанням речовинами монохроматичного випромінювання у видимій, ультрафіолетовій та ближній інфрачервоній ділянках спектра.

Спектрофотометрію використовують для ідентифікації сполук, дослідження складу, будови і кількісного аналізу індивідуальних речовин і

багатокомпонентних систем. Криву залежності поглинання від довжини хвилі або хвильового числа називають спектром поглинання речовини. Ця крива є специфічною характеристикою певної речовини. Якісний аналіз речовин за їх спектрами поглинання проводять двома способами:

- за відомими параметрами спектра поглинання досліджуваної речовини;
- порівнянням спектрів поглинання розчину стандартної речовини і розчину досліджуваної речовини одного й того самого складу.

На відміну від фотоколориметричних визначень, у спектрофотометрії можна аналізувати не тільки забарвлені, але й безбарвні розчини. В останньому випадку аналіз проводять не у видимій, а в УФ- або ІЧ-ділянках спектра.

Основним видом приладів для спектрофотометрії є спектрофотометри, в яких, на відміну від фотоелектроколориметрів, монохроматизація забезпечується не світлофільтрами, а спеціальними оптичними пристроями — монохроматорами, які дозволяють безперервно змінювати довжину хвилі електромагнітного випромінювання, що проходить крізь розчин, який аналізують. Типи монохроматорів (світлофільтрів):

- адсорбційні – послаблюють світло за рахунок поглинання світлового потоку речовиною фільтра;
- дисперсійні – послаблюють світло за рахунок зміни показника заломлення речовини фільтра;
- інтерференційні – дія яких заснована на явищі інтерференції паралельного променя, котрий відбивається двома дзеркалами, які розміщені на відстані довжини хвилі.

Монохроматори – оптичні системи, які виокремлюють вузькі ділянки частот чи довжин хвиль оптичного спектра. Монохроматори характеризує:

- ширина смуги – діапазон довжин хвиль, в якому інтенсивність світла, яке пройшло через монохроматор, більше половини інтенсивності світла за довжини хвилі максимального піка;
- ширина щілини – діапазон довжин хвиль, які потрапляють на монохроматор (вхідна щілина) і які виходять з нього і потрапляють на зразок (вихідна щілина).

Потрібно проводити дослідження за мінімально вузьких щілин. Розподільна здатність спектрофотометра суттєво підвищується за використання подвійного монохроматора: тобто якщо в одному приладі розміщують два послідовно з'єднаних монохроматора, у яких вихідна щілина першого служить вхідною щілиною другого. Це дає змогу суттєво послабити розсіяне світло.



Для роботи у видимій ділянці спектра використовують скляні кювети, у ближній УФ – області кварцові. Для безперервного аналізу розчинів використовують проточні кювети.

Під час проведення вимірювань необхідно враховувати, що найменша похибка вимірювання оптичної густини спостерігається за числового значення оптичної густини близько 0,4. За оптичної густини більше 0,8 необхідно використовувати кювети з меншою довжиною поглинального шару або розводити досліджуваній розчин. За оптичної густини менше 0,1 – необхідно використовувати кювети з більшою довжиною.

За обчислення в спектрофотометрії використовують метод градувального графіка. Готують серію розведень стандартного розчину ($C_{ст}$), вимірюють їх оптичну густину ($A_{ст}$), будують графік у координатах $A_{ст}$ – $C_{ст}$. Потім вимірюють оптичну густину аналізованого розчину і за графіком визначають його концентрацію.

У спектрофотометричному аналізі, як і у фотоколориметрії, потрібно створювати оптимальні умови для досягнення певної точності та відтворюваності результатів.

1.6. Атомна спектроскопія

Атомно-спектроскопічні методи – це методи аналізу, які засновані на вимірюванні енергетичного стану атомів речовин. Вони відрізняються за способом отримання та реєстрації сигналу, а загальним є необхідність попередньої атомізації проб. Атоми речовин, які випаровуються в полум'ї, випромінюють чи поглинають світло певної довжини хвилі. За інтенсивності смуг у спектрі можна визначити кількість окремих хімічних елементів у зразку.

- Атомно-абсорбційна спектроскопія заснована на поглинанні атомами випромінювання від зовнішнього джерела.
- Атомно-емісійна спектроскопія заснована на випусканні випромінювання атомами, збудженими за використання різних зовнішніх джерел (дуга, іскра, полум'я, плазма).

- Атомно-флуоресцентна спектроскопія – метод кількісного елементного аналізу атомних спектрів флуоресценції. Пробу аналізованої речовини перетворюють на атомну пару і опромінюють для збудження флуоресценції таким випромінюванням, яку поглинає атоми лише елемента, що визначається (довжина хвилі випромінювання відповідає енергії електронних переходів цих атомів). Частина збуджених атомів випромінює світло (аналітичний сигнал), що реєструється спектрофотометрами. Зазвичай використовують резонансну флуоресценцію (довжини хвиль поглиненого і випромінювального світла однакові). Для атомізації розчинів застосовують полум'я, індуктивнозв'язану плазму або електротермічні атомізатори (графітові трубки, нитки, стрижні, що нагріваються електричним струмом).

Атомно-абсорбційний спектральний аналіз (полум'яний) — метод аналізу, який проводиться за селективним поглинанням світла атомами речовини, переведеної в атомарний газоподібний стан. Випромінювання від джерела світла, проходячи через пари речовини на частотах, які збігаються з частотою переходу електрона з основного рівня на найбільш близький до нього, поглинається (резонансна лінія), а за ступенем послаблення інтенсивності спектральних ліній досліджуваного елемента визначають його концентрацію у зразку. Інтенсивність поглинання світла за методом атомної абсорбції визначають за законом Бугера– Ламберта – Бера:

$$D = \lg(I_0/I) = klc,$$

де D – оптична густина (абсорбція); I_0 – вихідна інтенсивність збуджувального світла; I – інтенсивність світла, що пройшло через зразок; k – коефіцієнт поглинання; l – товщина шару поглинання; C – концентрація елемента, який визначається. Коефіцієнт поглинання k , пропорційний імовірності резонансного переходу, не залежить від температури. Для атомізації проби необхідна температура ~ 2000 – 3000 °С. У цьому температурному інтервалі застосовують атомізатори полум'яні, електротермічні, а також ВЧ- і НВЧ-розряд, але найчастіше — полум'яні, які працюють на суміші ацетилен-закис азоту. В цьому температурному інтервалі понад 90 % атомів перебувають не у збудженому стані, тому інші атоми і молекули не можуть вплинути на коефіцієнт поглинання. Цей факт поряд із малою кількістю ліній поглинання зумовлює високу вибірковість цього методу. Джерело світла випромінює лінійний спектр, який містить необхідну лінію елемента, що визначається. Як джерела випромінювання використовують лампи з порожнистим катодом, безелектродні газорозрядні лампи, перестроюваний лазер. Суттєвим недоліком методу атомної абсорбції, порівняно з методом атомно-емісійного спектрального аналізу, є неможливість одночасного виявлення у пробі кількох елементів і необхідність їх послідовного визначення. Методика проведення атомно-абсорбційного аналізу, порівняно з іншими методами атомного спектрального аналізу, значно простіша і дає змогу визначати до 70 елементів з чутливістю $\sim 10^{-4}$ – 10^{-9} % маси не тільки низьких, але й високих концентрацій у пробах. На

сьогодні метод Атомно-абсорбційного спектрального аналізу вважається одним із найбільш селективних, експресних, продуктивних, точних і водночас відносно дешевим методом.

Атомно-емісійний спектральний аналіз (спектрометрія), АЕСА – сукупність методів елементного аналізу, які ґрунтуються на вивченні спектрів випускання вільних атомів та іонів у газовій фазі. Зазвичай емісійні спектри реєструють у найбільш зручній оптичній області довжин хвиль від ~200 до ~1000 нм (для реєстрації спектрів в області <200 нм потрібно застосування вакуумної спектроскопії, щоб позбавитися від поглинання короткохвильового випромінювання повітрям; для реєстрації спектрів в області >1000 нм потрібно спеціальні інфрачервоні або мікрохвильові детектори).

Пробу досліджуваної речовини вводять в джерело випромінювання, де відбуваються її випаровування. Дисоціація молекул і збудження атомів (іонів). Останні випускають характерне випромінювання, яке надходить дореєструючого пристрою спектрального приладу.

За якісного АЕСА спектри проб порівнюють зі спектрами відомих елементів, наведених у відповідних атласах і таблицях спектральних ліній, і таким чином установлюють елементний склад аналізованої речовини. За кількісного аналізу визначають кількість (концентрацію) елементу в аналізованій речовині за залежністю величини аналітичного сигналу (щільність почорніння або оптичну щільність аналітичної лінії на фотопластині; світловий потік на фотоелектричний приймач) цього елементу від його вмісту в пробі.

Збудження атомів відбувається під час переходу одного або кількох електронів на більш віддалений енергетичний рівень. У незбудженому стані атом має найменшу енергію E_0 . У збудженому (нестійкому) стані атом може перебувати дуже короткий час ($\approx 10^{-7}$ - 10^{-8} с) і завжди прагне зайняти нормальний стан. При цьому атом віддає надлишкову енергію у вигляді випромінювання фотона.

Чутливість і точність АЕСА залежить головним чином від фізичних характеристик джерел збудження спектрів – температури, концентрації електронів, часу перебування атомів у зоні збудження спектрів, стабільності режиму джерела і т. інше.

$$I = a + c,$$

де a – коефіцієнт, що залежить від умов процесу;

c – концентрація елемента в пробі.

Атомно-емісійна спектроскопія з індуктивно зв'язаною плазмою – суть такого методу полягає в тому, що за збудження та іонізації з подальшим переходом у стабільний стан елементи випускають квант світла з певною довжиною хвилі. Відповідно, визначаючи довжину хвилі, можна провести якісний аналіз, а визначаючи інтенсивність випускання – кількісний.

Основними вузлами приладу для проведення цього аналізу є: система подання проби, розпилювач, вузол атомізації проби (кварцовий плазмовий пальник), оптична камера та детектор. Джерелом атомізації і збудження в цьому методі служить індуктивно зв'язана плазма.

Перевагою методу є можливість плавно регулювати умови атомізації і збудження, тобто можливо підібрати умови, що забезпечують одночасне визначення безлічі елементів. Недоліком методу є дуже велика витрата газу аргону (плазмовий пальник). Також потрібно аргон чистотою не менше 99,99 %.



Принцип роботи всіх методів атомної спектроскопії полягає в проведенні наступних операцій:

1. Проводять пробовідбір (відбирають частину речовини від об'єкта аналізу, яка максимально повно відображає його хімічний склад).

2. Від твердої проби відбирають певну наважку, розчиняють її у відповідних розчинниках з метою переведення досліджуваного елемента в розчин. Від рідкої проби відбирають фіксовану аліквоту і готують робочий розчин для аналізу за тими ж принципами.

3. Готують серію робочих градувальних розчинів, які охоплюють необхідний діапазон градування.

4. Готують до роботи спектрометри для реєстрації сигналу в оптимальних умовах досліджуваного елемента.

5. Вводять аналізовану речовину в атомізатор, створюють поглинальний шар атомного пару і проводять вимірювання.

6. Послідовно вводять в атомізатор градувальні розчини, отримують градувальну характеристику (функціональну залежність між аналітичним сигналом і концентрацією елемента в градувальному розчині).

7. З її використанням визначають концентрацію досліджуваного елемента в розчині проби і у вихідній пробі.

1.7. Хроматографічні методи аналізу

Хроматографія – це велика область фізико-хімічних методів аналізу, яка поєднує в собі як способи концентрування і розділення, так і способи ідентифікації та кількісного визначення різноманітних речовин.

Хроматографічні методи посідають особливе місце серед ефективних методів аналітичного аналізу, оскільки дуже широко використовуються завдяки

своїй універсальності – дозволяють провести аналіз складних неорганічних та органічних речовин, що перебувають у газовому, рідкому і навіть твердому агрегатному стані. Новітніми хроматографічними методами можна проаналізувати газоподібні, тверді і рідкі речовини з молекулярною масою від 1 до 106. Це один із найважливіших аналітичних методів.

Хроматографія – гібридний аналітичний метод, в якому поєднуються метод розділення і метод визначення.

На відмінність від інших методів, заснованих на розподілі компонентів між фазами, хроматографія – це динамічний метод, що забезпечує багатократність актів сорбції-десорбції компонентів, які розділяються, оскільки розділення відбувається в потоці рухомої фази. Цим обумовлена велика ефективність хроматографічного методу порівняно з методами сорбції і екстракції.

Найзагальніше визначення хроматографії – це фізико-хімічний метод розділення речовин, який ґрунтується на розподілі компонентів між двома фазами – нерухомою і рухомою.

Нерухома фаза – це твердий адсорбент із розвиненою поверхнею або плівка рідини, адсорбційно закріплена на твердому носії; функція нерухомої фази – сорбувати, утримувати речовини. Рухома фаза – потік газу або рідини, який проходить (фільтрується) крізь шар сорбенту, функція рухомої фази – розчинити в собі речовини і переміщувати їх.

Хроматографічний аналіз є критерієм однорідності речовини. Якщо яким-небудь хроматографічним способом аналізована речовина не розділилася, то її вважають однорідною (без домішок).

Принциповою відмінністю хроматографічних методів від інших фізико-хімічних методів аналізу є можливість поділу близьких за властивостями речовин. Після поділу компоненти аналізованої суміші можна ідентифікувати (встановити природу) і кількісно визначити (масу, концентрацію) будь-якими хімічними, фізичними та фізико-хімічними методами.

Хроматографія застосовується в лабораторіях і в промисловості для якісного та кількісного аналізу багатокомпонентних систем, контролю виробництва, особливо у зв'язку з автоматизацією багатьох процесів, а також для препаративного (у тому числі промислового) виділення індивідуальних речовин (наприклад, благородних металів), розділення рідких і розсіяних елементів.

У деяких випадках для ідентифікації речовин використовується хроматографія в поєднанні з іншими фізико-хімічними і фізичними методами, наприклад з мас-спектрометрією, ІЧ-, УФ-спектроскопією та ін. Основні переваги хроматографічного аналізу:

- експресному визначенню;
- висока ефективність;
- можливість автоматизації і отримання об'єктивної інформації;
- поєднання з іншими фізико-хімічними методами;
- широкий інтервал концентрацій сполук;

- можливість вивчення фізико-хімічних властивостей сполук;
- проведення якісного та кількісного аналізу;
- застосування для контролю та автоматичного регулювання технологічних процесів.

Існують різні види класифікації хроматографічних методів

1. **За агрегатним станом фаз** (перше слово в цій класифікації характеризує агрегатний стан рухомої фази).

- газово-рідинна хроматографія;
- газово-твердофазна (газоадсорбційна) хроматографія;
- рідинно-рідинна хроматографія;
- рідинно-твердофазна (рідинноадсорбційна) хроматографія;
- рідинно-гелева хроматографія.

2. **Залежно від природи взаємодії, що обумовлює розподіл компонентів між елюентом і нерухомою фазою** (тобто характером взаємодії між сорбентом та сорбатом).

- адсорбційна хроматографія – розділення основане на відмінності в адсорбційній здатності речовин, що розділяються, твердим адсорбентом (тверде тіло з розвиненою поверхнею);

- розподільна хроматографія – розділення основане на відмінності в розчинності речовин, що розділяються, в нерухомій фазі (газова хроматографія) та на відмінності в розчинності речовин, що розділяються, в рухомій та нерухомій фазах;

- іонообмінна хроматографія – розділення основане на відмінності в здатності речовин, що розділяються, до іонного обміну;

- гель-фільтрація або ексклюзивна хроматографія (гель-проникаюча, гель-фільтраційна хроматографія) – різновид хроматографії, в ході якої молекули речовин розділяють за розміром за рахунок їх різної здатності проникати в пори нерухомої фази. При цьому першими виходять з колонки найбільш великі молекули (більшої молекулярної маси), здатні проникати в мінімальне число пор стаціонарної фази. Останніми виходять речовини з малими розмірами молекул, які здатні вільно проникати в пори. На відміну від адсорбційної хроматографії, під час гель-фільтрації стаціонарна фаза залишається хімічно інертною і не взаємодіє з речовинами, які розділяються;

- осадова хроматографія заснована на різній здатності компонентів випадати в осад на твердій нерухомій фазі;

- адсорбційно-комплексноутворювальна хроматографія – розділення засновано на утворенні координаційних сполук різної міцності у фазі чи на поверхні адсорбента.

3. *Відповідно до агрегатного стану елюенту розрізняють:*

- газову хроматографію (ГХ);
- високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ).

Газова хроматографія – це метод розділення летких компонентів, за якого рухливою фазою служить інертний газ (газ-носіє), що протікає через нерухому фазу з великою поверхнею. Як рухому фазу використовують водень, гелій, аргон, вуглекислий газ. Газ-носіє не реагує з нерухомою фазою і речовинами, що розділяються. Розрізняють:

- газоз-твердофазну хроматографію – нерухомою фазою є твердий носіє (силікагель, вугілля, оксид алюмінію);
- газоз-рідинну хроматографію – нерухомою фазою є рідина, нанесена на поверхню інертного носія.

Розділення засноване на відмінностях в летючості і розчинності (або адсорбованості) компонентів суміші, що розділяються. Цей метод застосовується для поділу газів, визначення домішок шкідливих речовин у повітрі, воді, ґрунті, промислових продуктах; визначення складу продуктів основного органічного та нафтохімічного синтезу, вихлопних газів, лікарських препаратів, а також у криміналістиці тощо.



Рідинна хроматографія – це один з найсучасніших хроматографічних методів багатокомпонентного аналізу. Його відмінні риси – експресивність, висока точність, можливість автоматизації. Основою хроматографічного розділення є участь компонентів суміші, що розділяються, в складній системі Ван-дер-Ваальсових взаємодій (переважно міжмолекулярних) на межі розділу фаз. ВЕРХ входить до групи методів, які, зважаючи на складність досліджуваних об'єктів, охоплюють попереднє розділення вихідної складної суміші на відносно прості. Отримані прості суміші аналізуються потім звичайними фізико-хімічними методами або за використання рідинної хроматографії.

Особливістю ВЕРХ є використання високого тиску і дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3–5 мкм, навіть до 1,8 мкм). За механізмом розділення речовин, що аналізуються, ВЕРХ ділиться на:

- адсорбційну хроматографію;
- розподільну хроматографію;

- іонообмінну хроматографію;
- лігандообмінну хроматографію.



Проте, в практичній роботі розділення часто проходить не за одним, а за декількома механізмами одночасно. Цей метод використовують для аналізу, розділення і очищення синтетичних полімерів, лікарських препаратів, детергентів, білків, гормонів та інших біологічно важливих сполук. Використання високочутливих детекторів дозволяє працювати з дуже малими кількостями речовин, що надто важливо в біологічних дослідженнях.

4. *За характером техніки, що застосовується*, розрізняють:

- Хроматографія на колонці – розділення речовин проводиться в спеціальних колонках. Сорбентом заповнюють спеціальні трубки – колонки, а рухома фаза рухається усередині колонки завдяки перепаду тиску. Різновид колонкової хроматографії – капілярна, коли тонкий шар сорбенту наносять на внутрішні стінки капілярної трубки.

- Площинну хроматографію. Площинна хроматографія підрозділяється на тонкошарову і паперову. У тонкошаровій хроматографії тонкий шар гранульованого сорбенту або пористу плівку наносять на скляну або металеву пластинку; у разі паперової хроматографії використовують спеціальний хроматографічний папір. Тонкошарову (ТШХ) і паперову хроматографію використовують для аналізу жирів, вуглеводів, білків та інших природних речовин і неорганічних сполук.

Хроматографи використовують для аналізу і для препаративного (у тому числі промислового) розділення сумішей речовин. Під час аналізу розділення в хроматографічній колонці речовини разом з елюентом потрапляють у встановлений на виході з колонки спеціальний пристрій – детектор, реєструє концентрації в часі. Отриману як результат цього вихідну криву називають хроматограмою. Для якісного хроматографічного аналізу визначають час від моменту введення проби до виходу кожного компонента з колонки за цієї температури і використання визначеного елюенту. Для кількісного аналізу визначають висоти або площі хроматографічних піків з урахуванням коефіцієнтів чутливості використовуваного детектуючого пристрою до аналізованих речовин.

1.8. ІФА, ELISA-імуноферментний аналіз

Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA) або, точніше, ферментний імуносорбентний аналіз (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) – імунологічний метод для визначення наявності певних антигенів, шляхом реакції антиген-антитіло. Широко використовується в науково-дослідній роботі та клінічній лабораторній діагностиці.

Цей метод використовують здебільшого для проведення широкомасштабного епізоотичного спостереження та досліджень під час запровадження програм контролю хвороб. Це – високочутливий, специфічний, простий, швидкий та економний у виконанні метод лабораторних досліджень, що дозволяє легко відтворювати та інтерпретувати результат.

Через розмаїття об'єктів дослідження – від низькомолекулярних сполук, пептидних та стероїдних гормонів, фармакологічних препаратів, пестицидів, до вірусів і бактерій, і навіть до інших антитіл, – різноманіття принципів зв'язування і різноманіття умов проведення ІФА існує велика кількість варіантів цього методу. За одним лише варіантом реєстрації ферментативної активності можливе застосування фотометричних, флюорометричних, біо- і хемілюмінесцентних методів, а в низці випадків (особливо пов'язаних з вирішенням технологічних завдань) успішно застосовують електрохімічні і мікроколориметричні датчики.

1.8.1. Експериментальні методи визначення ферментативної активності

➤ **Фотометричний метод**

В ІФА найбільшого поширення набув фотометричний метод реєстрації активності ферментів. Як субстрати ферментів при цьому використовують такі речовини, продукти перетворення яких є пофарбованими з'єднаннями або, навпаки, забарвлення самих субстратів змінюється в процесі реакції. Пофарбовані з'єднання поглинають видиме світло, тобто електромагнітне випромінювання з довжинами хвиль 400–700 нм. Поглинання світла підкоряється закону Бугера-Ламберта-Бера, відповідно до якого оптична щільність розчину в певному діапазоні прямо пропорційна концентрації речовини. Для вимірювання оптичної щільності використовують спектрофотометр.

➤ **Флюорометричний метод**

Останнім часом в ІФА набули поширення субстрати, які утворюють продукти, реєстровані флюорометричним методом. Молекула під час поглинання фотона переходить з основного електронного стану в збуджений. Збуджена молекула може повернутися в основний стан, при цьому надлишок енергії перейде в теплоту, але може статися зворотний процес переходу електрона на основний рівень, що супроводжується виділенням кванта світла, який носить назву флюоресценції. Завдяки частковій втраті енергії під час

переходу молекули із збудженого стану в основний довжина хвилі світла, що випускається завжди більше довжини хвилі світла, що поглинається. Частку молекул, які перейшли із збудженого стану в основний з випусканням світла, визначає квантовий вихід ф. Інтенсивність флюоресценції пропорційна кількості світла, адсорбованого зразком. Таким чином, вона прямо пропорційна концентрації розчиненої речовини і абсолютним значенням початкової інтенсивності світла, водночас в фотометрії порівнюються відносні інтенсивності, адсорбовані зразком. Цей факт дозволяє на 1-2 порядки підвищити чутливість визначення речовини в розчині флюорометричним методом порівняно з фотометричним.

➤ **Біоломінесценція і хемілюмінесценція**

Як детектуючі системи в ІФА знайшли застосування ферментативні реакції, енергія яких реалізується у вигляді світлового випромінювання – реакції біо- і хемілюмінесценції. За швидкістю таких реакцій стежать за інтенсивністю світіння реакційної системи, яка реєструється за допомогою люмінометра. Реакції біоломінесценції каталізуються люциферазами світляків і бактерій, а реакція окислення циклічних гідрозидів перекисом водню (реакція хемілюмінесценції) каталізується пероксидазою хрому.

➤ **Електрохімічний метод**

Відомі також електрохімічні способи визначення активності ферментів, що використовуються як позначки в імуноаналізі. Такі датчики дозволяють визначити швидкість ферментативних реакцій у мутних середовищах і зручні для створення проточних імуноферментних осередків.

У імуноферментних методах аналізу як позначки антигенів і антитіл можуть використовувати як ферменти, так і їх субстрати. Якщо позначкою служить молекула ферменту, то обраний спосіб детекції має забезпечувати реєстрацію сигналу, пропорційно залежного від концентрації ферменту, а в разі застосування як позначки субстрату – від концентрації субстрату. У першому випадку фермент виконує роль маркера (він ковалентно пов'язаний з молекулою антигену або антитіла), у другому – детектора (вільний фермент). Після проведення всіх імунохімічних стадій будь-якого методу ІФА необхідно встановити концентрацію позначеного ферментом компонента імунохімічної реакції, тобто визначити каталітичну активність ферменту в пробі. За швидкістю реакції судять про концентрацію ферменту-маркера в системі. Слід зазначити, що ІФА завжди будується на порівняльному визначенні в ідентичних умовах стандартного і вимірюваного зразка, в зв'язку з чим вимога пропорційності швидкості і концентрації є скоріше бажаним, ніж обов'язковим. Достатнім є існування взаємно-однозначної відповідності між кількістю утвореного продукту ферментативної реакції і кількістю ферменту в системі. Отже, виконання умови пропорційності в певному діапазоні концентрацій забезпечує більшу точність експерименту і дозволяє побудувати теоретичну модель з описом методу для його оптимізації.

Ферменти, що використовують в ІФА як позначки

Принципова можливість застосування ферментів як позначки в ІФА обумовлена надзвичайно високою чутливістю реєстрації ферментів у розчині. Якщо звичайними спектрофотометричними або флюорометричними методами можна зареєструвати утворення продукту в концентрації 10–7 моль/л, то концентрація ферменту становитиме при цьому 10–13 моль/л.

До вибору ферментних позначок в ІФА закидають низку загальних вимог. Основними є такі:

1. Висока специфічність і питома каталітична активність, що дозволяє виявити позначку в низьких концентраціях;
2. Доступність ферменту, можливість отримання досить чистих ферментних препаратів, що зберігають високу активність після хімічної модифікації під час отримання кон'юганту з антигенами або антитілами;
3. Стабільність в оптимальних умовах взаємодії антигену з антитілом;
4. Простота і чутливість методу визначення концентрації ферменту.

1.8.2. Класифікація методів ІФА

Натепер розроблено велику кількість різних варіантів проведення ІФА, що мають як принципові, так і другорядні відмінності. Зазвичай розгляд методів ІФА здійснюється з позицій поділу на гетерогенні і гомогенні, тобто за принципом проведення всіх стадій аналізу за участю твердої фази або ж тільки в розчині.

Первинним процесом в ІФА є стадія «впізнавання» аналізованого з'єднання специфічним до нього антитілом. Оскільки процес утворення імунохімічних комплексів відбувається в чітко кількісному співвідношенні, обумовленому афінністю, концентраціями компонентів і умовами реакції, то достатнім для визначення вихідної концентрації аналізованого з'єднання є кількісне оцінювання утворених імунних комплексів. У разі аналізу антигенів для проведення такого оцінювання існує два підходи:

1. пряме вимірювання концентрації утворених комплексів;
2. визначення концентрації решти вільних (які не вступили в реакцію) антитіл.

Класичні методи ІФА засновані на утворенні антитілами в присутності антигену преципітату (осаду), однак для візуальної реєстрації процесу преципітації необхідні високі концентрації компонентів і тривалий час проведення реакції. До того ж, результати такого аналізу не завжди можна однозначно інтерпретувати і в більшості випадків вони носять якісний чи напівкількісний характер. Крім того, для багатьох одновалентних антигенів (гаптенів), наприклад, гормонів та лікарських сполук, ці методи непридатні. Індикація утворення комплексу антиген-антитіло в розчині може бути здійснена, якщо в один з вихідних компонентів реакційної системи ввести позначку, яка легко детектується відповідним високочутливим фізико-хімічним методом.

Вельми зручними для цієї мети виявилися ізотопні, ферментні, флуоресцентні, парамагнітні мітки, використання яких дало можливість збільшити чутливість імунохімічних методів у мільйони разів, а час аналізу зменшити до декількох годин. Оскільки процес комплексотворення відбувається в чітко кількісному відношенні, то концентрація позначки, що входить до складу комплексу, однозначно пов'язана з вихідною концентрацією антигену.

➤ **Гетерогенний ІФА в мікропланшетному форматі**

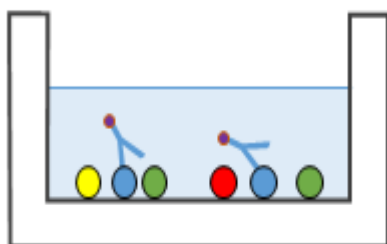
Для здійснення аналізу ефективності комплексотворення необхідно провести повне очищення комплексів від вільних компонентів. Це завдання виявилось легко вирішити, якщо один з компонентів пари антиген-антитіло міцно зв'язати (іммобілізувати) на твердому носії. Іммобілізація дозволяє запобігти агрегацію в розчині і здійснити фізичний поділ комплексів, що утворюються від вільних компонентів. Використання іммобілізації антитіл на твердому носії поклало початок методам твердофазного (гетерогенного) ІФА.

Особливу значущість для широкого впровадження твердофазного ІФА в практику мала розробка як носіїв для сорбційної іммобілізації антитіл і антигенів спеціальних полістирольних плат, що містять 96 лунок.

Гетерогенний (твердофазний) ІФА в мікропланшетному варіанті набув найбільшого поширення в тест-системах для клінічних лабораторних досліджень. Як тверду фазу використовують поверхню лунок полістиролового мікропланшета, на яку адсорбовані, відомі антигени або антитіла (звані в цьому випадку імуносорбент), що входять до складу тест-системи. В ході специфічної реакції імуносорбенту з обумовленими в досліджуваному зразку антитілами або антигенами утворюються імунні комплекси, які виявляються фіксованими на твердій фазі. Субстанції, які не брали участі в реакції, а також надлишки реагентів, видаляються за багаторазового промивання. Така схема дозволяє спростити процес ефективного поділу компонентів реакції.

Прямий ІФА – у прямому імуноферментному аналізі внесений матеріал (антиген) закріплюється під час інкубації на поверхні чистих лунок. Кількість досліджуваного матеріалу детектується за допомогою антитіл до виявлення антигену, з'єднаних із специфічною позначкою, що забезпечує ферментативну реакцію.

Принцип прямого ІФА



різнокольорові кола – різні антигени з внесеної в лунку сироватки;
У з лілового точкою – антитіла, мічені ферментом, що забезпечує колірну реакцію (кон'югат).

Коротка схема: **(Антиген) → Антитіло**

Оскільки додана специфічна мітка пов'язана з антитілами, означає, концентрація пофарбованого продукту реакції дорівнює концентрації антитіл. А концентрація антитіл дорівнює концентрації антигенів.

Непрямий ІФА–у непрямому імуноферментному аналізі використовують антитіла до виявленого антигену, з'єднаного зі специфічною міткою. Ця специфічна позначка і є субстрат ферментативної реакції. За типом імунохімічної взаємодії на першій стадії аналізу (в якій відбувається зв'язування речовини, що визначається) серед гетерогенних методів розрізняють:

1. Неконкурентний метод. Якщо в системі присутні тільки аналізоване з'єднання і відповідні йому центри зв'язування (антиген і специфічні антитіла);

2. Конкурентний метод. Якщо ж на першій стадії в системі одночасно присутні аналізоване з'єднання і його аналог (позначене ферментом аналізоване з'єднання або аналізоване з'єднання, іммобілізоване на твердій фазі), які конкурують за обмежену кількість центрів специфічного зв'язування.

Непрямий неконкурентний ІФА– в лунки, на твердій поверхні яких попередньо відсорбований антиген, вноситься досліджуваний біологічний матеріал (найчастіше сироватка або плазма крові людини), що містить антитіла до антигену. Зразок досліджується на вміст антитіл.

Принцип непрямого неконкурентного ІФА



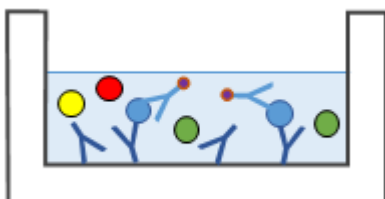
сині кола– антиген, іммобілізований на поверхні лунки;
Y,Y,Y,Y– антитіла з внесеної в лунку сироватки;
Y з лілового точкою– антитіла, позначені ферментом, що забезпечує колірну реакцію (кон'югат).

Коротка схема: **Антиген → (Антитіло) → Антитіло-К**

Таким чином, відмінність від прямого методу полягає в тому, що досліджувані антитіла не приклеюються до поверхні чистої лунки, а зв'язуються з іммобілізованим на планшеті антигеном.

«Сендвіч» є варіантом непрямого неконкурентного гетерогенного ІФА, в якому як імуносорбенту виступає антитіло.

Принцип непрямого неконкурентного ІФА «сендвіч»



різнокольорові кола– різні антигени з внесеної в лунку сироватки;
Y– антитіла, іммобілізованих на поверхні лунки;
Y з лілового точкою– антитіла, позначені ферментом, що забезпечує колірну реакцію (кон'югат)

Коротка схема: **Антитіло → (Антиген) → Антитіло-К**

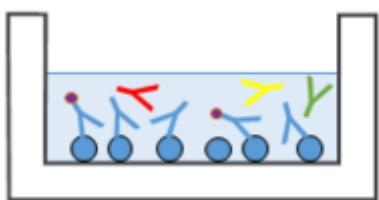
На стадії виявлення специфічного іммунокомплексу антиген виявляється як би затиснутим між молекулами іммобілізованих і позначених антитіл, що послужило приводом для широкого поширення назви «сендвіч»-метод. За аналогічною схемою працюють тест-системи для визначення антитіл, але як імуносорбент в них використовується антиген, а кон'югант містить розчин антигену, позначеного ферментом.

Конкурентні– у разі конкурентного ІФА антигени або антитіла, які визначаються, конкурують з аналогічними позначеними антигенами або антитілами кон'югату за місця зв'язування з імуносорбентом. Аналіз цього типу часто використовують для визначення антигенів, присутніх у високих концентраціях або гормонів, що мають тільки один антиген-зв'язуючий центр.

Серед конкурентних схем твердофазного ІФА існує два основні формати: прямий і непрямий.

Прямий конкурентний ІФА–використовуються іммобілізовані на твердій фазі специфічні антигени, а позначені ферментом і непозначені антитіла конкурують за зв'язок з іммобілізованим антигеном.

Принцип прямого конкурентного ІФА



сині кола– антиген, іммобілізований на поверхні лунки;
Y, Y, Y, Y– антитіла з внесеної в лунку сироватки;
Y з лілового точкою– антитіла, позначені ферментом, що забезпечує колірну реакцію (кон'югат).

Коротка схема: **Антиген → (Антитіло) + Антитіло-К**

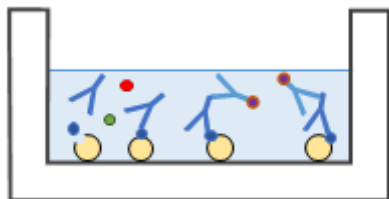
Таким чином, величина детектированого сигналу, який отриманий прямим конкурентним ІФА, перебуває в зворотній залежності від концентрації антигену.

Перевагою прямої схеми є невелике число стадій, що дозволяє легко автоматизувати аналіз. До недоліків схеми відносять складність методів синтезу ферментних кон'югатів, а також можливий вплив компонентів зразка на активність ферменту.

Непрямий конкурентний ІФА–у непрямому конкурентному форматі ІФА використовуються позначені ферментом антивидові антитіла (специфічні або вторинні) і іммобілізований на твердій фазі кон'югат антиген-білок-носій. Одна з найбільш поширених схем ІФА. Конкуренція відбувається на етапі зв'язування антитіл або з антигеном із сироватки крові випробуваного (вільні, видаляються під час відмивання), або з антигеном, іммобілізованим на твердій фазі (під час відмивання не видаляються). Далі до антитіл приєднується кон'югат мічених антитіл і визначається оптична щільність. Тобто якщо у внесеному зразку взагалі немає вимірюваної речовини, всі антитіла зв'яжуться з антигеном, іммобілізованим через білок-носій на поверхні лунки, під час відмивання вони

залишаться в лунці, і детектований сигнал буде високим. У разі, якщо в сироватці випробуваного зразка виявиться багато вимірюваної речовини (тобто вона буде в розчині у вільному стані), частина антитіл зв'яжеться з цією речовиною, а частина – з іммобілізованим; антитіла, що у вільному стані (пов'язані з антигеном із сироватки), будуть видалені під час відмивання, і детектований сигнал дадуть антитіла, пов'язані з іммобілізованим в лунці антигеном – він виявиться низьким, оскільки частина антитіл видалена під час відмивання.

Принцип непрямого конкурентного ІФА



великі жовті кола – кон'югат антиген-білок, іммобілізований на поверхні лунки;
малі червоний, зелений і сині кола – різні антигени з внесеної в лунку сироватки (наприклад, наркотичні речовини);
Y – позначені антитіла, специфічні до конкретного антигену;
Y з ліловою точкою – вторинні антивидові антитіла, позначені ферментом, що забезпечує колірну реакцію (кон'югат).

Коротка схема: **Антиген-К → (Антитіло) + Антиген → Антитіло-К**

Величина детектованого сигналу також, як і під час використання прямого конкурентного методу, перебуває в обернено-пропорційній залежності від концентрації, що визначає антиген.

➤ **Гомогенний ІФА**

У 1972 р. Рубенштейн із співробітниками розробили новий підхід з проведенням всього аналізу без твердої фази. Метод отримав назву гомогенного ІФА (англ. «ЕМІТ» – enzyme multiplied immunoassay technique) і був заснований на обліку відмінностей каталітичних властивостей ферментної позначки у вільному вигляді і в імунохімічному комплексі. Суть його полягає в зв'язуванні низкомолекулярного антигену з ферментом лізоцимом поблизу активного центру. У комплексі з антитілами активний центр стає стерильно недоступним макромолекулярному субстрату, яким є стінки бактеріальних клітин. За збільшення концентрації антигену, що визначається, концентрація неактивного комплексу кон'югату з антитілами знижується, а отже, зростає реєстрований параметр ферментативної реакції. На основі цього підходу було розроблено набори для визначення широкого колу токсичних, наркотичних і лікарських засобів. Істотною перевагою ЕМІТ-аналізу є можливість використання малих обсягів аналізованого зразка (5-50 мкл) і висока швидкість визначення (2-5 хв), зумовлена відсутністю стадії поділу вільного і позначеного аналізованого з'єднання. До недоліків методу слід віднести меншу чутливість, ніж у

гетерогенному ІФА (~ 1 мкг/мл), і можливість визначення тільки низькомолекулярних антигенів.

Нещодавно розроблено нові варіанти ІФА, що містять неінфекційні реагенти на основі рекомбінантних білків вірусу р32, р54 і рр62. Вони також проявляють високу чутливість і специфічність під час дослідження сироваток крові навіть за низької її якості.

Основний принцип ELISA — реакція антиген-антитіло. Якщо антиген (молекула-мішень) являє собою білок, то його очищений препарат звичайно використовують для одержання антитіл, за допомогою яких потім і виявляють цю мішень.

Існує ціланизка підходів, що дозволяють визначити, чи відбулося зв'язуванняантитілазантигеном-мішенню. Один з них —це ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA), що часто використовується для діагностування різноманітних антигенів.

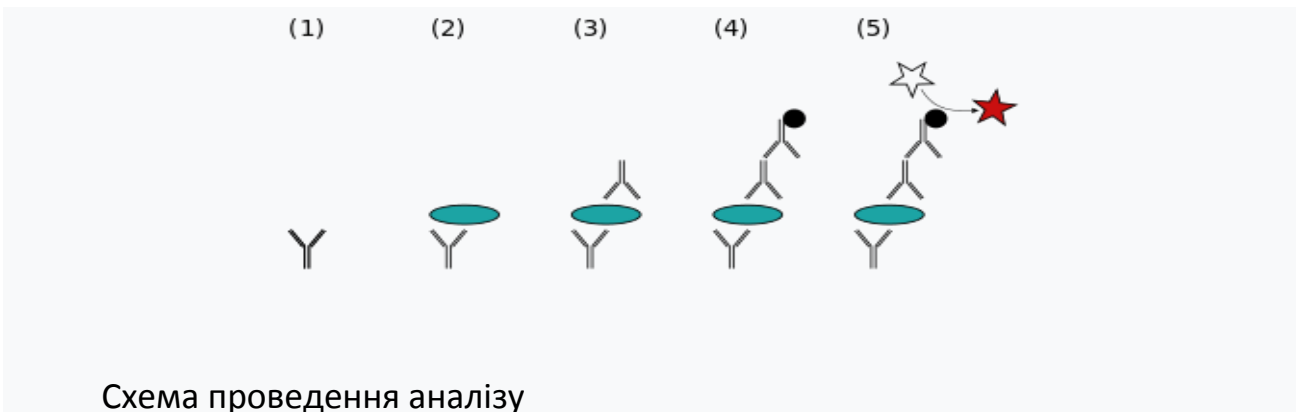


Схема проведення аналізу

1. Підготовка підкладки для фіксації досліджуваного зразка.

2. Зразок, у якому хочуть виявити специфічну молекулу або мікроорганізм, фіксують на твердій підкладці, наприклад на пластиковій мікротитрувальній плашці, що зазвичай має 96 лунок.

3. До фіксованого зразка додають антитіло, специфічне до маркерної молекули (первинне антитіло), потім промивають лунку, щоб видалити молекули первинного антитіла, які не зв'язалися.

4. Додають вторинне антитіло, що специфічно зв'язується з первинним і не взаємодіє з маркерною молекулою. До цього антитіла приєднаний фермент (наприклад, лужна фосфатаза, пероксидаза або уреаза), що може каталізувати перетворення незабарвленого субстрату в забарвлений продукт. Промивають лунку, щоб видалити молекули, які не зв'язалися.

5. Додають незабарвлений субстрат, що упізнається та утилізується ферментом.

6. Проводять якісне або кількісне визначення пофарбованого продукту, за допомогою оцінювання оптичної щільності.

Ферментний імуносорбентний аналіз широко застосовують для діагностування різноманітних інфекційних захворювань, ракових процесів

(переважно завдяки специфічним білкам і пептидам), визначення концентрації різноманітних низькомолекулярних сполук, таких як токсини, лікарські засоби тощо.



1.9. Гігієна та безпека в хімічній лабораторії

Правила з техніки безпеки, охорони праці, нагляду та регулювання у сфері безпечного поводження з небезпечними речовинами та матеріалами промислового призначення регулює центральний орган виконавчої влади.

Вимоги до правил безпеки в хімічній лабораторії та гігієни було наведено раніше див. п. 1.1. «Підготовка лабораторії до проведення випробувань. Правила безпеки».

1.9.1. Охоронне обладнання

Випробувальні лабораторії своєю заявленою політикою і процедурами мають забезпечити захист конфіденційності інформації та прав власності її замовників, зокрема процедури захисту електронного зберігання і передачі результатів. Також лабораторії володіють випробувальним, вимірювальним та допоміжним обладнанням і еталонами для виконання випробувань. Деякі види аналізів потребують ліцензії (дозволу) на використання прекурсорів (наркотичних засобів, психотропних речовин). Тому кожний керівник прагне забезпечити захист, який би не знижував довіру до компетентності, цілісності та збереження власності лабораторії, встановлюючи охоронні системи.

Охоронна система – автоматизований комплекс для охорони різних об'єктів майна.

Класифікація охоронних систем

1. По взаємодії із загрозою:

- пасивні — комплекс засобів і дій, спрямований на залучення уваги власника майна або охоронних служб;

- активні — призначені для запобігання проникненню в об'єкт, що охороняється або розтину сейфа.

Для організації активних систем необхідно керуватися чинним законодавством країни. Якщо буде завдано шкоди здоров'ю зломщика, то піде судовий розгляд і може дійти справа до кримінальної відповідальності.

2. За способом передачі інформації:

- провідні;
- бездротові — в них охоронні датчики передають інформацію на приймальний пристрій за допомогою радіосигналу;

- без зворотного зв'язку

- **недоліки** — наявність безлічі способів придушення радіосигналу спеціальними «Шумогенераторами» (а іноді навіть це відбувається і від звичайних побутових приладів);

- зворотним зв'язком з прийомним пристроєм — дозволяє виробляти безперервний моніторинг системою всіх датчиків;

- через GSM-мережі — використовується як для пультової роботи (сигнал про тривогу передається на пульт охоронної компанії), так і для інформування власника об'єкта, що охороняється, який може отримувати інформацію про різні події (тривога, пожежа, несправність іт. ін.) у вигляді SMS на свій мобільний телефон. Для цього використовуються GSM-комунікатори.

Бездротові системи, зазвичай, застосовують у випадках, коли немає фізичної можливості провести проводку. Інколи комбінують, як бездротові системи з дротяними, так і пасивні системи з активними.

1.10. Управління відходами

Проблема з утилізацією актуальна в промисловій діяльності. Деякі підприємства звертаються за допомогою в спеціалізовані компанії. Знищення має бути безвідходним і нешкідливим як для людини, так і навколишнього середовища.

Хімічні сполуки та їх суміші токсичні, активні, а багато з них пожежо- та вибухонебезпечні. Випаровування, вироблені цими леткими речовинами, завдають непоправної шкоди людям і природі. Тому до процесу необхідно підходити з дотриманням правил безпеки, а також використовуючи засоби особистого захисту.

Класифікація хімічних відходів

Видів хімічних відходів існує велика кількість, тому розкладка їх необхідна за способом виникнення. Крім того, під визначення відходів такого виду часто потрапляють звичайні органічні речовини, заражені якими-небудь речовинами:

- відходи виробництва і використання лугів і кислот;
- відпрацьовані нафтопродукти та відходи нафтовидобутку;

- відходи виробництва лакофарбових матеріалів і розчинів;
- прострочені хімічні матеріали;
- прострочені лікарські препарати;
- продукти діяльності хімічних лабораторій;
- піротехнічні та галогенні відходи;
- вироби, що містять ртуть;
- деревні відходи, що містять хімічне просочення;
- харчові продукти, заражені пестицидами.

За ступенем тяжкості впливу на живі організми всі відходи хімічної промисловості поділяють на 4 класи небезпеки.

Навіщо правильно утилізувати хімічні відходи? Будь-яка група хімічних відходів містить в собі небезпечний набір як хімічних речовин, так і побічних шкідливих продуктів, виділених в процесі виробництва того чи іншого товару або вироби.

Юридична трактування поняття небезпечних хімічних відходів крім ГДК (гранично-допустимої концентрації) шкідливих речовин, широко вживає терміни:

- дратівливі;
- токсичні;
- вибухонебезпечні та легкозаймисті;
- канцерогенні;
- корозійні.

За законодавством практично всіх країн світу відходи, що містять такі речовини, мають бути нейтралізовані і утилізовані в обов'язковому порядку. Якщо цього не відбудеться, шкідливі речовини поступово саморозкладаючися, можуть завдати непоправної шкоди всьому живому на планеті.

Належна утилізація шкідливих хімічних відходів починається в першу чергу з ретельного сортування. Речовини, які можуть реагувати, перебуваючи в щільному контакті, обов'язковим чином мають бути розділені. Другим етапом початку утилізації є їх роздільне зберігання в щільно закритих ємкостях, без можливості взаємодії один з одним і навколишнім середовищем.

Будь-який виробник, який використовує для своїх потреб хімреактиви повинен мати документ, що підтверджує дозвіл на використання. Так званий паспорт небезпечного відходу (ПНВ). Згідно з вимогами цього документа можна вибрати безпечний спосіб утилізації. Для ситуацій, не обумовлених в ПНВ, застосовують додаткові тести.

Крім утилізації відпрацьованих реактивів у лабораторіях періодично має проводитися очищення трубопроводів, стоків каналізації від нальоту шкідливих відпрацювань.

У законі «Про відходи виробництва та споживання» докладним чином описуються правила утилізації шкідливих відходів виробництва. А також про

хімічні реактиви, які втратили робочі властивості через вичерпаний термін придатності.



Для лабораторій найкращим рішенням є укладення договору про надання послуг утилізації спеціалізованими компаніями.



Під час утилізації робочих відходів у лабораторії необхідно чітко виконувати правила для роботи з реактивами.

Способи переробки відходів діяльності лабораторії:

1. Нейтралізація хімічним способом для перетворення шкідливого хімікату в нейтральну масу.

2. Термообробка в спеціальних камерах без доступу повітря.

Відповідальність за неправильну утилізацію хімічних відходів.

Норми утилізації агресивних речовин, чітко регламентує Закон України «Про захист навколишнього середовища». Порушення закону тягне за собою юридичну відповідальність за скоєне. До того ж наслідки можуть бути дуже сумними, аж до кримінального покарання.

Суворість законодавства легко пояснюється небезпекою нехтування правилами утилізації для здоров'я людей і нормального екологічного стану.

Штрафи за недотримання вимог під час утилізації хімічних відходів:

1. Відшкодування завданих збитків екологічній обстановці і відновлення здоров'я постраждалих людей або тварин.

2. Адміністративні штрафні виплати, залежно від завданих збитків.

3. Тимчасове призупинення виробничої діяльності на строк до 3 місяців.

4. Арешт майна лабораторій з подальшою його конфіскацією.

Утилізація хімічних відходів є справою серйозною та відповідальною. І ставитися до нього слід належним чином.

Глава 2. ОСНОВИ РОБОТИ В БІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

2.1. Класифікація лабораторій. Рівні біологічної безпеки мікробіологічних лабораторій та основні вимоги до їх роботи

/І. Рубленко, М. Рубленко/

ВООЗ запропонувала класифікувати всі мікробіологічні лабораторії з урахуванням їх призначення, конструкції, обладнання, засобів, які в них використовують, практик і оперативних процедур, необхідних для роботи з мікроорганізмами, що належать до різних груп ризику. Розрізняють 4 типи лабораторій: базовий рівень біобезпеки 1 (BSL–1), базовий рівень біобезпеки 2 (BSL–2), ізольований рівень біобезпеки 3 (BSL–3) і максимально ізольований рівень біобезпеки 4 (BSL–4). Помилково вважають, що, якщо мікроорганізм віднесений до певної групи, для проведення безпечної роботи з ним потрібна лабораторія з аналогічним рівнем біобезпеки. Однак, виходячи з вимог певних виконуваних процедур та інших чинників, доцільним може бути використання більш високого або більш низького рівня біобезпеки.

Лабораторія 1-го рівня біологічної безпеки (BSL–1). Рівень біологічної безпеки 1 придатний для роботи із добре вивченими мікроорганізмами, які не спричиняють захворювання у людей і становлять мінімальну потенційну небезпеку для персоналу лабораторії й довкілля. Найчастіше BSL–1-лабораторії – це навчальні лабораторії. Вони можуть бути не відокремлені від загальних схем руху в будівлі. Роботу в BSL–1-лабораторії, як правило, проводять із використанням стандартних мікробіологічних методів. Особливих умов утримання обладнання або засобів, спеціального планування не вимагається.

У BSL–1-лабораторіях використовують загальні гігієнічні заходи. Усі працівники лабораторії мають бути в халатах. На ноги необхідно взувати закриті взуття. Якщо на руках є свіжі рани, під час виготовлення препаратів, їх фарбування, а також роботи з небезпечними хімічними речовинами потрібно одягти рукавички. Для виконання стандартних лабораторних процедур у разі дотримання правил гігієни рукавички не використовують. Гігієна рук передбачена одразу після закінчення роботи та контакту з мікроорганізмами шляхом миття водою з милом / спиртом.

Підлога, стіни та поверхні всіх меблів мають бути гладкими і непошкодженими. У лабораторії має бути раковина для вмивання та миття рук. Двері мають бути зачиненими. Необхідно також запобігти потраплянню шкідників до лабораторії. Особисті речі зберігають за межами робочої зони. З обладнання в лабораторії обов'язково повинні мати автоклави.

Для роботи в лабораторії можна використовувати лише культури, отримані з референтних лабораторій, тощо. Забороняється використання мікроорганізмів, виділених із довкілля, оскільки вони можуть бути організмами, які вимагають

практики та обладнання BSL–2. Наявність документування інформації про походження, властивості та рух музейних мікроорганізмів.

Потрібно мити руки перед виходом із лабораторії, столи перед і після роботи потрібно обробляти дезінфекційним засобом. Для переміщення мікроорганізмів у лабораторії потрібно застосовувати транспортні пробірки і штативи та зберігати культури в герметичній ємності після закінчення роботи з ними.

Лабораторія 2-го рівня біологічної безпеки (BSL–2). Рівень біологічної безпеки 2 ґрунтується на BSL–1. BSL–2 придатний для роботи з агентами, що становлять помірну небезпеку для персоналу й довкілля. Персонал лабораторії повинен мати спеціальну підготовку щодо роботи з патогенними агентами. Доступ до лабораторії обмежений. Процедури, в яких можуть бути створені інфекційні аерозолі або розбризкування, проводять у боксах біологічної безпеки. Застосовують спеціальні процедури дезінфекції та безпечно зберігання біологічних агентів.

У BSL–2-лабораторіях використовують захисні окуляри та захисні маски лише під час роботи, якщо процедури, що супроводжуються утворенням крапель та аерозолів, виконують поза боксами біологічної безпеки. Якщо роботу виконують у кабінеті біологічної безпеки, захисні окуляри й лицьові щитки / маски не використовують. Наявність спецодягу та взуття, рукавичок (одягають лише під час роботи з мікроорганізмами 2-ї групи ризику або хімічними речовинами, у разі пошкодження шкіри рук).

BSL–2-лабораторія повинна мати двері з контролем доступу. Вікна, що відчиняються назовні, мають бути забезпечені захисними екранами від комах та гризунів. Необхідно унеможливити потрапляння шкідників до лабораторії. Особисті речі зберігають за межами робочої зони. З обладнання в лабораторії обов'язково мають бути автоклави. Доступ до BSL–2-лабораторії обмежений. Персонал лабораторії має підлягати регулярним профілактичним медичним оглядам, а в разі необхідності – імунізації проти агентів, з якими працюють у лабораторії. Усі процедури з матеріалами, що можуть призвести до утворення аерозолу, необхідно проводити в боксах біологічної безпеки.

Лабораторія 3-го рівня біологічної безпеки (BSL–3). Рівень біологічної безпеки 3 використовують у клінічних приміщеннях, де виконують роботу з місцевими або екзотичними агентами, що можуть призвести до тяжких або потенційно летальних захворювань із респіраторним механізмом передачі. Персонал лабораторії повинен мати спеціальну підготовку до роботи з патогенними і потенційно смертельно небезпечними агентами. Усі процедури, пов'язані з інфекційними матеріалами, мають проводитись у боксах біологічної безпеки.

Рівень біологічної безпеки 3 ґрунтується на BSL–2 та додаткових заходах. Лабораторія має бути відокремлена від інших частин установи. Доступ до лабораторії обмежений та відбувається через шлюз із двома дверима, що властиві блокуватися. Переодягання відбувається у тамбурі між двома дверима. У лабораторії має бути відокремлена зона, де зберігаються чисте обладнання й витратні матеріали, душ. На дверях лабораторії обов'язково має бути вікно для спостереження. Лабораторія повинна мати раковини для миття рук з автоматичним керуванням, розміщені поблизу вихідних дверей, або в кожній робочій зоні. Лабораторія спроектована таким чином, щоб її можна було легко чистити й дезінфікувати. Підлога – нековзка, водонепроникна, стійка до хімічних речовин. Поверхню стін та стелі необхідно вкрити герметичними і гладкими матеріалами, що легко миються та дезінфікуються. Лабораторні меблі мають бути вкриті матеріалами, здатними витримувати оброблення дезрозчинами, та розміщуватися так, щоб можна було легко прибирати. Усі вікна в лабораторії мають бути «глухими». Бокси біологічної безпеки розміщують так, щоб були не на проти вікон та дверей. Наявність припливною вентиляційною системою. Система вентиляції має бути обладнана HEPA-фільтрами. Працівники лабораторій мають змінювати рукавички в разі забруднення / порушення їх цілісності (за необхідності одягають дві пари рукавичок). У кімнатах, де утримують інфікованих тварин – використовувати ЗІЗ.

Лабораторія 4-го рівня біологічної безпеки (BSL–4). Рівень біологічної безпеки 4 застосовують для роботи з небезпечними та екзотичними агентами, що становлять високий індивідуальний і суспільний ризик, передаються респіраторним шляхом, а лікування та профілактика таких захворювань не розроблені. Маніпуляції з агентами з подібною антигенною структурою до агентів, які потребують BSL–4, мають виконуватися також у лабораторіях цього рівня безпеки. Усі співробітники лабораторії та керівники повинні мати дозвіл на роботу з агентами BSL–4-го рівня.

Існує два типи BSL–4-лабораторій:

1) усі маніпуляції з агентами обов'язково виконують у БББ III класу (бокс-лабораторія);

2) усі маніпуляції з агентами проводять у захисних костюмах, що перебувають під позитивним тиском (костюм-лабораторія).

Робоче місце має бути герметичним із можливістю його фумігації. Працівники лабораторії одягають спецодяг. За необхідності лабораторія може бути обладнана піччю для спалювання трупів тварин.

Усі особи, які входять до лабораторії, мають бути попереджені про потенційну небезпеку та правила виходу з лабораторії. До лабораторії дозволяється входити лише особам, які беруть участь у проведенні наукових досліджень або виконують допоміжну роботу. Усіх, хто заходить або виходить із лабораторії, реєструють із зазначенням особи та часу. Персонал має входити і

виходити з лабораторії з обов'язковою зміною всього одягу та прийняттям душу. Персонал лабораторії та обслуговчий персонал підлягають обов'язковому медичному огляду та вакцинопрофілактиці. У межах лабораторії має бути ізолятор для працівників. Матеріали, що потрапляють до лабораторії, мають бути попередньо знезаражені у дводверному автоклаві / фумігаційній камері. Перед початком роботи обов'язково проводять перевірку всіх життєпідтримувальних систем і задокументовують їх стан.

2.2. «Мале» лабораторне обладнання для мікробіологічних лабораторій

/Л. Федотова, О. Кошелева/

2.2.1. Мікроскопи

Для вивчення клітин мікроорганізмів, невидимих неозброєним оком, застосовують спеціальні оптичні прилади – мікроскопи (грец. Micros– малий, scoreo– дивлюся), що забезпечують збільшення досліджуваних об'єктів у сотні (світлові мікроскопи) і сотні тисяч і більше (електронні мікроскопи) раз. За допомогою світлового мікроскопа в мікробіології вивчають морфологію і будова клітин мікроорганізмів, їх зростання і розвиток, проводять первинну ідентифікацію досліджуваних організмів, ведуть спостереження за характером розвитку мікробних ценозів (спільнот) у ґрунті та інших субстратах. За допомогою електронного мікроскопа в мікробіології досліджують субмікроскопічна будова клітин мікроорганізмів, виявляють невідомі раніше форми найдрібніших мікроорганізмів, ведуть їх облік.

Будова мікроскопів

У мікробіологічній практиці застосовують мікроскопитаких марок: МБР-1, МБІ-1, МБІ-2, МБІ-3, МБІ-6, Биолам Р-1 тощо. Вони призначені для вивчення форми, структури, розмірів і інших ознак різних мікроорганізмів, величина яких не менше 0,2–0,3 мкм. Світловий мікроскоп складається з двох частин – оптичної та механічної. До механічної частини відносять штатив, предметний столик, тубус. Штатив складається з підставки і нерухомо пригвинченого тубусотримача. До штатива примикає коробка механізмів, система зубчастих коліс для регулювання руху тубуса. Систему урухомлюють обертанням макрометричного і мікрометричного гвинтів, призначених відповідно для грубого й точного фокусування на препараті. Під час обертання гвинтів за годинниковою стрілкою тубус рухається у напрямку до препарату; під час обертання проти годинникової стрілки – від препарату. Предметний столик служить для розміщення на ньому препарату з об'єктом дослідження. Предметний столик може переміщатися за допомогою гвинтів у горизонтальній площині. У центрі столика є круглий отвір для освітлення препарату знизу променями світла, що скеровуються дзеркалом мікроскопа. На

столику змонтовані два затискачі (клеми) – пружинячі металеві пластинки, призначені для закріплення препарату.

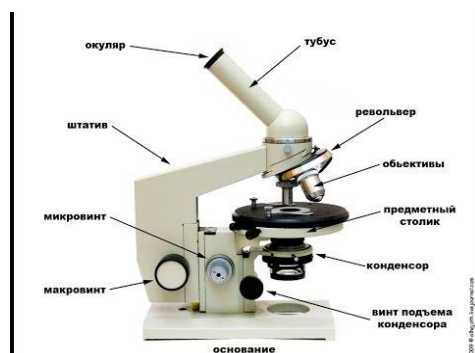


Рис.1. Пристрій світлового мікроскопа

Тубус (труба)– оправа, в яку заключенні елементи оптичної системи мікроскопа. До нижньої частини тубуса прикріплюється револьвер (тримач об'єктива) з гніздами для об'єктивів. У верхній кінець тубуса вставляється окуляр. Сучасні моделі мікроскопів мають похилий тубус з дугоподібним тубусотримачем, що забезпечує горизонтальне положення предметного столика. Оптична частина мікроскопа складається з основного оптичного вузла (об'єктив і окуляр) і допоміжної освітлювальної системи (дзеркало і конденсор з ірисовою діафрагмою).

Дзеркало відображає падаюче на нього світло і скеровує його в конденсор для освітлення препарату. Дзеркало має дві поверхні: плоску і увігнуту, складені тильними сторонами і укладені в одну кільцеподібну оправу, закріплену в напівкруглій вилці. З її допомогою дзеркало переміщується в будь-якому напрямку. Плоску сторону використовують за будь-якого джерела світла і за будь-якого збільшення. Інша, увігнута, сторона використовується за малих збільшеннях без конденсора і, як правило, за штучного освітлення. У деяких випадках дзеркало замінюють стаціонарним освітлювачем.

Конденсор являє собою оптичну систему з двох-трьох короткофокусних лінз для посилення яскравості освітлення цього об'єкта. Конденсор концентрує промені, що йдуть від плоского дзеркала, і скеровує їх під великим кутом на об'єкт. Лінзи конденсора вмонтовані в циліндричну оправу, що з'єднується із зубчастим механізмом, що дозволяє переміщувати конденсор вгору і донизу уздовж осі мікроскопа спеціальним гвинтом. За опускання конденсора поле зору мікроскопа затемнюється, за підняття – освітлюється. Для регулювання інтенсивності освітлення конденсор забезпечений ірисовою (пелюстковою) діафрагмою, що складається з тонких непрозорих серпоподібних пластинок. Під час пересування важеля діафрагми, розташованого в нижній частині оправи конденсора, пластинки можна здвигати і розсовувати, плавно змінюючи діаметр діючого отвору. У багатьох сучасних видів мікроскопів конденсор і джерело світла вмонтовані в мікроскоп.

Об'єктиви(від грец. Objectum– предмет дослідження) є найбільш важливою частиною мікроскопа, від їх якості залежить, як правило, зображення об'єкта. Вони вгвинчуються у гнізда револьвера і складаються із системи лінз, укладених в металеву оправу. Передня, або фронтальна, лінза об'єктива є найменшою і єдиною, що дає збільшення. Решта лінзи в об'єктиві тільки виправляють недоліки отриманого зображення і називаються коригувальними.

Об'єктиви поділяють на сухі й імерсійні. Під час роботи зі сухими об'єктивами між фронтальною лінзою об'єктива і об'єктом дослідження є повітря. У випадках використання імерсійних об'єктивів між фронтальною лінзою об'єктива і об'єктом дослідження має бути рідина з показником заломлення, близьким до показника заломлення скла. Для цього найбільше підходить імерсійна олія (кедрова) з коефіцієнтом заломлення 1,515 (коефіцієнт заломлення скла 1,52). Завдяки цьому, світлові промені під час переходу зі скла в шар кедрової олії не переломлюються (оскільки залишаються за суттю в оптично однорідному гомогенному середовищі) і, невідбиваючись, потрапляють в об'єктив.

Окуляр(від лат. Oculus– очі) вставляється у верхній кінець тубуса. Окуляр являє собою систему двох плоско-опуклих лінз, спрямованих опуклістю в бік об'єктива. Лінза, спрямована до ока, називається очна, а спрямована до препарату – польовою, або збиральною. Призначення польової лінзи – збирати промені, що йдуть від об'єктива, таким чином, щоб вони проходили через маленький отвір очної лінзи. Очна лінза, подібно звичайній лупі, збільшує зображення, що дається об'єктивом. Відстань між лінзами дорівнює півсумі їхніх фокусних відстаней. Призначення окуляра полягає в прямому збільшенні того дійсного зворотного і збільшеного зображення, яке дає об'єктив. Окулярні позначаються цифрами, що показують їх збільшення $\times 5$, $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. У разі тривалої роботи з мікроскопом слід користуватися подвійними окулярами – бінокулярною насадкою.

Основні правила роботи з мікроскопом

Місце для мікроскопа вибирається подалі від прямого сонячного світла. Робота на столі з темною поверхнею сприяє меншому стомленню очей. Рекомендується дивитися в окуляр лівим оком, не заплющуючи правого. У разі роботи з бінокулярною насадкою спочатку регулюється відстань між окулярами відповідно до відстані між очима спостерігача таким чином, щоб поля зору обох окулярів злилися в одне. Переносити мікроскоп необхідно двома руками: однією тримати штатив, інший – підставку мікроскопа. Нахилити мікроскоп в сторону не можна, оскільки при цьому окуляр може випасти з тубуса. Слід оберегти мікроскоп від поштовхів, зіткнення з сильнодіючими речовинами типу кислот і лугів. Не можна торкатися пальцями поверхні лінз, дзеркал і світлофільтрів. Не рекомендується виймати окуляр з труби, щоб не забруднювати пилом трубу і об'єктиви. Під час роботи бажано захищати мікроскоп від дихання, оскільки конденсація парів веде до його

псування. Мікроскоп слід оберігати від пилу, вологи і зберігати в футлярі під скляним ковпаком або покривати тканиною.

Під час мікроскопії препаратів із сухим об'єктивом слід дотримуватися певного порядку в роботі:

а) мікроскоп розміщують на робочому столі тубусотримачем до себе на відстані 3-5 см від краю столу;

б) ставлять об'єктив з малим збільшенням ($\times 8$) і при цьому збільшенні встановлюють найкраще освітлення; найкраще освітлення досягається під час регулювання положення дзеркала, конденсора і діафрагми; під час перегляду непофарбованих препаратів застосовують звужену діафрагму і опущений конденсор, під час спостереження забарвлених препаратів – відкриту діафрагму і піднятий конденсор. Поле зору мікроскопа за правильного скерування світла матиме форму кола, яке добре і рівномірно освітлено;

в) поміщають препарат на предметний столик мікроскопа, під об'єктив, і укріплюють зажимами;

г) опускають об'єктив ($\times 8$) донизу за допомогою макрометричного гвинта обережно, спостерігаючи за об'єктивом збоку, на відстань близько 0,5 см від предметного столика;

д) дивлячись в окуляр, повільно обертають макрогвинт на себе і піднімають тубус доки, поки в полі зору не з'явиться зображення досліджуваного об'єкта. Після цього обертанням мікрометричного гвинта фокусують об'єктив так, щоб зображення предмета було чітким. Мікрометричний гвинт можна обертати не більше ніж на півоберта в той або інший бік, щоб уникнути псування гвинтової нарізі;

е) повернувши револьвер, встановлюють об'єктив із середнім збільшенням ($\times 20$; $\times 40$; $\times 60$);

ж) після закінчення роботи слід зняти препарат з предметного столика, опустити конденсор, поставити під тубус об'єктив $\times 8$, м'якою тканиною протерти мікроскоп і прибрати його у футляр.

Під час роботи з імерсійним об'єктивом необхідно дотримуватися таких правил і порядку роботи:

а) встановити дзеркало плоскою стороною, підняти конденсор і під малим збільшенням мікроскопа (об'єктив $\times 8$) скерувати світло;

б) на підготовлений і пофарбований мазок нанести невелику краплю імерсійної олії (не розмазуючи на склі) і помістити препарат на предметний столик;

в) повернути револьвер до позначки імерсійного об'єктива 90;

г) обережно опустити тубус мікроскопа до занурення фронтальної лінзи імерсійного об'єктива в краплю олії, при цьому спостерігаючи збоку;

д) дивлячись в окуляр мікроскопа і діючи макрогвинтом, повільно підняти тубус мікроскопа до появи в полізору досліджуваного об'єкта;

е) провести остаточне фокусування препарату мікрометричним гвинтом, обертаючи його в межах тільки одного оберту;

ж) після закінчення мікроскопіювання піднімають тубус, опускають конденсор, переводять револьвер на малий сухий об'єктив $\times 8$, знімають препарат і обережно протирають фронтальну лінзу об'єктива $\times 90$ спочатку сухою бавовняною серветкою, а потім тією самою серветкою, але злегка змоченою бензином або спиртом.

2.2.2.Автоклав

Автоклав являє собою товстостінну посудину, що працює під тиском, з масивної кришкою, що закривається гвинтовими зажимами або спеціальним штурвалом. Автоклав оснащений паровідвідною трубкою, манометром, запобіжним клапаном і водомірним склом. Нагрівання води відбувається за допомогою електричного розжарювача в міжстінному просторі автоклава, звідки пара надходить в робочу порожнину. В автоклавах стерилізують живильні середовища, молоко, посуд, гумові предмети і т. інше. Перед стерилізацією в автоклав через спеціальну лійку наливають дистильовану або кип'ячену воду (у разі використання сирієї води швидко утворюється накип) до верхньої позначки на водомірному склі. Автоклав завантажують матеріалом для стерилізації і щільно закривають кришкою, закручуючи гвинти або повертаючи штурвал за годинниковою стрілкою.

Автоклав вмикають, залишаючи відчиненою трубку для виходу повітря і пари. Трубку не зачиняють доки, поки все повітря з автоклава не буде витіснене паром і пара не піде безперервним струменем. Якщо в автоклаві залишиться повітря, то стерилізувальний ефект знизиться, оскільки температура суміші пари з повітрям значно нижче температури насиченої пари.

Після закриття крана стрілка манометра починає підніматися. Коли потрібний тиск буде досягнутий, ступінь нагрівання автоклава зменшують таким чином, щоб стрілка манометра зупинилася на необхідному рівні. Початком стерилізації вважають момент досягнення стрілкою потрібного тиску. Показання манометра відповідає певній температурі. Після закінчення стерилізації нагрівання припиняють і дають стрілці манометра впасти до нуля. Тільки після цього відкривають кран паровідвідної трубки, потім відкручують кришку і виймають простерилізований матеріал.

Правила роботи з автоклавом. Відкривають вентиль, який з'єднує котел зі стерилізаційної камерою. Стерилізаційну камеру автоклава завантажують матеріалом, який стерилізується. Виливають з автоклава стару воду через нижній кран, що з'єднує котел з водомірної трубкою, а уводопарову камеру через лійку заливають воду до червоної межі на водомірній трубці. Кришку автоклава накривають, пригвинчують болтами до корпусу і відкривають конденсаційний і випускний крани, включають автоклав у мережу. На розподільному щитку

автоклава тумблер ставлять у положення «Нагрівання». Під час закипання води з випускного крана через відповідну трубку, опущену у відро з водою, починають виходити великі бульбашки повітря з м'яким булькаючим звуком. Потім починає виходити разом з паром лише невелика кількість дрібних бульбашок. Слідом за цим безперервним струменем з різким тріском з трубки починає вириватися чиста суха пара. Вихід струмені пари відповідає температурі закипання води – 100 С. Цей момент свідчить про видалення повітря з автоклава. Після цього випускний кран закривають, виймають з відра з холодною водою відповідну трубку і починають піднімати тиск до необхідної нам величини в межах 2 атм.

Початком стерилізації вважається той момент, коли стрілка манометра показує необхідний тиск. Після цього інтенсивність підігріву потрібно зменшити, щоб тиск більше не піднімався. Для цього повертають перемикач в положення «Стерилізація». Після закінчення процесу стерилізації перемикач на розподільчому щитку ставлять в положення «викл.», автоклав відмикають, закривають вентиль, який з'єднує стерилізаційну камеру з котлом, і чекають, поки тиск впаде до атмосферного, і на манометрі стрілка показуватиме нуль. Відкривають паровідвідний кран і випускають всю пару. Відкривають кришку автоклава на себе, щоб пара, яка залишилась, пішла у бік і не спричинила опік. Виймають простерилізований матеріал і випускають через конденсаційний кран конденсат, що утворився в стерилізаційній камері, після чого кран закривають. Не можна відкривати кран передчасно, оскільки гарячі середовища бурхливо закипають, змочують або навіть виштовхують ватні пробки, роблячи середовища нестерильними.

Не можна трохи відкривати кран, занурюючи водовідвідну трубку в посудину з холодною водою. Як результат створюється різниця тиску, вода з відра засмоктується в автоклав (стерилізаційну камеру) і закупорює її. Простерилізований матеріал слід залишити за прочиненої кришки автоклава на 3–5 хв для висушування ватних корків у колбах або пробірках. Після роботи воду з автоклава виливають. Його мають зберігати в сухому стані.

Періодично необхідно перевіряти, чи відповідають показники манометра температурі в стерилізаційній камері. Для цього використовують порошкоподібні хімічні речовини з чітко визначеною точкою плавлення, змішують їх з дуже малою кількістю фарби (метиленовою синню, фуксином, сафранін). Суміш насипають у маленькі пробірки, щільно закорковують і поміщають у вертикальному положенні між матеріалом, який стерилізується. Під час розподілу порошку утворюється сплав, пофарбований в колір доданої фарби. Зазвичай користуються такими речовинами як температурними індикаторами:

Речовина	Температура плавлення, °С
Бензонафтол	110
Антипірин	115
Сірчаний порошок	115
Резорцин чистий	118
Бензойна кислота	121

2.2.3. Термостати

Види лабораторних термостатів

Лабораторний термостат – це пристрій, головне призначення якого полягає в отриманні та підтримки стабільної температури.

Це спеціальні шафи, в яких підтримується постійна температура, що застосовується для вирощування мікроорганізмів. Термостати є повітряні і водяні. Перша шафа обігривається теплим повітрям, що проходить через труби, або електричними розжарювачами. У водяних термостатах між подвійними стінками є вода, що нагрівається електричним струмом. Для підтримки точно встановленої температури термостати забезпечують контактними термометрами.

У лабораторії має бути чотири термостата: на температуру 25–30 °С для вирощування мезофільних мікроорганізмів, 40–45 °С для вирощування термофільних мікроорганізмів, на температуру 37 і 43 °С для виявлення та ідентифікації кишкової палички.

Повітряний термостат. Представником лабораторних повітряних термостатів є установка ТВЛ-К120.3 його допомогою в пристрої підтримується необхідна температура, яка ним самим і задається. Термостат повітряний лабораторний ТВЛ-К120 активно використовується під час бактеріологічних і серологічних досліджень. Вони проводяться клініко-діагностичними, екологічними та науково-дослідними лабораторіями. Для нормальної роботи термостата температура повітря в приміщенні має бути в діапазоні 10–35 градусів Цельсія, а відносна вологість не має перевищувати 80 %. Робота мікропроцесорного управління дозволяє з високою точністю досягати термічної стабільності. Термостат лабораторний з охолодженням марки ТВК Л є пристроєм, у якого є різні моделі, які відрізняються робочим об'ємом, габаритами і масою.

Сухоповітряний термостат. Представником сухоповітряних термостатів є ТСвЛ-160. Він необхідний для того, щоб отримувати і підтримувати в робочому обсязі стабільну температуру, яка необхідна для дослідження бактеріологічного, мікробіологічного, санітарно-бактеріологічного, вірусологічного, біохімічного типу.

Водяний термостат. Лабораторний термостат редуказніклтр 24 є водяним. Він має достатню місткість, щоб його використовувати для дослідницьких завдань. В нього можна вмістити 24 пробірки, 24 бутирометри,

24 колби, діаметр яких не перевищує 17 см. У ньому може підтримуватися температура до +95 градусів Цельсія. У водяному термостаті такого типу підігрівають проби молока, щоб потім вимірювати в спеціальному аналізаторі. З його допомогою аналізують жир. Обсяг робочої камери становить 8 літрів. Виготовлений з полірованої нержавіючої сталі. У ньому також є блок управління, за допомогою якого встановлюють необхідну температуру і екран, необхідний для того щоб вводити зміни або встановлювати режим роботи.

Циркуляційний термостат. Циркуляційний термостат, який має повітряне або водяне охолодження відрізняється економічністю. Необхідно відзначити, що циркуляційний термостат повітряний лабораторний вибухозахищений, тому його можна використовувати в приміщеннях різного типу.

Принцип роботи термостата

Лабораторні термостати функціонують за принципом охолодження повітря внутрішнього простору із застосуванням холодильного компресора. Якщо говорити про сухоповітряні моделі, то вони характеризуються примусовим змішуванням повітря, завдяки чому температура всередині камери розподіляється рівномірно.

Термостати періодично відкривають, що призводить до осідання на поверхні їх стінок різноманітної повітряної мікрофлори. Покриваються вони і спорами мікроскопічних грибів і актиноміцетів під час культивування їх в чашках Петрі в великій кількості. Все це веде до забруднення чистих вирощуваних у термостатах культур мікроорганізмів і особливо посівів мікроорганізмів у чашках, зроблених з різних об'єктів середовища: ґрунту, води, повітря, молока, м'яса. Особливо часто ці посіви спороутворюючими грибами – мукор, аспергиллами, пеніцил.

З метою запобігання негативним наслідкам і отримання неспотворених результатів необхідно 1 раз на тиждень проводити стерилізацію термостата.

Для цього спочатку слід проводити вологе прибирання в термостаті і видаляти з нього посіви.

Після висихання термостата беруть довгий пінцет, на нього за спіраллю намотують жмут вати. Пінцет з ватою опускають у спирт і підпалюють. Цим спиртом в полум'ї протирають всі стінки термостата і решітки. Обережно, не перегріваючи, слід працювати в області розміщення терморегулятора. У разі перегріву він може лопнути. Після стерилізації термостат закривають. Дверцята попередньо також протирають спиртом у полум'ї.

2.2.4. Сушильна шафа

Сушильну шафу використовують для багатьох процесів у сучасній лабораторії. Серед таких процесів: сушка (висушування), кондиціонування, вулканізація, легке випалення й інші операції пов'язані з термічною обробкою або попередньою підготовкою зразка або речовини.

Сушильну шафу використовують для стерилізації посуду, інвентарю тощо сухим жаром. Сушильну шафу завантажують у ненагрітому стані. Матеріал, який стерилізують, ретельно загортають у папір або укладають в металеві пенали (піпетки, чашки Петрі). Посуд має бути сухим, шийки колб і пробірок закривають ватними пробками. Матеріал укладають у шафу таким чином, щоб він не торкався стінок. Тривалість стерилізації за температури 160–170 °С становить 2 год (початком стерилізації вважають момент, коли температура всередині шафи досягне 160 °С). Простерилізований матеріал вивантажують з шафи після того, як він охолоне.

2.2.5. Центрифуги

Центрифуга складається з трьох основних компонентів:

- ротора;
- провідного вала;
- мотора.

Ротор – обертальна частина центрифуги. У неї поміщають пробірки, бутлі або мішки, що містять рідини, які потрібно центрифугувати. Ротори різних типів і розмірів взаємозамінні. Їх встановлюють на ведучому валу, який з'єднаний з мотором. Останній забезпечує центрифугу енергією, необхідною для обертання ротора.

На корпусі розташовуються засоби управління і індикатори швидкості і часу. Більшість центрифуг має гальмівну систему, яка приводить ротор в стан спокою незабаром після завершення завдання.

Існує дві конфігурації центрифуг: підлогові і настільні. Різниця між ними полягає головним чином у місткості. Принципи ж роботи однакові.

Метод центрифугування заснований на різній поведінці частинок у відцентровому полі, створюваному центрифугою. Зразок, що знаходиться в посудині для центрифугування, поміщають у ротор, який урухомлюється приводом центрифуги. Для поділу суміші частинок необхідно вибрати набір умов, таких як швидкість обертання, час центрифугування та радіус ротора. Для сферичних частинок швидкість осаджування (седиментації) залежить не тільки від прискорення, але і від радіуса і щільності частинок, і так само від в'язкості середовища, в якому проводиться осадження зразка.

Центрифугування можна розділити на два види: препаративне і аналітичне. Препаративне центрифугування використовують у разі, коли необхідно виділити частину зразка для подальших досліджень. Цей метод застосовують для виділення клітин з суспензії, біологічних макромолекул і т. інше.

Аналітичне центрифугування застосовують для вивчення поведінки біологічних макромолекул у відцентровому полі. Цей метод дозволяє отримувати дані про масу, форму і розміри молекул, що знаходяться у відносно

невеликих обсягах зразка. У повсякденній практиці роботи в лабораторії найчастіше зустрічається препаративне центрифугування.

Препаративні лабораторні центрифуги, в свою чергу, поділяють на групи за призначенням: препаративні ультрацентрифуги, центрифуги загального призначення і швидкісні центрифуги. У всіх центрифугах загального призначення ротори жорстко кріпляться на валу приводу, тому ємність, центрифугується, має бути досить точно врівноваженою. Щоб уникнути поломок, не слід завантажувати в ротор непарну кількість пробірок, за неповного завантаження ємності слід розміщувати одну навпроти одної.

Швидкісні центрифуги мають граничну швидкість 25 тис. об/хві прискорення до 89 тис. g. Камеру, в якій знаходиться ротор і зразки, які центрифугуються, оснащують системою охолодження для запобігання нагріванню, що виникає від тертя під час обертання ротора на великих швидкостях. Зазвичай, такі центрифуги можуть працювати з об'ємом до 1.5 літра і оснащуються кутовими роторами або роторами зі змінними склянками.



Препаративні ультрацентрифуги розганяються до 75000 об/хві мають максимальне відцентрове прискорення 510 тис. g. Їх оснащують холодильною та вакуумною установками, для запобігання перегріву ротора від тертя об повітря. Ротори для цих центрифуг виготовляють з високоміцних титанових або алюмінієвих сплавів. Вал ультрацентрифуг, на відміну від швидкісних і препаративних, робиться гнучким для зменшення вібрації за порушення рівноваги ротора. Ємності в роторі мають бути ретельно врівноважені з точністю до однієї десятої грама.

2.2.6. рН-метри

рН-метр використовують для вимірювання значення рН поживних середовищ та реактивів, а також для перевірки їх якості після стерилізації.

Прилад може також використовуватися для вимірювання значень рН-зразків і суспензій зразків. Використання рН-метра передбачають в стандарті на конкретний аналізований продукт, в якому визначені умови для вимірювання значення рН і умови отримання потрібного значення рН.

рН-метр регулюють відповідно до інструкції виробника за стандартизованої температури 25 °С. Значення рН враховують після того, як стабілізують показники. Значення рН записують з точністю до двох знаків після коми.

рН-метри обов'язково потрібно калібрувати. Калібрування рН-метрів проводиться за допомогою готових розчинів із заданим рівнем рН. Залежно від

моделі приладу калібрувати можна як по одній так і декількох точках, чим більше точок калібрування, тим точніші будуть показники і менша похибка вимірювань рН-метра.

2.3. Бактерії та віруси, класифікація та небезпека

/І. Рубленко, Т. Царенко/

Мікроорганізми – це організми, невидимі неозброєним оком через їхні незначних розмірів. Цей критерій – єдиний, який їх об'єднує.

Систематика мікроорганізмів – наука, завданням якої є опис і упорядкування різноманітних мікроорганізмів, їх розподіл (класифікація) на певні систематичні групи (таксони). Це дозволяє розробити класифікацію, яку використовують для встановлення збудника (рис. 1).

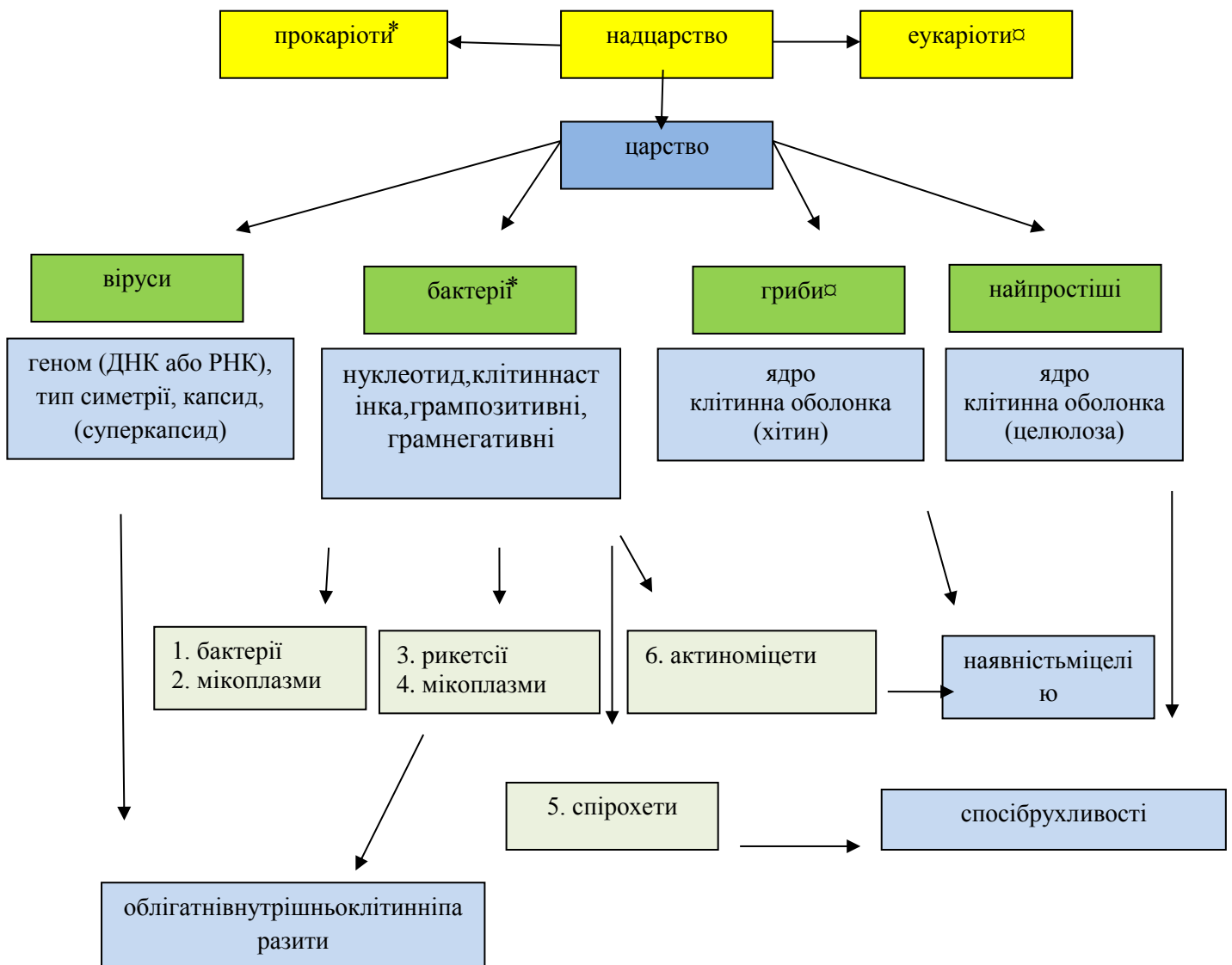


Рис. 1. Класифікація патогенних мікроорганізмів

Примітка: * – розміри прокаріотів та еукаріотів від 0,01–0,4 мкм до 20,0 мкм;
 ⊘ – розміри вірусів від 10 до 400 нм.

Принципи класифікації вивчає особливий розділ систематики – таксономія. Для мікроорганізмів прийняті такі категорії таксономічної ієрархії (таксони):

Класифікація прокариотів: види (Species) об'єднані в роди, роди (Genus) – у родини, родини (Familia) – в порядки, порядки (Ordo) – в класи; класи (Classis) – у відділи, відділи (Divisio) – в царства (Regnum). Основна таксономічна одиниця у мікробіології – вид.

Вид – еволюційно встановлена сукупність особин, які мають єдиний тип організації і які в стандартних умовах виявляють подібні фенотипові ознаки (морфологічні, фізіологічні, біохімічні, антигенну будову), мають свій генофонд і можуть схрещуватись. Мікроорганізми, що відрізняються незначними спадковими властивостями, називаються *варіантами*.

Штам – це сукупність бактерій одного виду, виділених з різних джерел або з одного джерела в різний час. Штами можуть відрізнятися за деякими ознаками, що не виходять за межі характеристики виду.

Серовар (Серотип) – група мікроорганізмів одного виду, що об'єднуються загальною антигенною структурою і визначають серологічними методами діагностики. Серовар не є таксономічною категорією і дозволяє систематизувати патогенні і умовно-патогенні мікроорганізми, що необхідно для епідеміологічних досліджень. Їх систематизація ведеться на основі вірулентності, ліпополісахаридів, фарбуванні за методом Грама, присутності екзотоксинів, генетичних особливостей або інших чинників, що дозволяють розрізнити двох особин одного виду. Група сероварів з однаковими антигенами називається *серогрупи*.

Клон – сукупність особин, яка утворилась із однієї материнської клітини.

Культура – це сукупність особин одного виду або варіанту, що знаходяться у фазі поділу чи спокою, в певному об'ємі поживного середовища.

Всі мікроорганізми діляться на *прокариоти* (клітини, які не мають) і *еукариоти* (клітини, які мають ядро).

Застосовують 2 принципи класифікації мікроорганізмів:

- філогенетичний принцип – належність мікроорганізмів до певної групи визначають, згідно з будовою геному;
- фенотиповий принцип – об'єднання мікроорганізмів за подібними властивостями (патогенністю морфологією, фізіологією, ферментативними властивостями, антигенною будовою).

Царство прокариотів охоплює відділ ціанобактерій та відділ еубактерій, який, у свою чергу, підрозділяється на порядки: власне бактерії (відділи Gracilicutes, Firmicutes, Tenericutes, Mendosicutes); актиноміцетів; спірохет; рикетсій; хламідій.

Основними таксономічними критеріями, що дозволяє віднести штам бактерій до тієї чи іншої групи, є морфологія мікробних клітин (коки, палички, звивисті); ставлення до фарбування за методом Грама –

тинкторіальні властивості (грампозитивні і грамнегативні); здатність до спороутворення. За фізіологічними властивостями всі мікроорганізми ділять на аеробів і анаеробів.

За типом дихання мікроорганізми класифікують:

1. облигатні аероби – мікроорганізми, для оптимального росту яких необхідно 21 % кисню. До них належать збудники туберкульозу, чуми, холерний вібріон. На поверхні рідких живильних середовищ вони ростуть, як правило, у вигляді плівки;

2. облигатні анаероби – бактерії, які ростуть за відсутності вільного молекулярного кисню за рахунок процесів бродіння. Вони одержують кисень з органічних сполук у процесі їх метаболізму. Деякі з них не виносять навіть незначної кількості вільного кисню. Такими бактеріями є збудники правця, ботулізму, газової анаеробної інфекції, бактероїди, фузобактерії та інші. Окремі клостридії можуть бути аеротолерантними. Для культивування їх використовують спеціальні живильні середовища й апарати (анаеростати), в яких створюються анаеробні умови через поглинання кисню або заміни його індиферентними газами (азотом, воднем);

3. *факультативні анаероби (факультативні аероби)* пристосувались, залежно від умов середовища (наявності або відсутності кисню), переключати свої метаболічні процеси з використанням молекулярного кисню для бродіння та навпаки. Групу факультативних анаеробів формують численні представники родини кишкових бактерій (ешеріхії, сальмонели, шигели), стафілококи та ін. бактерії;

4. *мікроаерофіли* – особлива група мікробів, для яких концентрація кисню під час культивування може бути зменшена до 2 %. Вищі його концентрації здатні затримувати ріст. Ця група представлена молочнокислими, азотфіксуючими бактеріями;

5. *капнеїчними* називають такі мікроорганізми, які потребують, крім кисню, ще й до 10 % вуглекислого газу. Типовими представниками є збудники бруцельозу бичачого типу.

За формою мікроорганізми поділяють на три групи: кулясті (коки), паличкоподібні та звивисті. Серед *кулястих* розрізняють: монококи – розміщені поодинокі, мікрококи – малі, диплококи – по два мікроорганізми, тетракоки – по чотири, сарцини – пакети з 8–16 та більше, стрептококи – у вигляді ланцюгів та стафілококи – скупчення мікроорганізмів у вигляді виноградного грона (рис. 2).

Паличкоподібні форми поділяють на: власне бактерії – палички, бацили – палички зі спорами та клостридії – палички зі спорами, діаметр яких перевищує діаметр мікроорганізму. Вони розміщуються поодиноці, парами, ланцюгами, під кутом або скупченнями. Кінці паличок можуть бути заокругленими, прямокутними, загостреними чи потовщеними. Спори знаходяться у центрі клітини, ближче до кінця (субтермінально) або на кінці

(термінально). Деякі бактерії набувають розгалуженої форми, інші мають вигляд переплечених ниток.

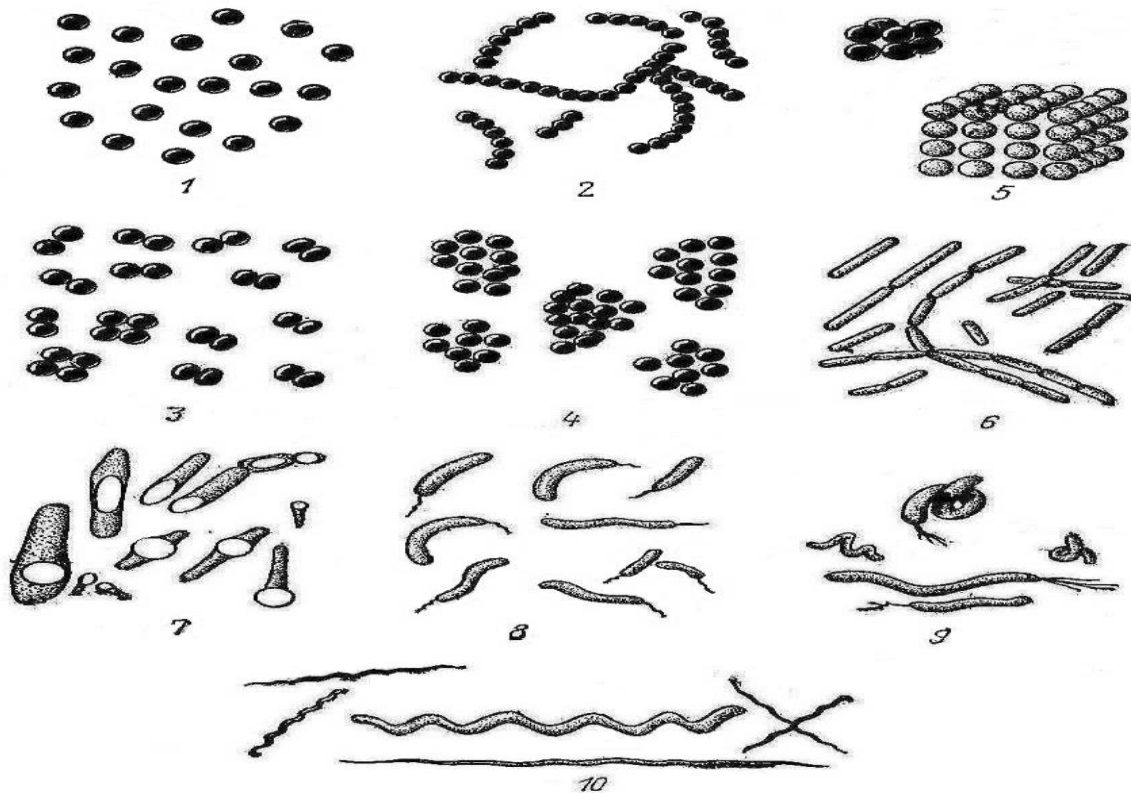


Рис. 2. Форми бактерій

Кулясті (коки):

- 1 – монококи
- 2 – стрептококи
- 3 – диплококи і тетракоки
- 4 – стафілококи
- 5 – сарцини

Паличкоподібні:

- 6 – власне бактерії (палички без спор)
- 7 – бацили, клостридії (палички зі спорами)

Звивисті:

- 8 – вібріони
- 9 – спірили
- 10 – спірохети

Звивисті форми бактерій поділяють на три групи: вібріони, які мають форму коми, спірили – мають 2–4 великих завитки та спірохети – мають більше 5 завитків, штопороподібної форми.

У природі існують *йінші форми* бактерій, які не відповідають критеріям, притаманним вищеописаним основним морфологічним групам. В окрему морфологічну групу можуть бути виокремлені мікобактерії *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* – прямі, або зігнуті палички, інколи ниткоподібні або ж міцелієподібні. Останні дві структури легко розпадаються на палички або коки. Існують бактерії, що отримали назву нитчастих. Нитчасті бактерії – переважно паличкоподібні одноклітинні і багатоклітинні організми, їхні нитки утворені багатьма клітинами, з'єднаними за допомогою слизу, чохла, піхв, плазмодесмів тощо.

Бактерії, які мають вигляд зімкненого або розімкненого кільця (тороїдна форма), правильної шестикутної зірки, трикутника, плоских квадратних пластинок, гантелей та бактерій, що утворюють вирости – простеки. Це переважно одноклітинні організми трикутної або іншої форми. У деяких з них виявлена променева симетрія. Вони нерухливі, спор не утворюють. Форма клітин прокариотів визначається твердою (ригідною) оболонкою. Для більшості клітин бактерій форма є сталою видовою ознакою. У циклі розвитку низки бактерій спостерігається зміна форми клітин, наприклад у представників роду *Arthrobacter*.

Для мікоплазм та L-форм бактерій, які не мають щільної оболонки, а оточені лише мембраною, властива здатність приймати різні форми, тобто для них є характерним явище плеоморфізму. Залежить форма у багатьох випадках і від середовища, у якому перебуває мікроорганізм. Немало видів бактерій, вирощених на штучних живильних середовищах, суттєво відрізняються від тих, що перебувають в організмі людини чи тварин (збудник сибірки та ін.).

Поширеною є **класифікація бактерій Д. Берджі**. Всі бактерії об'єднані у царство *Procariotae*, яке поділяють за будовою клітинної стінки та забарвленням за Грамом на 4 відділи: *Gracilicutes* – грамнегативні; *Firmicutes* – грампозитивні, *Tenericutes* – не мають клітинної стінки (мікоплазми), *Mendisicutes* – архебактерії (вони не патогенні).

Відділ *Gracilicutes* об'єднує бактерії, овальної форми, прямі чи зігнуті палички, у вигляді спіралей, довгих ниток, що зафарбовуються грам негативно. Розмножуються переважно бінарними діленням, брункуванням, множинних внутрішніх поділів з утворенням дрібних сферичних клітин – беоцитів (наноцитів).

Розрізняють рухомі та нерухомі мікроорганізми. Органами руху у бактерій є джгутики, які мають вигляд спіральні зігнутих ниткоподібних утворень і, завдяки гвинтоподібним обертам, зумовлюють хаотичний рух уперед, хоча здатні і до таксису. Вони є похідними цитоплазматичної мембрани, відходять від її базального тільця і складаються із субодиноць білкафлагеліну, який є повноцінним антигеном, що відрізняється від соматичного. Побудовані із спіральної нитки, гачка та базального тільця і мають вигляд тонких (діаметр 12–18 нм) та довгих циліндрів, які інколи можуть значно перевищувати довжину мікроорганізму – від 10 до 20 мкм, а в деяких випадках навіть до 80–90 мкм. Тому їх не видно у звичайному світловому мікроскопі і для фарбування використовують методи імпрегнації, спрямовані на нашаровування фарб або реактивів з метою штучного збільшення діаметра. Кількість джгутиків та їх розташування характерні для окремих видів мікроорганізмів.

Залежно від цього, бактерії поділяють на: *монотрихи*, що мають один полярний джгутик, *амфітрихи* – джгутики є на обох кінцях клітини, по одному чи по кілька; *лофотрихи* – пучок джгутиків розташований на одному кінці клітини; *перетрихи* – джгутики знаходяться на всій поверхні клітини (рис. 3).

Для визначення руху мікробів використовують молоді 18–24 годинні бульйонні культури або конденсати з агарових культур та змив у фізіологічному розчині з поверхні добових культур на МПА.

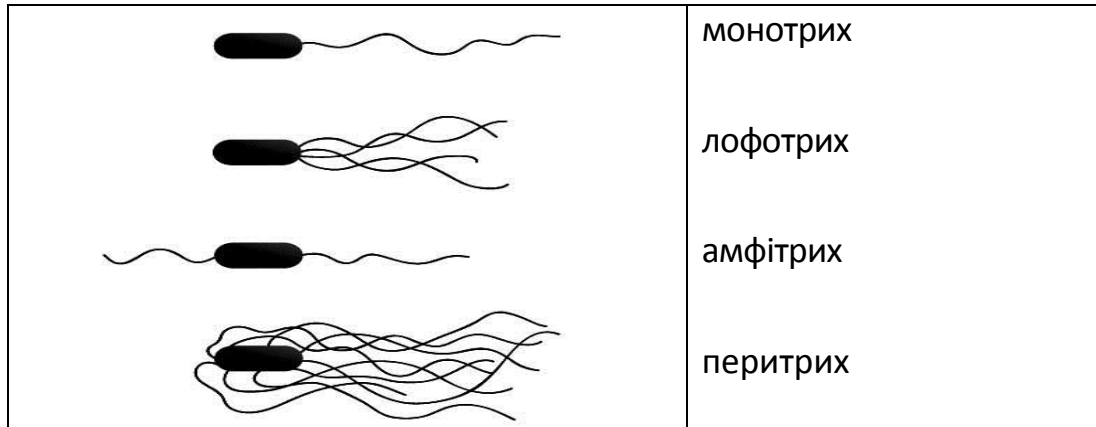


Рис. 3. Джгутики у бактерій

До цього відділу відносять 1–16 із 35 систематичних груп:

Група 1. Спірохети.

Група 2. Аеробні (мікроаерофільні, рухомі, звивисті) віроїдніграмнегативні мікроорганізми.

Група 3. Нерухомі (інколи рухомі) грамнегативні зігнуті бактерії.

Група 4. Грамнегативні аеробні палички та коки.

Група 5. Факультативно-анаеробні грамнегативні палички.

Група 6. Грамнегативні, анаеробні, прямі, зігнуті й спіральні бактерії.

Група 7. Бактерії, які здійснюють дисиміляційне відновлення сірки або її сульфату.

Група 8. Анаеробні грамнегативні коки.

Група 9. Рикетсії та хламідії.

Група 10. Аноксигенніфототрофні бактерії.

Група 11. Оксигенніфототрофні бактерії.

Група 12. Аеробні хемолітотрофні бактерії і родинні мікроорганізми.

Група 13. Бактерії, які брунькуються або/і мають вирости.

Група 14. Бактерії, які мають чохол.

Група 15. Нефотосентетичніковзаючі бактерії, які не утворюють плодових тіл.

Група 16. Ковзаючі бактерії, які утворюють плодові тіла: міксобактерії.

Відділ Firmicutes містить еубактерії, аспорогенні та спороутворювальні бактерії, актиноміцети, які зафарбовуються грампозитивно. Систематичні групи:

Група 17. Грампозитивні коки.

Група 18. Грампозитивні палички і коки, які утворюють ендоспори.

Група 19. Грампозитивні неспороутворювальні палички правильної форми.

Група 20. Грампозитивні неспороутворювальні палички неправильної форми.

Група 21. Мікобактерії.

Групи 22–29. Актиноміцети.

Відділ *Tenericutes* містить еубактерії (мікоплазми), які не мають клітинної стінки, а цитоплазма оточена лише мембраною. Поліморфні, переважно нерухомі, грамнегативні клітини, які розмножуються брунькуванням, бінарним поділом, фрагментацією ниткоподібних форм, або шляхом морфологічних перетворень. Відділ має лише одну групу:

Група 30. Мікоплазми (молікути).

Відділ *Mendisicutes* об'єднує прокаріоти, в клітинній стінці яких відсутній пептидоглікан. Грампозитивні бактерії різні за формою (паличкоподібні, кулясті, звивисті). Розрізняють терморезистентні (ростуть за температури понад 100 °С та розмножуються у гіперсолоній воді). Відносять 31–35 групи:

Група 31. Метаноогени.

Група 32. Сульфатредукуючі археї.

Група 33. Екстремальні галофільні аеробні архебактерії (галобактерії).

Група 34. Архебактерії, позбавлені клітинної стінки.

Група 35. Екстремальні термофіли і гіпертермофіли, які метаболізують сірку.

Відділ *Gracilicutes* об'єднує 3 класи:

1 клас – *Scotobacteria* – бактерії, які не потребують світла – відсутній процес фотосинтезу;

2 клас – *Oxypotobacteria* – бактерії, які потребують світла і виділяють кисень;

3 клас – *Desoxypotobacteria* – бактерії, які потребують світла і не виділяють кисень.

Класифікація інфекційних мікроорганізмів (за **ВООЗ**) за групами ризику:

Група ризику I (*низький індивідуальний і суспільний ризик*). Мікроорганізми, які невідомі як етіологічні агенти захворювань людини або тварин (*Bacillus subtilis*);

Група ризику II (*помірний індивідуальний і обмежений суспільний ризик*). Патогенний агент, який може спричинити захворювання у людини або тварин, проте не показує серйозного ризику для лабораторного персоналу, суспільства, свійських тварин або навколишнього середовища. Необережна робота в лабораторії може спричинити інфекцію, яка може бути ліквідована терапевтичними і профілактичними засобами, а ризик її поширення обмежений (*Salmonella typhimurium*);

Група ризику III (*високий індивідуальний і низький суспільний ризик*). Патогенний агент викликає серйозні захворювання у людини, однак, як правило, не поширюється від хворого до здорового (*Brucella*, вірус гарячки Ласса);

Група ризику IV (*високий індивідуальний і суспільний ризик*). Патогенний агент викликає серйозні захворювання у людини або тварин і легко прямо або

опосередковано поширюється від хворого до здорового (вірус Ебола-Марбурга, вірус ящура).

Окрім того, мікроорганізми поділяють за патогенністю (рис. 4).

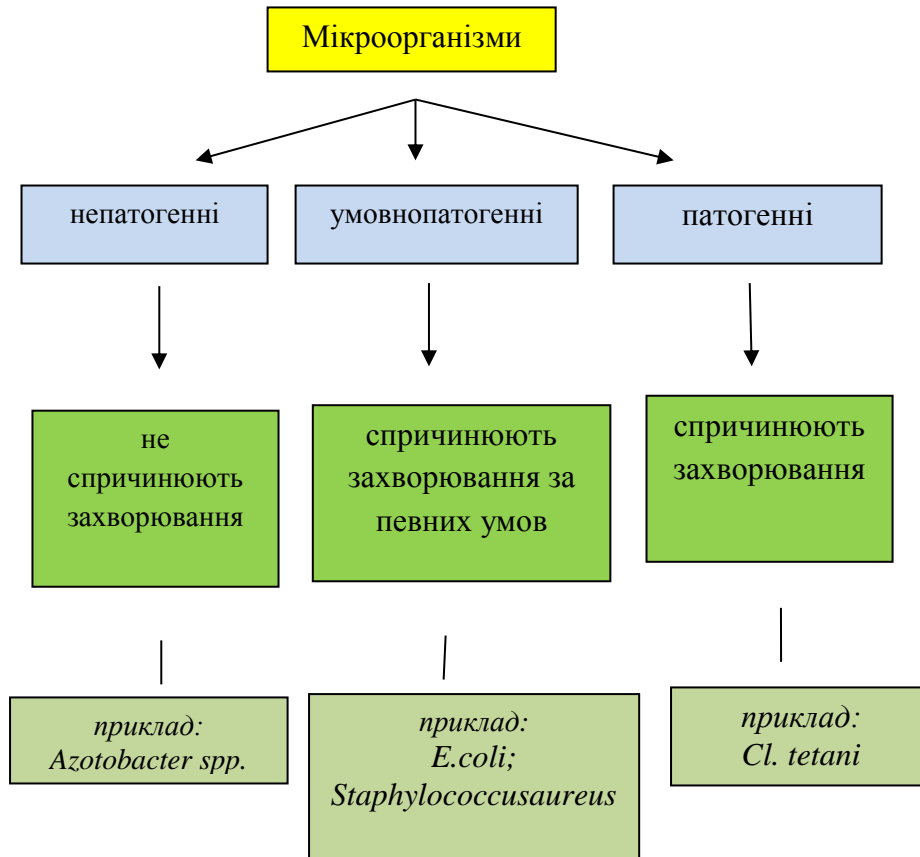


Рис. 4.Класифікація мікроорганізмів за патогенністю

У країнах СНГ патогенні мікроорганізми за ступенем небезпеки поділяють на 4 групи:

I група – збудники особливо небезпечних інфекцій (сап, чума, сибірка, чорна віспа);

II група – збудники висококонтагіозних епідемічних бактерійних, вірусних, рикетсіозних, грибкових захворювань (бруцельоз);

III група – збудники бактерійних, вірусних, рикетсійних, грибкових, протозойних інфекційних хвороб, які виділені в самостійні нозологічні форми (дифтерія);

IV група – збудники бактерійних, вірусних, грибкових септицемій, менінгітів, пневмоній, ентеритів, токсикоінфекцій, гострих бактерійних отруень.

2.4. Різні поживні середовища. Особливості росту мікроорганізмів на поживних середовищах/В. Семанюк, І. Турко/

2.4.1. Типи поживних середовищ

Розрізняють два основні типи поживних середовищ:

- синтетичні середовища, головні складові яких точно відомі (наприклад, глюкозо-сольова поживна середовище);
- емпірично підібрані поживні середовища природного походження, склад яких точно невідомий (наприклад, пептони, що готуються з частково гідролізованого білка).

Вибір поживного середовища залежить від мети експерименту.

Практичні незручності за використання синтетичних поживних середовищ:

- мікроорганізми, вирощені на таких поживних середовищах, відрізняються за фенотипом від мікроорганізмів, що вирощені на поживних середовищах природного походження (наприклад, за складом і за швидкістю поділу);

- розмноження мікроорганізмів на таких середовищах легше пригнічується надлишковою аерацією або токсичними катіонами; мікроорганізми також більш чутливі до порушень балансу між деякими складовими поживного середовища, особливо амінокислотами.

Синтетичні поживні середовища, складені з хімічних сполук, використовують переважно для вивчення обміну речовин у мікробній клітині. Поживні середовища, виготовлені з продуктів рослинного і тваринного походження, незважаючи на те, що вони не можуть бути стандартизовані і не мають певного хімічного складу, знаходять широке застосування в практичній мікробіології.

2.4.2. Вимоги, що виставляють до поживних середовищ

Поживні середовища мають:

- утримувати необхідні для харчування мікроба поживні речовини;
- мати реакцію рН, оптимальну для вирощуваного виду мікроба;
- мати достатню вологість, оскільки мікроби харчуються за законами дифузії і осмосу;
- володіти ізотонічністю;
- бути стерильними, що необхідно для забезпечення можливості вирощування чистих культур мікробів.

До складу середовищ, що використовуються для вирощування бактерій, входять азот, вуглець, водень, кисень, фосфор, калій, сірка, натрій, магній і мікроелементи залізо, кобальт, йод, марганець, бор, цинк, молібден, мідь та

інші, які необхідні для побудови білків цитоплазми. Вказані елементи мають перебувати в поживному середовищі в доступних для мікроорганізмів сполуках, до того ж вимоги різних мікробів до них не однакові. Потребу в кисні і водні бактерії задовольняють переважно за рахунок надходження в їх клітину води.

Патогенні мікроорганізми можуть засвоювати азот з простих амонійних сполук, інші потребують амінокислот, треті розщеплюють високомолекулярні речовини – пептони, що являють собою продукти неповного ферментативного перетравлення білків. Суто паразитичні види бактерій розмножуються тільки в присутності нативного білка. Джерелом вуглецю для патогенних бактерій є різні вуглеводи, багатоатомні спирти, органічні кислоти та їх солі.

Неорганічні елементи бактерії одержують за додавання до поживних середовищ солей: NaCl, K₂HPO₄, K₂HPO₄ і т. інше.

Мікроелементи, що виконують роль каталізаторів хімічних процесів, надходять у поживне середовище з пептоном, неорганічними солями і водою.

Крім органічних і неорганічних елементів бактерії потребують ростових чинників. Вони потрапляють до поживних середовищ продуктів рослинного і тваринного походження, що містять у своєму складі нікотину, пантотену, парабензойну кислоти, вітаміни А, В, С та інші.

Поживні речовини можуть засвоюватися мікробами тільки за певної реакції поживного середовища, оскільки проникність оболонок мікробних клітин змінюється залежно від рН-середовища. Через різну потребу в поживних речовинах і рН-середовища у різних видів мікробів виключається можливість створення універсального поживного середовища.

2.4.3. Поживні середовища загального і спеціального призначення

Для приготування поживних середовищ використовують:

- продукти тваринного походження (м'ясо, казеїн, молоко, яйця, кров та інші);
- продукти рослинного походження (картопля та інші);
- органічні і неорганічні сполуки визначеного хімічного складу.

За консистенцією розрізняють щільні й рідкі поживні середовища. Щільні поживні середовища готують з рідких додаванням до них клейових речовин – агару або желатину. Агар-агар (від малайського – водорості) – продукт рослинного походження, який видобувають з морських водоростей. У воді агар-агар розчиняється за температури 80–86 °С, застигає за 36–40 °С. Желатин – речовина білкової природи тваринного походження. У теплій воді за температури 32–34 °С він набухає і розчиняється, а за більш низької температури перетворюється в холодець. Однак зарН нижче 6,3 і вище 7,0 щільність желатину зменшується, і він погано застигає.

Здатність агарових і желатинових середовищ зберігати щільність за температури 37 °С дало можливість вирощувати патогенні мікроби за оптимальної, для більшості з них, температури на щільних середовищах.

Усі поживні середовища поділяють на середовища загального призначення і спеціальні.

До середовищ загального призначення належать м'ясопептонний бульйон, м'ясопептонний агар і м'ясопептонний желатин. Середовища загального призначення використовують для вирощування багатьох патогенних мікробів і застосовують як основу для приготування спеціальних середовищ, додаючи до них кров, цукор, молоко, сироватку та інші інгредієнти, необхідні для розмноження того чи іншого виду мікроба.

До спеціальних поживних середовищ належать елективні (вибіркові) і диференційно-діагностичні середовища.

Елективні (вибіркові) середовища

Принцип створення елективних поживних середовищ базується на забезпеченні основних біохімічних і енергетичних потреб того виду мікроба, для культивування якого вони призначені. Певний склад і концентрація поживних мікроелементів, ростових чинників і відповідного значення рН забезпечують оптимальні умови для вирощування одного або декількох видів мікроорганізмів. За посіву на них матеріалу, що містить суміш різних мікроорганізмів, найкраще проявлятиметься ріст того виду, для якого це середовище буде елективним.

Диференційно-діагностичні поживні середовища

Диференційно-діагностичні поживні середовища використовують для визначення видової приналежності досліджуваного мікроба, ґрунтуючись на особливостях його обміну речовин. За призначенням диференційно-діагностичні поживні середовища поділяють на:

- середовища для виявлення протеолітичної і гемолітичної здатності мікробів, що містять у своєму складі білкові речовини: кров, молоко, желатин, згорнуту кров'яну сироватку і т. інше;
- середовища з індиферентними хімічними речовинами, які служать джерелом живлення для одних видів мікробів і не засвоюються іншими видами;
- середовища з вуглеводами і багатоатомними спиртами для виявлення відповідних ферментів;
- середовища для визначення редукційної здатності мікробів.

До складу диференційно-діагностичних середовищ, призначених для виявлення цукролітичних і окислювально-відновних ферментів, вводять індикатори: нейтральний червоний, метиленовий синій, лакмус, кислий фуксин, бромтимоловий синій, водний блакитний барвник і розолову кислоту. Змінюючи своє забарвлення за різних значень рН, індикатор вказує на наявність або відсутність розщеплення, окислення або відновлення введеного в середовище інгредієнта. Однак індикатор не є обов'язковою складовою частиною

середовищ, призначених для виявлення ферментів. Так, наявність желатинази та інших протеолітичних ферментів у культурі визначають за розрідженням желатину, згорнутого яєчного або сироваткового білка.

Сухі поживні середовища

Приготування поживних середовищ – одна з найбільш відповідальних і важких ділянок роботи бактеріологічної лабораторії. У зв'язку з цим біологічна промисловість випускає стандартні, консервовані, сухі поживні середовища, різного призначення, для культивування мікроорганізмів.

Приготування звичайних поживних середовищ

Основою для приготування звичайних поживних середовищ служить м'ясна вода, що містить екстрактивні речовини.

М'ясна вода

1. 100 г свіжої нежирної яловичини або телятини звільняють від кісток, жиру і сухожиль, пропускають через м'ясорубку, фарш заливають 1 літром водопровідної води, добре розмішують. Залишають на добу в прохолодному місці або поміщають на 2 години в термостат.

2. М'ясну масу віджимають через марлю, кип'ятять протягом 5 хвилин. Для згортання білків дають охолонути. Фільтрують через ватний фільтр, доливають водою до початкового об'єму. М'ясну воду розливають у флакони, стерилізують 20-30хвилин за температури 120 °С і зберігають у темному місці. Вона має вигляд прозорої жовтуватої рідини слабо-кислої реакції (рН 6,2–6,4), без білків. У м'ясній воді міститься невелика кількість амінокислот, солей, вуглеводів, чинників росту та екстрактивних речовин. Для приготування звичайних поживних середовищ до м'ясної води додають сухий пептон, який є первинним продуктом гідролізу білка і складається зі суміші поліпептидів та амінокислот, отриманих шляхом пептичного або триптичного перетравлення.

На м'ясокомбінатах для виробництва сухого пептону використовують фібрин, кров та інші відходи. Сушать пептон у розпилювальній вакуум-сушарці. Рідкий пептон можна приготувати в лабораторних умовах шляхом пептичного перетравлення білків.

Пептон Мартена

Свинячі шлунки (не промиті водою) з рясним слизовим шаром очищають від плівок, жиру і пропускають через м'ясорубку. До фаршу додають воду і соляну кислоту в такому співвідношенні: фарш зі свинячих шлунків 250 г, вода водопровідна, нагріта до 50 °С, 1000 мл, соляна кислота (питома вага 1,18) 10 мл. Суміш витримують у термостаті за 50 °С. Через 24 години пептон прогрівають в автоклаві за 100 °С і фільтрують, фільтрат підлужнюють 10 % розчином NaOH до лужної реакції за лакмусом. Після цього фільтрат розливають у колби і стерилізують за 115 °С 30 хвилин.

М'ясопептонний бульйон

Для приготування м'ясопептонного бульйону пептон Мартена змішують з рівним об'ємом м'ясної води, встановлюють необхідну реакцію, кип'ятять 30 хвилин, фільтрують і стерилізують за 115 °С 30 хвилин.

За використання трипсину для перетравлення м'ясоодержують перевар Хоттінгера. Таке перетравлення приводить до повнішого використання білків м'яса, які розщеплюються до пептонів, поліпептидів і вільних амінокислот. Затриптичного перетравлювання м'яса отримують у 10 разів більше бульйону, ніж за звичайного методу.

М'ясний перевар Хоттінгера

М'ясо, звільнене від жиру і сухожиль, нарізають невеликими шматочками, поміщають у каструлю з киплячою водопровідною водою (співвідношення 1:1,5) і кип'ятять 15–20 хвилин, потім м'ясо витягують з рідини і пропускають через м'ясорубку. Встановивши рН охолодженої до 40–45 °С рідини, що дорівнює 8, заливають нею фарш. До отриманої суміші додають сухий панкреатин у кількості 0,5–1 % або підшлункову залозу з розрахунку 100 г залози на 1 л рідини. Потім суміш знову підлужнюють до рН 8 і наливають її в бутель. Туди ж додають 2–3 % хлороформу і, закупоривши бутель гумовим корком, кілька разів струшують уміст. Бутель ставлять на 7–14 діб за температури 37 °С.

Як результат перетравлення м'ясний фарш перетворюється на гомогенний сіруватий осад, над яким знаходиться абсолютно прозора рідина солом'яно-жовтого кольору. Перевар Хоттінгера хорошої якості дає позитивну реакцію на триптофан і містить 560–860 мг% амінного азоту. Для приготування бульйону до 1 частини перевару додають 6–7 частин води.

Триптичний перевар за Хоттінгером

У цьому середовищі міститься велика кількість амінокислот, отже, підвищується його буферність, і за рахунок цього більш стабільним стає значення активної реакції середовища.

Для виготовлення перевару беруть один кілограм м'яса без сухожилків і жиру, ріжуть на дрібні шматки розміром до 1–2 см, ставлять у каструлю з подвійним об'ємом води, яка кипить, і кип'ятять 15–20 хвилин, поки м'ясо не стане сірим, що свідчить про коагуляцію білків. Його виймають з рідини і пропускають через м'ясорубку. У рідині, яка залишилась, встановлюють рН 8,0, опускають туди фарш і охолоджують до 40 °С. Потім додають 10 % (до об'єму рідини) свіжої підшлункової залози, попередньо очищеної від сполучної тканини, жиру і двічі пропускають через м'ясорубку. Замість залози використовують сухий препарат панкреатину (0,5 %). Одержану суміш ретельно збовтують і доводять рН до 7,8–8,0. Через 30 хвилин перевіряють рН. Якщо активна реакція середовища не змінюється в кислую сторону, це свідчить про недоброякісність ферменту.

Коли рН середовища стабілізується, суміш переливають у великі бутлі, заповнюючи їх на 1/3. Додають до 3 % хлороформу, закупорюють посуд гумовими корками та інтенсивно збовтують для перемішування рідин. Надлишок парів хлороформу випускають. Через 1-2 год знову перевіряють рН середовища, встановлюючи його на 7,4–7,6. Отриману суміш залишають за кімнатної температури на термін до 16 днів. Протягом перших 3-4 днів щоденно перевіряють і коригують рН середовища, а також збовтують флакони не менше, ніж 3 рази на добу. Пізніше цю процедуру можна не проводити і збовтувати середовище слід не так часто. За 1–2 дні до закінчення циклу перетравлювання збовтування середовища припиняють.

Про завершене якісне перетравлювання свідчать просвітління рідини, яка набуває солом'яно-жовтого кольору, а також утворення на дні пилоподібного осаду.

Рідина легко фільтрується, її перевіряють на наявність триптофану за допомогою проби з бромною водою (до 3–4 мл фільтрату додають 3–4 краплі бромної води). За наявності триптофану (до 2,0–3,0 г/л) колір середовища змінюється на рожево-фіолетовий. Визначають загальний азот, який у нормі досягає 11,0–12,0 г/л, і аміний азот (до 7,0–9,0 г/л).

Гідролізат фільтрують через паперовий або полотняний фільтр, розливають у бутлі та автоклавують за температури 120 °С протягом 30 хвилин. У такому вигляді він може зберігатися тривалий час.

Триптичний перевар за Хоттінгером використовують для отримання бульйону Хоттінгера. З цією метою до 100–200 мл гідролізату додають 800–900 мл дистильованої води, 0,5 % хлориду натрію та 0,2 % однозаміщеного фосфорнокислого натрію. Доводять рН до 7,4–7,6, розливають у флакони і стерилізують 20 хвилин за 120 °С.

2.4.4. Ріст мікроорганізмів на поживних середовищах

Мікроорганізми на щільних поживних середовищах ростуть у вигляді колоній, що відрізняються за низкою ознак (табл. 1).

На рідких поживних середовищах ураховують такі культуральні ознаки:

- характер поверхневого росту – наявність пристінного кільця, сітчастої, ніжної, сухої, зморшкуватої, слизистої або грубої плівки;
- інтенсивність помутніння – слабе, помірне, сильне;
- об'єм і структуру осаду – значна і незначна кількість;
- за наявності осаду визначають його структуру – зерниста, крихка, порохоподібна, губчаста, слизиста, у вигляді жмутика вати та ін.);
- зміна кольору середовища – не змінений, змінений за утворення пігменту.

Поділ колоній за ознаками росту на поживних середовищах

Поділ колоній	Ознака росту на поживних середовищах
<i>За величиною (діаметром)</i>	великі (4–6 мм і більше); середні (2–4 мм); дрібні (1–2 мм); карликові або точкові (менше 1 мм)
<i>За формою колоній</i>	правильно кругла; неправильна (амебоподібна); ризоїдна
<i>За прозорістю</i>	прозорі, що пропускають світло; мутні
<i>За рельєфом і контуром форми у вертикальному розрізі</i>	плоскі; опуклі; куполоподібні; краплеподібні; конусоподібні; плоскоопуклі; плоскі, що стеляться на поверхні середовища; із вдавленим центром; ізприпіднятим центром у вигляді соска
<i>За характером поверхні</i>	матова або блискуча; з глянцем; суха або волога; гладенька або шорстка Гладенькі колонії позначають як S-форми (smooth – гладенький), а шорсткі – R-форми (rough – шорсткий, нерівний). Форма шорстких поверхонь також може бути різноманітною: зморшкуватою, бородавчастою, шагреневою, мати радіальну посмугованість тощо
<i>За кольором пігменту, який синтезують бактерії</i>	білі, кремові, жовті, золотисті, сині, червоні тощо
<i>За консистенцією (визначають під час доторкання до колонії бактеріологічною петлею)</i>	пастоподібна, в'язка або слизова, суха, крихка

2.5. Принципи аналітичних методів/Л. Федотова, О. Кошелева/

Методи аналітичної хімії можуть бути класифіковані на основі різних принципів.

1) Залежно від маси речовини, яку використовують для аналізу, розрізняють:

- макрометод, де для аналізу потрібно не менше 0,1 г речовини;

- напівмікрометоди, де потрібно 0,1–0,01 г речовини;
- мікрометоди, де потрібно 10^{-2} – 10^{-3} г речовини;
- ультрамікрометоди, де потрібно $\sim 10^{-6}$ г речовини;
- субмікрометоди, де потрібно $\sim 10^{-9}$ г речовини.

2) Залежно від виду аналізу розрізняють методи розділення і методи визначення.

У методах *розділення* основне завдання – відділення компонентів, що заважають, або виділення визначають компонента у вигляді, придатному для кількісного визначення.

У методах *визначення* зміст аналізованого компонента знаходять у пробі без попереднього розділення.

3) Розрізняють хімічні та фізико-хімічні методи аналізу, іноді виділяючи в окрему групу фізичні методи.

До хімічних методів відносять гравіметричний і титриметричний, до фізико-хімічних (інструментальних) – спектрофотометричний, електрохімічний, хроматографічний та інші.

2.5.1. Гравіметричний аналіз

Гравіметричний аналіз полягає у виділенні речовини в чистому вигляді і його зважуванні. Виділення проводять осадженням або виділяють у вигляді летючої сполуки (метод відгонки).

Суть методу: аналітичним сигналом у гравіметрії є маса. Масу знаходять, порівнюючи з іншою, відомою масою за допомогою вагів.

Гравіметричний метод застосовують для:

- визначення неорганічних речовин (кількісно можна визначити неорганічні катіони, аніони, нейтральні сполуки типу I_2 , H_2O , CO_2 , SO_2). В агрономії визначають вміст фосфору у фосфорному добриві, ґрунтах (при цьому PO_3^{3+} осаджують у вигляді солі NH_4MgPO_4 , яка після прожарювання перетворюється в пірофосфатмагнію $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Методом відгону визначають кристалізаційну воду в солях, гігроскопічну воду в ґрунті, добривах, рослинному матеріалі. Методом відгонки – певний компонент виділяють у вигляді летючої сполуки дією температури і кислотою. Визначають склад сухої речовини в плодах, овочах, клітковини, «сирої» золи в рослинному матеріалі;

- визначення органічних речовин має обмежене застосування (наприклад саліцилову кислоту визначають за реакцією з йодом: жовтий осад відфільтровують, висушують, зважують).

Способи відбору середньої проби залежать від особливостей аналізованого матеріалу від мети визначення. У виробництві необхідно визначити середній хімічний склад великої партії неоднорідного матеріалу (ядохімікату, добрива, ґрунти).

2.5.2. Титрометричний аналіз

Титрометричний аналіз заснований на точному вимірі кількості реактиву, витраченого на реакцію з речовиною, яку визначають. Для розгляду матеріалу цього розділу будуть потрібні такі визначення.

Титрований, абостандартний, розчин – розчин, концентрація якого відома з високою точністю.

Титрування – додавання титрованої речовини до аналізованої для визначення точної еквівалентної кількості.

Розчин для титрування часто називають *робочим розчином* або *титрантом*. Наприклад, якщо кислота титрується лугом, розчин луку називається титрантом.

Момент титрування, коли кількість доданого титранту хімічно еквівалентна кількості речовини, яка титрується, називається *точкою еквівалентності*.

У титриметричному аналізі може бути використана не будь-яка хімічна реакція.

Реакції, що застосовуються в титриметрії, мають відповідати таким основним вимогам:

- 1) реакція має протікати кількісно, тобто константа рівноваги реакції має бути досить велика;
- 2) реакція має протікати з великою швидкістю;
- 3) реакція не має ускладнюватися протіканням побічних процесів;
- 4) має існувати спосіб визначення закінчення реакції.

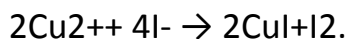
Якщо реакція не задовольняє хоча б одному з цих вимог, вона не може бути використана в титриметричному аналізі.

У методах прямого титрування речовина, яку визначають, безпосередньо реагує з титрантом. Для проведення аналізу цим методом досить одного робочого розчину.

У методах зворотного титрування (або, як їх ще називають, методах титрування за залишком) використовують два титрованих робочих розчини: основний і допоміжний. Широко відомо, наприклад, зворотне титрування хлорид-іона в кислих розчинах. До аналізованого розчину хлориду спочатку додають відомий надлишок розчину для титрування нітрату срібла (основного робочого розчину). При цьому відбувається реакція утворення малорозчинного хлориду срібла: $\text{Ag}^{++} + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl}$. Надмірна кількість AgNO_3 , яка не вступила в реакцію, відтитровують розчином тіоціаната амонію (допоміжний робочий розчин): $\text{Ag}^{++} + \text{SCN}^- \rightarrow \text{AgSCN}$. Вміст хлориду можна розрахувати, оскільки відома загальна кількість речовини (моль), введена в розчин, і кількість речовини AgNO_3 , яка не вступила в реакцію з хлоридом.

Третім основним видом титриметричних визначень є титрування замісника (титрування за заміщенням, непряме титрування). У цьому методі до визначеної речовини додають спеціальний реагент, який вступає з ним в

реакцію. Один з продуктів взаємодії потім відтитрують робочим розчином. Наприклад, за іодометричного визначення міді до аналізованого розчину додають відомий надлишок KI. Відбувається реакція:



Йод, що виділився, відтитрують тиосульфатом натрію.

2.5.3. Спектрофотометричний аналіз

Спектрофотометричний аналіз відносять до абсорбційних методів, тобто заснований на вимірюванні поглинання світла речовиною.

Він охоплює спектрофотометрію, фотокolorиметрію і візуальну фотометрію, яку зазвичай називають colorиметрією.

Кожна речовина поглинає випромінювання з певними (характерні тільки для неї) довжинами хвиль, тобто довжина хвилі випромінювання, яке поглинається, індивідуальна для кожної речовини, і на цьому ґрунтується якісний аналіз за світлопоглинанням.

Основою кількісного аналізу є закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l,$$

де $A = -\lg(I/I_0) = -\lg T$ – оптична щільність;

I_0 – інтенсивність потоку світла, спрямованого на поглинальний розчин;

c – концентрація речовини, моль/л;

l – товщина світлопоглинального шару;

ϵ – молярний коефіцієнт світлопоглинання;

T – коефіцієнт пропускання.

Для визначення концентрації аналізованої речовини найбільш часто використовують такі методи:

- 1) молярного коефіцієнта світлопоглинання;
- 2) градуцованого графіка;
- 3) добавок;
- 4) диференціальної фотометрії;
- 5) фотометричного титрування.

Метод молярного коефіцієнта поглинання. Під час роботи за цим методом визначають оптичну щільність декількох стандартних розчинів $A_{\text{ст}}$, для кожного розчину розраховують $\epsilon = A_{\text{ст}} / (l \cdot c_{\text{ст}})$ і отримане значення посередковують. Потім вимірюють оптичну щільність аналізованого розчину A_x і розраховують концентрацію c_x за формулою:

$$c_x = A_x / (\epsilon \cdot l).$$

Обмеженням методу є обов'язкове підпорядкування аналізованої системи закону Бугера-Ламберта-Бера, що найменше в області досліджуваних концентрацій.

Метод градувального графіка. Готують серію розведень стандартного розчину, вимірюють їх поглинання, будують графік у координатах $A_{ст} - Z_{ст}$. Потім вимірюють поглинання аналізованого розчину і за графіком визначають його концентрацію.

Метод добавок. Цей метод застосовують під час аналізу розчинів складного складу, оскільки він дозволяє автоматично врахувати вплив «третіх» компонентів. Сутність його полягає у такому. Спочатку визначають оптичну щільність A_x аналізованого розчину, що містить компонент, який визначають, невідомої концентрації c_x , а потім в аналізований розчин додають відому кількість компонента, який визначається ($c_{ст}$) і знову вимірюють оптичну щільність $A_{x+ст}$.

Оптична щільність A_x аналізованого розчину дорівнює:

$$A_x = e / c_x,$$

а оптична щільність аналізованого розчину з добавкою стандартного

$$A_{x+ст} = e / (c_x + c_{ст}).$$

Концентрацію аналізованого розчину, знаходимо за формулою:

$$c_x = c_{ст} A_x / (A_{x+ст} - A_x).$$

Метод диференціальної фотометрії. Якщо в звичайній фотометрії порівнюється інтенсивність світла, що пройшло через аналізований розчин невідомої концентрації, з інтенсивністю світла, що пройшло через розчинник, то в диференціальної фотометрії другий промінь світла проходить не через розчинник, а через пофарбований розчин відомої концентрації – так званий розчин порівняння.

Фотометричним методом можна визначати також компонент суміші двох і більше речовин. Ці визначення засновані на властивості адитивності оптичної щільності:

$$A_{см} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

де $A_{см}$ – оптична щільність суміші;

A_1, A_2, A_n – оптичні щільності для різних компонентів суміші.

Фотометричні методи аналізу застосовують для контролю різноманітних виробничих процесів. Ці методи можуть бути застосовані для аналізу великих і малих складів, але особливо цінною їх особливістю є можливість визначення домішок (до $10^{-5} \dots 10^{-6} \%$). Методи абсорбційної спектроскопії використовують у хімічній, металургійній, фармацевтичній та інших галузях, а також у медицині і сільськогосподарському виробництві.

Промисловість випускає прилади для абсорбційної спектроскопії: колориметри, фотометри, фотоелектроколориметри, спектрофотометри тощо, в яких використовують різні комбінації освітлювачів, монохроматорів і приймачів світла.

2.5.4. Електрохімічні методи аналізу

Електрохімічні методи аналізу і дослідження засновані на вивченні і використанні процесів, що протікають на поверхні електрода або в приелектродному просторі. Будь-який електричний параметр (потенціал, сила струму, опір і т. ін.), функціонально пов'язаний з концентрацією аналізованого розчину і піддається правильному вимірюванню, може служити аналітичним сигналом.

Розрізняють *прямі і непрямі електрохімічні методи*. У прямих методах використовують залежність сили струму (потенціалу і т. ін.) від концентрації обумовленого компонента. У непрямих методах силу струму (потенціал і т. ін.) вимірюють з метою знаходження кінцевої точки титрування компонента, який визначається, відповідним титрантом, тобто використовують залежність вимірюваного параметра від обсягу титранту.

Для будь-якого роду електрохімічних вимірювань необхідні електрохімічний ланцюг або електрохімічна комірка, складовою якої є аналізований розчин.

Потенціометричні методи засновані на вимірі різниці потенціалів індикаторного електрода і електрода порівняння або, точніше, *електрорухомих сил* (ЕРС) різних ланцюгів, оскільки експериментально вимірюється саме ЕРС, що є різницею потенціалів.

Рівноважний потенціал індикаторного електрода пов'язаний з активністю і концентрацією речовин, що беруть участь в електродному процесі, рівнянням Нернста:

$$E = E^{\circ} + RT / (nF) \ln (a_{\text{окис}} / a_{\text{відн}})$$

$$E = E^{\circ} + RT / (nF) \ln ([\text{оксиди}] \gamma_{\text{оксиди}} / ([\text{відн}] \gamma_{\text{відн}})),$$

де R – універсальна газова постійна, яка дорівнює 8,31 Дж/(моль · К);
 T – абсолютна температура; F – постійна Фарадея (96500 Кл/моль);
 n – число електронів, що беруть участь в електродній реакції;
 $a_{\text{окис}}$, $a_{\text{службова програма відновлення}}$ – активності відповідно окисленої і відновленої форм редокс-системи; $[\text{Оксиди}]$ і $[\text{восст}]$ – їх молярні концентрації;
 $\gamma_{\text{окис}}$, $\gamma_{\text{восст}}$ – коефіцієнти активності; E° – стандартний потенціал редокс-системи.

Підставляючи $T = 298,15$ К і числові значення констант у рівняння, отримуємо:

$$E = E^{\circ} + (0,059 / n) \lg (a_{\text{окис}} / a_{\text{відн}})$$

$$E = E^{\circ} + (0,059 / n) \lg ([\text{оксиди}] \gamma_{\text{оксиди}} / ([\text{відн}] \gamma_{\text{восст}})).$$

Методи прямої потенціометрії засновані на застосуванні рівняння Нернста для знаходження активності або концентрації учасника електродної реакції за експериментально виміряної ЕРС ланцюга або потенціалу електрода. Найбільшого поширення серед прямих потенціометричних методів отримав метод визначення pH , але створення останнім часом надійно працюючих іоноселективних електродів значно розширило практичні

можливості прямих методів. Показник n вимірюють і методом потенціометричного титрування.

Для визначення n найчастіше використовують скляний електрод. Основними перевагами скляного електрода є простота роботи, швидке встановлення рівноваги і можливість визначення n в окисно-відновних системах. До недоліків відносять крихкість матеріалу електрода і складність роботи під час переходу до лужної і сильноокислих розчинів.

Крім концентрації іонів водню, прямим потенціометричним методом з іоноселективними електродами можна визначити склад декількох десятків різних іонів.

Потенціометричне титрування засноване на визначенні точки еквівалентності за результатами потенціометричних вимірювань. Поблизу точки еквівалентності відбувається різка зміна (стрибок) потенціалу індикаторного електрода. Так само, як і в інших титрометричних методах, реакції потенціометричного титрування мають протікати чітко стехіометрично, мати високу швидкість і йти до кінця.

Для потенціометричного титрування збирають ланцюг з індикаторного електрода в аналізованому розчині і електрода порівняння. Як електрод порівняння найчастіше використовують каломельний або хлорсрібний електроди.

Тип застосовуваного індикаторного електрода за потенціометричного титрування залежить від властивостей титриметричної суміші і її взаємодії з електродом. У кислотно-основному титруванні використовують скляний електрод, в окислювально-відновному – інертний (платиновий) електрод або електрод, оборотний відносно одного з іонів, що містяться в титриметричній суміші; в осідальному – срібний електрод; в комплексометричному – металевий електрод, оборотний до титруючого іону металу.

Для знаходження точки еквівалентності часто будують диференціальну криву в координатах $\Delta E / \Delta V - V$. На точку еквівалентності вказує максимум отриманої кривої, а відлік завісью абсцис, що відповідає цьому максимуму, дає обсяг титранту, витраченого на титрування до точки еквівалентності. Визначення точки еквівалентності до диференціальної кривої значно точніше, ніж з простої залежності $E - V$.

Основними перевагами методу потенціометричного титрування є висока точність і можливість проводити визначення в розведених розчинах, у мутних і забарвлених середовищах, а також визначати кілька речовин в одному розчині без попереднього розділення. Значно розширюється область практичного застосування потенціометричного титрування за використання неводних розчинників. Вони дозволяють аналізувати багатокомпонентні системи, які у водному розчині визначити не вдається, провести аналіз речовин, нерозчинних або тих, які розкладаються у воді, і т. інше. Потенціометричне титрування легко

може бути автоматизовано. Промисловість випускає кілька типів автотитраторів, що використовують потенціометричні датчики.

До недоліків потенціометричного титрування можна віднести не завжди швидке встановлення потенціалу після додавання титранту і необхідність у багатьох випадках проводити титрування велику кількість відліків.

У потенціометричному аналізі основними вимірювальними приладами є потенціометри різних типів. Вони призначені для вимірювання ЕРС електродної системи. Оскільки ЕРС залежить від активності відповідних іонів у розчині, багато потенціометрів дозволяють безпосередньо вимірювати також величину pX – негативний логарифм активності іона X . Такі потенціометри в комплекті з відповідним іоноселективним електродом називаються *іономіри*. Якщо потенціометр і електродна система призначені для вимірювання активності тільки водневих іонів, прилад називається *pH-метром*.

2.5.5. Хроматографічні методи аналізу

Хроматографія – процес, який базується на багаторазовому повторенні актів сорбції та десорбції речовини під час переміщення її в потоці рухомої фази вздовж нерухомого сорбенту. Поділ складних сумішей хроматографічним способом засновано на різній сорбції компонентів суміші.

У процесі хроматографування, так звана, рухлива фаза (елюент), що містить аналізовану пробу, переміщається через нерухому фазу. Зазвичай нерухома фаза являє собою речовину з розвиненою поверхнею, а рухлива – потік газу або рідини, що фільтрується через шар сорбенту. При цьому відбувається багаторазове повторення актів сорбції-десорбції, що є характерною особливістю хроматографічного процесу і зумовлює ефективність хроматографічного поділу.

Якісний хроматографічний аналіз тобто ідентифікація речовини за його *хроматограмою*, може бути виконаний порівнянням хроматографічних характеристик, найчастіше *утриманого обсягу* (тобто обсягу рухомої фази, пропущеної через колонку від початку введення суміші до появи цього компонента на виході з колонки), знайдених за певних умов для компонентів аналізованої суміші і для еталона.

Кількісний хроматографічний аналіз проводять зазвичай на хроматографі. Метод базується на вимірюванні різних параметрів хроматографічного піку, що залежать від концентрації хроматографуючої речовин – висоти, ширини, площі і утримуваного обсягу або утворення утримуваного обсягу на висоту піка.

У кількісній газовій хроматографії застосовують методи абсолютного градування і внутрішньої нормалізації, або нормування. Використовується також метод внутрішнього стандарту. За *абсолютного градування* експериментально визначають залежність висоти або площі піку

від концентрації речовини і будують градувальні графіки або розраховують відповідні коефіцієнти. Далі визначають ті самі характеристики піків для аналізованої суміші, і за градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованої речовини. Цей простий і точний метод є основним під час визначення мікродомішок.

За використання методу внутрішньої нормалізації приймають суму будь-яких параметрів піків, наприклад суму висот всіх піків або суму їх площ, за 100%. Тоді відношення висоти окремого піка до суми висот або відношення площі одного піка до суми площ за множення на 100 характеризуватиме масову частку (%) компонента в суміші. За такого підходу необхідно, щоб залежність величини вимірюваного параметра від концентрації була однаковою для всіх компонентів суміші.

2.5.6. Види хроматографічних методів

Цвет М.С. сформулював закон, який назвав законом адсорбційного заміщення:

«Речовини, розчинені в певній рідині, утворюють певний адсорбційний ряд А, В, С, ..., що виражає відносна адсорбційна спорідненість його членів до адсорбентів. Кожен з членів адсорбційного ряду, володіючи більшою адсорбційною спорідненістю, ніж наступний, витісняє його зі з'єднання і в свою чергу витісняється попереднім».

Таким чином, основною умовою для здійснення хроматографічного процесу – процесу поділу речовин на колонці – Цвет М.С. вважав відмінність в адсорбції.

У сучасній хроматографії для поділу речовин крім молекулярної адсорбції використовують і інші фізико-хімічні явища. Є кілька класифікацій, які базуються на різних принципах. Загальноприйнятими є такі.

За агрегатним станом застосованих фаз. Відповідно до цієї класифікації хроматографію поділяють на газову і рідинну. Газова охоплює газо-рідинну і газо-адсорбційну хроматографію. Рідинна хроматографія поділяється на рідинно-рідинну, рідинно-адсорбційну і рідинно-гелеву. Перше слово в цій класифікації характеризує агрегатний стан рухомої фази.

За механізмами поділу, тобто за характером взаємодії між сорбентом і сорбатом. Згідно з цією класифікацією хроматографію поділяють на такі види:

1) адсорбційна хроматографія – розділення базується на відмінності в адсорбції речовин, які розділяються, твердим адсорбентом;

2) розподільна хроматографія – розділення базується на відмінності в розчинності поділюваних речовин у нерухомій фазі (газова хроматографія) і на відмінності в розчинності поділюваних речовин у рухомій і нерухомій рідких фазах;

3) іоннообмінна хроматографія – розділення полягає у відмінності в здатності поділюваних речовин до іонного обміну;

4) проникальна хроматографія – розділення полягає у відмінності в розмірах або формах молекул поділюваних речовин, наприклад, під час застосування молекулярних сит (цеолітів);

5) осадова хроматографія – розділення засновано на утворенні різного за розчинністю осаду поділюваних речовин з сорбентом;

б) адсорбційно-комплексуюча хроматографія – розділення полягає в утворенні координаційних сполук різної міцності у фазі або на поверхні адсорбенту.

Слід мати на увазі, що дуже часто процес поділу перебуває за декількома механізмами.

За застосовуваною технікою:

1) колонкова хроматографія – розділення речовин проводиться у спеціальних колонках;

2) площинна хроматографія:

а) паперова – поділ речовин проводиться на спеціальному папері;

б) тонкошарова – поділ речовин проводиться в тонкому шарі сорбенту.

У колонковій і тонкошаровій хроматографії можна використовувати будь-який з наведених вище механізмів поділу, у паперовій хроматографії найчастіше застосовують розподільний і іонообмінний механізми.

За способом відносного переміщення фаз розрізняють фронтальну, або елюентну, і витіснювальну хроматографію.

Фронтальний метод. Це найпростіший за методикою варіант хроматографії. Він полягає в тому, що через колонку з адсорбентом безперервно пропускають аналізовану суміш, наприклад, компонентів A_i у розчиннику $Solv$. У розчині, що витікає з колонки, визначають концентрацію кожного компонента і будують графік у координатах концентрація речовини – обсяг розчину, що пройшов через колонку. Цю залежність зазвичай і називають *хроматограмою* або *вихідною кривою*.

Внаслідок сорбції речовин A_i в спочатку з колонки витікатиме розчинник $Solv$, а потім розчинник і менш сорбційний компонент A , потім і компонент B і, таким чином, через деякий час склад розчину під час проходження через колонку мінятися не буде. Метод застосовують, наприклад, для очищення розчину від домішок, якщо вони сорбуються істотно краще, ніж основний компонент, або для виділення із суміші найслабше сорбційної речовини.

Проявляючий (елюентний) метод. Під час роботи за цим методом у колонку вводять порцію аналізованої суміші, що містить компоненти A_i у розчиннику $Solv$, і колонку безперервно промивають газом-носієм або розчинником $Solv$. При цьому компоненти аналізованої суміші

поділяють на *зони*: добре сорбційна речовина займає верхню частину колонки, а менш сорбційний компонент А займатиме нижню частину.

У газі або розчині, що витікає з колонки, спочатку з'являється компонент А, далі – чистий розчинник, а потім компонент В.

Що більша концентрація компонента, то вище пік і більше його площа, яка становить основу кількісного хроматографічного аналізу. Проявляючий метод дає можливість розділяти складні суміші, він найбільш часто застосовується в практиці. Недоліком методу є зменшення концентрації вихідних розчинів через розведення розчинником або газом-носієм.

Витіснювальний метод. У цьому методі аналізовану суміш компонентів А і В у розчиннику Solv вводять у колонку і промивають розчином речовини D (витіснювач), який сорбується краще, ніж будь-який з компонентів аналізованої суміші.

Концентрація розчину за хроматографування не зменшується, на відміну від проявляючого методу. Істотним недоліком витіснювального методу є можливе накладення зони однієї речовини на зону іншої, оскільки зони компонентів у цьому методі не розділені зоною розчинника.

У хроматографії найчастіше використовують методику проявляючого (елюентного) аналізу, в цьому випадку спостерігається пік у координатах концентрація – об'єм називають *хроматографічним піком* і характеризують висотою, шириною і площею.

В аналітичній практиці широко використовують метод газорідкої хроматографії (ГРХ). Це пов'язано з надзвичайною різноманітністю рідких нерухомих фаз, що полегшує вибір селективної для цього аналізу фази. Для забезпечення селективності колонки важливо правильно вибрати нерухому рідку фазу. Ця фаза має бути хорошим розчинником для компонентів суміші (якщо розчинність мала, компоненти виходять з колонки дуже швидко), нелетючою (щоб не випаровувалася за робочої температури колонки), хімічно інертною, має володіти невеликою в'язкістю (інакше сповільнюється процес дифузії) і за нанесення на носій утворювати рівномірну плівку, міцно з ним пов'язану. Роздільна здатність нерухомої фази для компонентів цієї проби має бути максимальною.

Носії нерухомих рідких фаз. Тверді носії для диспергування нерухомої рідкої фази у вигляді однорідної тонкої плівки мають бути механічно міцними з помірною питомою поверхнею (близько $20 \text{ м}^2/\text{г}$), невеликим і однаковим розміром часток, а також бути досить інертними, щоб адсорбція на поверхні розділу твердої і газоподібної фаз була мінімальною. Найслабша адсорбція спостерігається на носіях із силанізованого хромосорбата, скляних гранул і флуоропака (фторвуглецевий полімер). Крім того, тверді носії не мають реагувати на підвищення температури і мають легко змочуватися рідкою фазою. У газовій хроматографії хелатів як твердий носій частіше

використовують силанізовані діатомітові носії – діамітовий кремнезем, або кизельгур.

Газорідинна хроматографія (ГРХ) – один з найсучасніших методів багатокомпонентного аналізу. Його відмінні риси – експресність, висока точність, чутливість, можливість автоматизації. Метод дозволяє вирішити багато аналітичних проблем. Кількісний ГРХ аналіз можна розглядати як самостійний аналітичний метод, більш ефективний за поділу речовин, що відносять до одного і того самого класу.

Рідинно-рідинна хроматографія за суттю близька до газо-рідинної. На твердий носій також наносять плівку рідкої фази, і через колонку, наповнену таким сорбентом, пропускають рідкий розчин. Цей вид хроматографії називають рідинно-рідинною розподільчою хроматографією. Рідину, нанесену на носій, називають нерухомою рідкою фазою, а розчинник, що пересувається через носій, – рухомою рідкою фазою. Рідинно-рідинна хроматографія проводиться в колонці (стовпчиковий варіант) або на папері (паперова хроматографія, хроматографія на папері).

Поділ суміші речовин у рідинно-рідинній хроматографії ґрунтуються на відмінності коефіцієнтів розподілу речовини між незмішувальними між собою розчинниками. Коефіцієнт розподілу речовини дорівнює:

$$K_{п/н} = c_{п} / c_{н},$$

де $c_{п}$ і $c_{н}$ – концентрація речовини в рухомій і нерухомій фазах.

Для членів одного гомологічного ряду встановлені деякі закономірності у величинах $K_{п/н}$. Відома, наприклад, залежність $K_{п/н}$ у цьому гомологічному ряду від числа атомів вуглецю.

Пошук незмішувальних фаз, що забезпечують поділ, зазвичай проводиться емпірично на основі експериментальних даних. Широке застосування в рідинно-рідинній хроматографії отримали потрібні системи, що складаються з двох розчинників, які змішуються, і третього, розчинного в обох фазах. Такі системи дозволяють отримувати набір змішаних фаз різної селективності. Як приклад можна привести систему незмішувальних між собою гептана і води, в яку введено етанол, що розчиняється в обох розчинниках.

Хоча як рухому і нерухому фазу вибирають розчинники, які не змішуються між собою, все ж у багатьох системах спостерігається деяка взаємна розчинність. Щоб запобігти процесам взаємного розчинення рідин у ході хроматографії, рухливу фазу попередньо насичують нерухомою. Для збереження постійного складу фаз застосовують також метод хімічного закріплення нерухомої фази на сорбенті. При цьому використовують взаємодію розчинника з групами ОН на поверхні носія. Адсорбенти із закріпленою на їх поверхні рідкою фазою випускаються промисловістю.

Ефективність колонки пов'язана з в'язкістю, коефіцієнтом дифузії та іншими фізичними властивостями рідин. Носій нерухомої фази повинен мати

досить розвинену поверхню, бути хімічно інертним, міцно утримувати на своїй поверхні рідку фазу і не розчинятися в розчинниках, які використовуються. Як носії використовують речовини різної хімічної природи: гідрофільні носії – силікагель, целюлоза та інші гідрофобні – фторопласт, тефлонт, інші полімери.

https://www.chem-astu.ru/chair/study/anchem/r_1_2.htm

2.6. Принципи молекулярної діагностики

/Л. Іщенко, В. Ушкалов, Л. Виговська/

2.6.1. Теоретичні основи методів молекулярної діагностики

Молекулярно-біологічні методи дослідження відіграють велику роль у сучасній медицині та ветеринарії, криміналістиці, біології. Завдяки досягненням в області вивчення ДНК і РНК, людина здатна вивчити геном організму, визначити збудника захворювання, розпізнати потрібну нуклеїнову кислоту у суміші кислот і т. інше. Цей метод є найбільш достовірним методом дослідження спадкових захворювань. Перевага ДНК-діагностування порівняно із іншими методами молекулярної генетики людини у тому, що цей метод дозволяє виявити та дослідити саме першопричину захворювання (ген, його локалізацію, тип ушкоджень).

Цей метод дозволяє виявити навіть мінімальні порушення первинної структури ДНК (в тому числі одонуклеотидні заміни), які неможливо дослідити іншими методами. ДНК-діагностування є малоінвазивною процедурою (достатньо 1-2 мл крові, букального епітелію, або навіть декількох клітин матеріалу).

В даний час у практичну систему контролю якості продукції АПК, як інструмент досліджень на молекулярному рівні, активно впроваджується технологія ампліфікації фрагментів ДНК – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Метод заснований на багатократному вибіркового копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів у штучних умовах (*invitro*). При цьому відбувається копіювання лише тієї ділянки, яка задовольняє заданим умовам, і лише в тому випадку, якщо вона присутня в досліджуваному зразку. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) піднесла діагностування інфекційних захворювань на якісно новий рівень.

Основні положення ПЛР сформульовані в 1983 р. американським біохіміком К. Мюллісом, за що йому у 1993 р. було присуджено Нобелівську премію в області хімії. Варто зазначити, що розробці методу ПЛР передувало виявлення у воді гейзерів мікроорганізмів *Thermusaquaticus* та виділення з них ферменту ДНК-полімерази, що зберігає свою біологічну активність за високих температур (72–80 °C).

Відкриття нового методу одразу знайшло застосування і в 1985 році Saiki R.K із співавтором опублікували статтю, у якій було описано ампліфікацію геномної послідовності *b*-глобіну. З цього моменту кількість публікацій, у яких автори повідомляли про застосування ПЛР у своїх роботах, стала збільшуватися в геометричній прогресії. Метод став настільки популярним, що сьогодні уже важко уявити дослідження в молекулярній біології без його використання. Сфера застосування ПЛР надзвичайно різноманітна, а використання її для виявлення збудників інфекційних захворювань започаткувало новий напрям – «ДНК-діагностика» як у гуманній медицині, так і у ветеринарії.

Основний принцип ПЛР – експоненціальне збільшення кількості копій ділянки вихідної ДНК за допомогою ферментів *in vitro*. При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка фланкується праймерами, і лише в тому випадку, якщо вона присутня в досліджуваному зразку.

Основними компонентами полімеразної ланцюгової реакції є:

1. Праймери – пара штучно синтезованих олігонуклеотидів, що мають, як правило, розмір від 15 до 30 п. н., які комплементарні ділянці ДНК-мішені, яка аналізується. Правильно підібрані праймери забезпечують високу специфічність і чутливість тест-системи.

2. Таq-ДНК-полімераза – термостабільний фермент, що забезпечує добудовування 3'-кінця протилежного ланцюга ДНК згідно з принципом комплементарності.

3. Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицітозинтрифосфат (дЦТФ) і дезокситимідинтрифосфат (дТТФ) – «будівельний матеріал», який використовується Таq-ДНК-полімеразою для синтезу другого ланцюга ДНК.

4. Буфер – суміш катіонів та аніонів у певній концентрації, що забезпечують оптимальні умови для реакції, а також стабільне значення рН. Також до складу буфера входять іони магнію хлориду, які необхідні для роботи Таq-полімерази.

5. ДНК-матриця – підготовлений до внесення в реакційну суміш сумарний препарат нуклеїнової кислоти, що може містити ділянку ДНК, яка буде мішенню для подальшого багаторазового копіювання (наприклад, ДНК мікроорганізмів). За відсутності ДНК-мішені специфічний продукт ампліфікації не утворюється.

Кожний цикл ПЛР складається із трьох стадій. На першій стадії дволанцюгова ДНК-матриця денатурується за 94 °С з утворенням одностанцюгових ДНК. На другій стадії температура знижується до 55–65 °С і відбувається приєднання (гібридизація) праймерів до кожної з двох одностанцюгових ДНК. На третій стадії за температури 72 °С відбувається елонгація (видовження) ланцюгів ДНК з допомогою ферменту ДНК-полімерази, яка добудовує обидва праймери в напрямі від 3'- до 5'-кінця, внаслідок чого утворюється дві дволанцюгових ДНК. Така послідовність процесів дозволяє за

25–40 циклів накопичити ПЛР-продукт у достатній кількості для візуалізації (рис. 1).

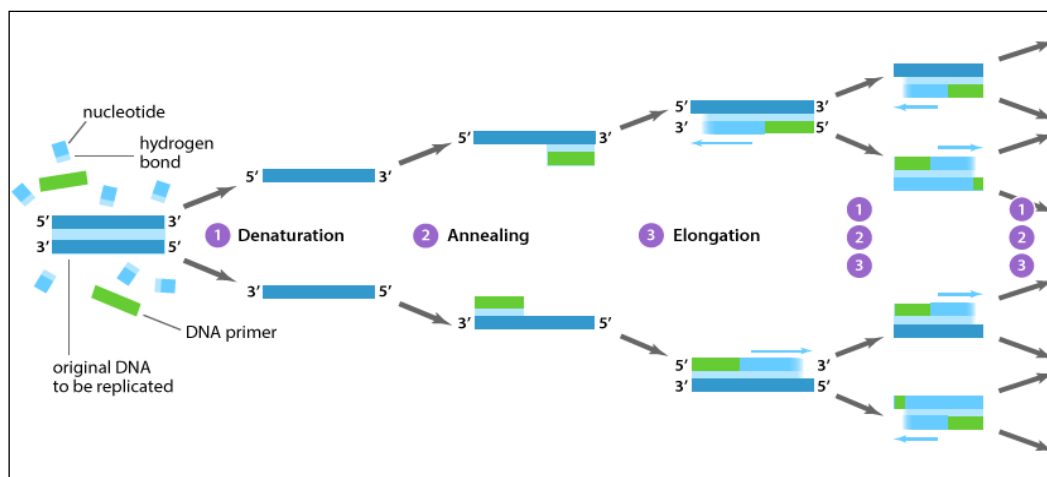


Рис. 1. Принцип полімеразної ланцюгової реакції

https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php

Інтерпретація результатів аналізу може відбуватися шляхом розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі, або на моніторі комп'ютера за використання флуоресцентних зондів.

Слід зауважити, що процес накопичення специфічних продуктів ампліфікації за геометричною прогресією йде лише певний час, а потім його ефективність критично падає. Це пов'язано з так званим ефектом «плато».

Термін «ефект плато» використовують для опису процесу накопичення продуктів ампліфікації на останніх циклах ПЛР. Залежно від умов і кількості циклів реакції ампліфікації, на період досягнення ефекту «плато» впливають такі чинники:

- утилізація субстратів (дНТФ і праймерів);
- стабільність окремих реагентів реакційного середовища (дНТФ і ферменту);
- кількість інгібіторів, зокрема пірофосфати і ДНК-дуплекси;
- утворення праймерів-димерів;
- неповна денатурація ДНК-мішені за високої концентрації продуктів ампліфікації.

Що менша початкова концентрація ДНК-мішені, то вище ризик виходу реакції на «плато». Цей момент триває до того часу, поки кількість специфічних продуктів ампліфікації буде достатньо, щоб їх можна було проаналізувати.

Сьогодні є багато модифікацій полімеразної ланцюгової реакції:

1. *PCR-RFLP* (*PCR-RestrictionFragmentLengthPolymorphism*, ПЛР-ПДРФ – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів). Спочатку проводять ПЛР, а потім – рестрикцію отриманого ПЛР-продукту.

2. *Real-time PCR* (ПЛР у реальному часі). Спостерігають за реакцією в реальному часі, безпосередньо вимірюючи накопичення продукту ПЛР у кожному циклі. Принциповою особливістю методу ПЛР у режимі реального часу, на відміну від класичної ПЛР, є можливість кількісного визначення ДНК/РНК в досліджуваному матеріалі, відсутність стадії електрофорезу, менш суворі вимоги до організації ПЛР-лабораторії та автоматична реєстрація і інтерпретація отриманих результатів.

3. *RT-PCR* (*ReverseTranscription PCR*) – ПЛР з використанням зворотної транскрипції). Вихідним продуктом є РНК, на якій за допомогою ферменту зворотної транскриптази отримують ДНК, з якою вже і проводять ПЛР. Це зручно, наприклад, для того, щоб виявити саме експресію окремих генів.

4. *Nested PCR* (гніздова ПЛР). Застосовується для зменшення частки побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. За допомогою другої пари праймерів ампліфікують ділянку ДНК усередині продукту першої реакції.

5. *Inverse PCR* (інвертована ПЛР). Використовується в тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка всередині потрібної послідовності. Цей метод особливо корисний, коли потрібно визначити фланкуючі послідовності після вставки ДНК у геном. Для здійснення інвертованої ПЛР проводять низку розрізів ДНК рестриктазами з подальшим лігуванням. Як результат відомі фрагменти утворюють на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити звичайну ПЛР.

6. *Asymmetric PCR* (асиметрична ПЛР). Проводиться тоді, коли потрібно ампліфікувати переважно один із ланцюгів початкової ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридизаційного аналізу. ПЛР проводять за класичним сценарієм, за винятком того, що один із праймерів береться у великому надлишку.

7. *Long-range PCR* (ПЛР довгих фрагментів). Використовується для ампліфікації довгих ділянок ДНК (10 kbp і більше). Використовують дві полімерази, одна з яких – Таq-полімераза з високою процесивністю (тобто полімераза, яка здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга – ДНК полімераза з 3'-5'-ендонуклеазною активністю. Друга полімераза необхідна для того, щоб коригувати помилки, внесені першою.

8. *Multiplex PCR* (мультиплексна ПЛР). Використовують декілька пар праймерів і одночасно ампліфікують кілька фрагментів.

Одним із основних завдань під час використання методу ПЛР для вирішення конкретного завдання є правильний дизайн праймерів (у випадку використання ПЛР в реальному часі і флуоресцентного зонда).

Праймеримають задовольняти такі вимоги:

1. Праймеримають бути специфічні. Особливу увагу приділяють 3'-кінцям праймерів, оскільки саме із них Taq-ДНК-полімераза починає добудовувати комплементарний ланцюг ДНК. Якщо їх специфічність недостатня, то існує висока ймовірність синтезу неспецифічних продуктів ампліфікації (коротких або довгих фрагментів). На електрофореограмі це можна побачити у вигляді тяжких або легких додаткових смуг. Це іноді заважає інтерпритуванню результатів ампліфікації. Окрім того, частина праймерів і дНТФ витрачається на синтез неспецифічної ДНК, що призводить до значної втрати чутливості.

2. Праймери не мають утворювати димери і петлі, тобто не має утворюватися стійких подвійних ланцюгів як результат відпалювання праймерів самих на себе або один з одним.

Для роботи з конструювання праймерів та із нуклеотидними послідовностями використовують різноманітні онлайн-ресурси, а також комп'ютерні програми. Найбільш відомими є такі, як:

- Дизайн праймерів та флуоресцентних зондів для полімеразної ланцюгової реакції <https://bitesizebio.com/18992/a-primer-for-designing-degenerate-primers/>, http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi, <https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/genefisher2>.

- Дизайн праймерів та флуоресцентних зондів для полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі Primer Express v.2.0 <http://www.appliedbiosystems.com/support/apptech>.

- Віртуальне тестування та симуляція полімеразної ланцюгової реакції <http://engels.genetics.wisc.edu/amplify>.

- Пошук та вирівнювання нуклеотидних послідовностей BLAST <http://www.ncbi.nih.gov>.

- Для множинного вирівнювання нуклеотидних та амінокислотних послідовностей використовують <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>.

- Для філогенетичного аналізу та побудови філограм використовують <http://www.phylogeny.fr/version2 CGI/index.cgi>.

- Для аналізу отриманих нуклеотидних послідовностей найчастіше використовують комп'ютерну програму (ChromasLite 2.1.1).

2.6.2. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

Одним із різновидів ПЛР, що найчастіше використовують у діагностичних лабораторіях, є ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ). Для проведення даного типу ПЛР, окрім стандартних компонентів (ПЛР-буфер, магнію хлорид, дезоксинуклеотидтрифосфати, ДНК-полімераза, прямий і зворотній праймери), використовують нуклеотидну послідовність, комплементарну ділянці ДНК, яка фланкується праймерами, позначену флуоресцентною позначкою (флуоресцентний зонд). Використання флуоресцентних зондів забезпечує

безперервний моніторинг флуоресцентного сигналу на екрані комп'ютера. Перевагою такої модифікації ПЛР є зменшення ризику контамінації, оскільки немає потреби в проведенні розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі. Крім того, під час використання ПЛР-РЧ можна проводити детекцію двох і більше нуклеотидних послідовностей в одній пробірці (мультиплексний аналіз) та кількісно оцінювати результати дослідження.

У ході проведення ПЛР в реальному часі ампліфікатор реєструє величини флуоресценції і за допомогою програмного забезпечення на моніторі комп'ютера будують криві ампліфікації. Основним критерієм оцінювання отриманих результатів є визначення граничного циклу *Ct* (*cyclethreshold*), що характеризує певний цикл полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, на якому спостерігається статистично достовірне збільшення флуоресценції порівняно із фоновим рівнем (рис. 2).

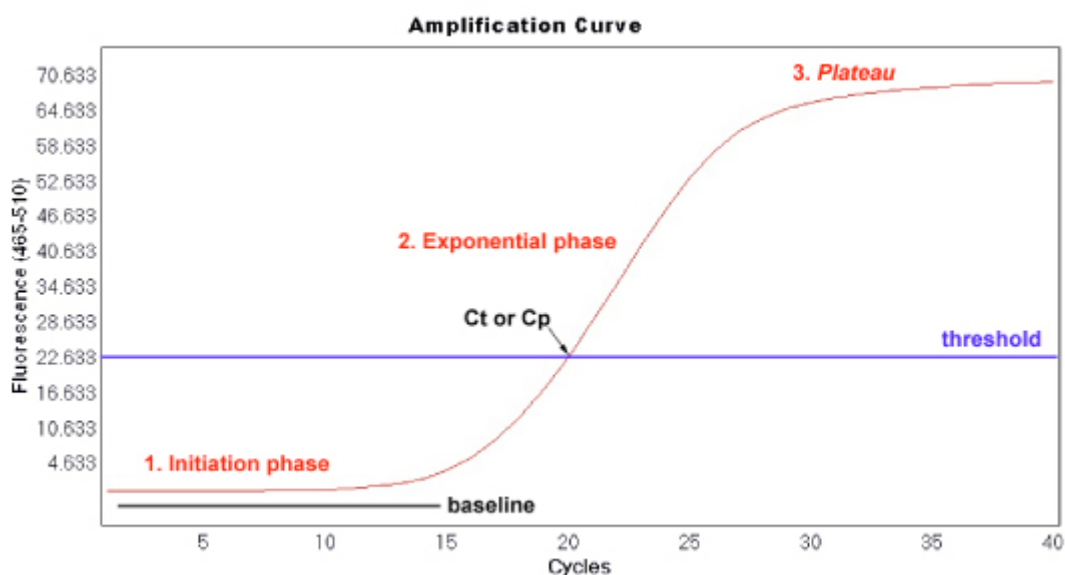


Рис.2. Схематичне зображення кінетичної кривої ампліфікації ПЛР у реальному часі

<https://www.highveld.com/pcr/real-time-pcr-quantification-analysis.html>.

Для виявлення продуктів ампліфікації в режимі реального часу застосовують різноманітні технології, які різняться способом генерації флуоресценції.

Найбільш широко використовують такі модифікації:

TaqMan. В основі цієї модифікації лежить використання олігонуклеотидних зондів, які позначені на 5'-кінці флуоресцентним барвником, а на 3'-кінці гасником флуоресценції. Такі зонди комплементарні ампліфікуючій ділянці. Гасник поглинає випромінювання, що випускає флуоресцентна позначка за умови інтактності зонда. На стадії елонгації Taq-ДНК-полімераза синтезує

комплементарний ланцюг ДНК і, дійшовши до ділянки гібридизованої із зондом, починає розщеплювати зонд за рахунок 5'-екзонуклеазної активності. У результаті цього флуоресцентна мітка відокремлюється від гасника і її випромінювання може бути зафіксоване фотооптичною системою приладу (рис. 3).

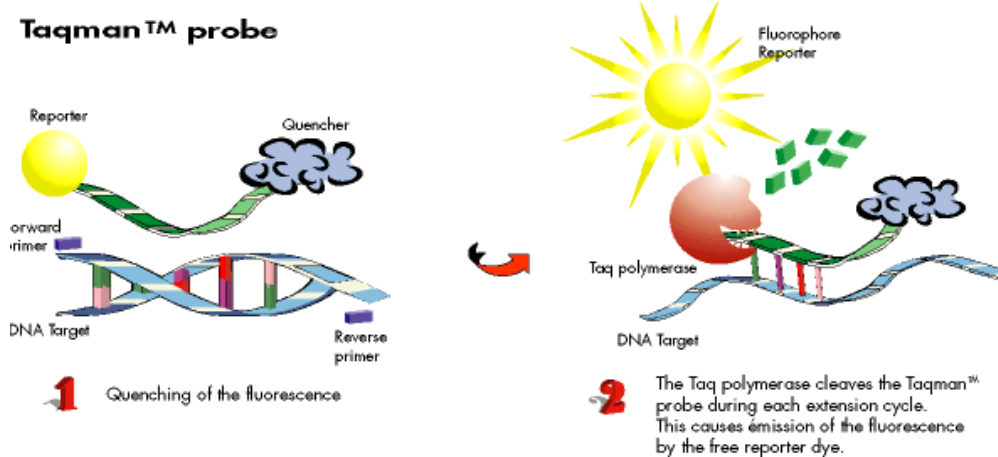


Рис. 3. Принцип дії TaqMan-зондів

<http://www.biogene.com/ApplicationNotes/Amplification/Methodology/Chemistries.htm>

Molecular Beacons (молекулярні маячки). Відрізняються від TaqMan тим, що кінці проби, на яких знаходяться відповідно флуоресцентна мітка і гасник флуоресценції комплементарні один одному. За умов відпалювання праймерів, вони з'єднуються і утворюють структуру у вигляді шпильки (*stem-loop*), де зона компліментарності зонду з матрицею знаходиться в петлі. В даному випадку гасник поглинає випромінювання барвника. При гібридизації проби з матрицею вторинна структура руйнується, флуоресцентна мітка і гасник розходяться на відстань, за якої гасник вже не поглинає випромінювання барвника, й флуоресцентний сигнал може бути зафіксований (рис. 4).

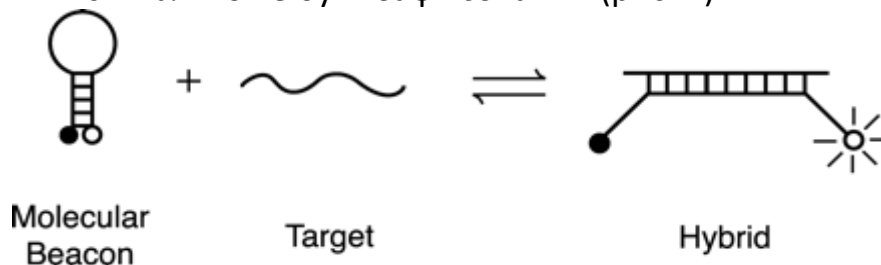


Рис. 4. Принцип дії молекулярних маячків

<https://www.pnas.org/content/96/11/6394>

FRET (Fluorescenceresonanceenergytransfer, резонансне перенесення енергії флуоресценції). В цій модифікації використовують два зонди, які мічені флуоресцентними мітками. Принцип методу полягає в перенесенні енергії від

одного флуорофору, який знаходиться на 3' кінці першої проби, до іншого, який розташований на 5' кінці другої проби, у випадку, коли відстань між ними становить 1-3 нуклеотиди. За одночасного зв'язування обох зондів з ДНК матрицею випромінювання від першого флуорофору передається на другий, а його випромінювання детектується приладом (рис. 5).

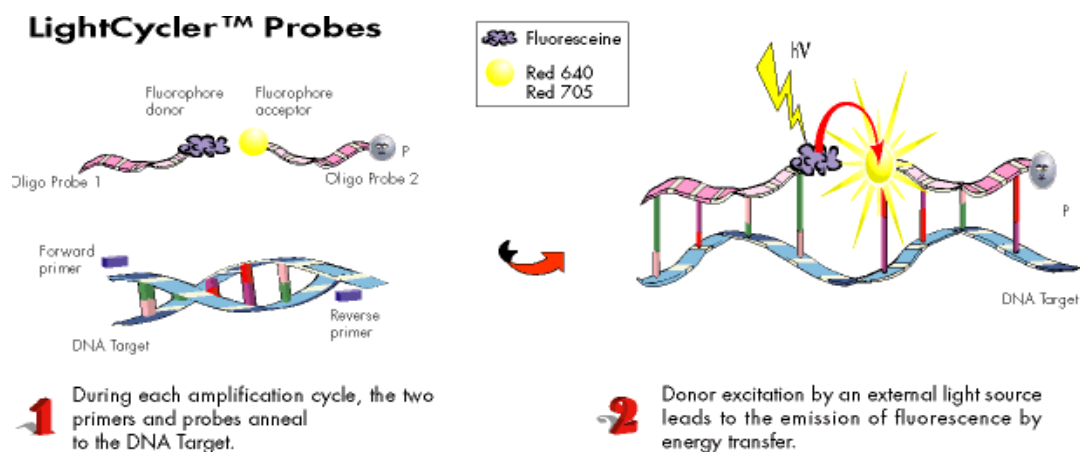


Рис. 5. Принцип дії FRET

http://www.biogene.com/ApplicationNotes/Analysis/Application/Hybridisation_Probes.htm

Спектральні характеристики основних флуоресцентних барвників, які використовують за синтезу зондів для ПЛР у реальному часі представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Спектральні характеристики флуоресцентних барвників та гасників флуоресценції

Характеристика	FAM	JOE	ROX	BHQ1
Поглинання, λ_{max}	492 нм	520 нм	580 нм	534 нм
Флуоресценція, λ_{max}	520 нм	548 нм	605 нм	немає
Квантовий вихід	~ 0,8	0,75	~ 0,8	немає

Організація роботи в діагностичних ПЛР-лабораторіях

Вимоги до кімнат

Належна організація ПЛР-лабораторії має принципове значення для отримання достовірних результатів дослідження. Принцип організації лабораторії залежить від способу детекції продуктів ампліфікації. Можна виокремити два принципово різних способів отримання результатів дослідження під час проведення ПЛР. Одним із них є розділення продуктів

ампліфікації в агарозному гелі, а інший отримання результатів дослідження на моніторі комп'ютера у вигляді кривих ампліфікації під час проведення ПЛР у режимі реального часу.

Загалом у ПЛР-лабораторії мають бути створені окремі робочі кімнати для кожної стадії ПЛР-дослідження.

1. *Кімната прийому, реєстрації та первинної обробки зразків*, яка призначена для реєстрації зразків їх тимчасового зберігання та підготовки для виділення ДНК (гомогенізація). Зазначену кімнату має бути розміщено в окремому приміщенні і оснащено ламінарною шафою (II-III клас захисту залежно від ступеня патогенності досліджуваних об'єктів).

2. *Кімнату екстракції нуклеїнових кислот* призначено для виділення нуклеїнових кислот з досліджуваного матеріалу, який пройшов обробку в попередній зоні, а також зберігання зразків ДНК. Зразки нуклеїнових кислот та реактиви для їх виділення мають зберігатися в окремих холодильниках.

3. *Кімната приготування реакційних сумішей* призначена для збирання компонентів суміші для проведення ПЛР (у випадку використання готових комерційних наборів ця кімната може бути відсутня). Таку зону можна організувати, використовуючи окремий ПЛР-бокс. Однак за наявності в лабораторії вільних приміщень така кімната є бажаною.

3. *Кімната для проведення ПЛР* призначена для проведення ПЛР-аналізу і детекції результатів у режимі реального часу. У цій кімнаті розміщують ампліфікатори для проведення ПЛР в реальному часі та / або класичної ПЛР.

4. *Кімната для проведення розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі (електрофорезна)* призначена для візуалізації результатів дослідження під час проведення класичної ПЛР. Ця зона є найбільш небезпечною щодо контамінації продуктами ампліфікації та отримання хибнопозитивних результатів дослідження. Кімнату для проведення електрофорезу розміщують якомога далі від основних кімнат.

Усі кімнати ПЛР-лабораторії повинні мати передбоксове приміщення, в якому персонал переодягається спецодяг.

Загальне планування ПЛР-лабораторії, розміщення в ній робочих кімнат має забезпечувати рух досліджуваних зразків в одному напрямку.

Усі кімнати відповідно до їх функціонального навантаження мають бути оснащені комплектом необхідного обладнання, реактивів і витратних матеріалів.

Екстракцію нуклеїнових кислот необхідно проводити в ПЛР-боксах (або боксах біологічної безпеки – ламінарних шафах II класу захисту). У разі великого навантаження рекомендується збільшити кількість боксів.

Підлогу в ПЛР-лабораторії покривають кафелем, який не має бути слизьким, а стіни та стелі – масляною фарбою, стійкою до дії мийних і дезінфекційних засобів. В усіх приміщеннях установлюють бактерицидні лампи з розрахунку 2 Вт/м³. Для захисту робочих столів від прямих сонячних променів

використовують світлозахисні плівки із матеріалу, стійкого до дезінфекційних засобів. Лабораторні меблі повинні мати покриття, стійке до дії мийних і дезінфекційних засобів, при цьому поверхня столів не повинна мати тріщин і швів. Використання жалюзів не рекомендується через накоплення на них пилу.

ПЛР-лабораторія має бути забезпечена системою проточно-втяжної вентиляції з поданням повітря через фільтри, згідно з чинними санітарно-епідеміологічними вимогами.

У ПЛР-лабораторії мають бути також такі допоміжні приміщення:

1) кабінет завідувача лабораторії;

2) кімната персоналу;

3) туалет;

4) підсобні (складські) приміщення;

5) кімната, в якій зберігають автоклав для знезараження дослідного матеріалу.

Приміщення ПЛР-лабораторії мають бути непроникні для гризунів і комах, а бути також забезпечені засобами пожежогасіння.

Вимоги до лабораторного обладнання

Кожну кімнату ПЛР-лабораторії має бути забезпечено відповідним набором лабораторного обладнання, зважаючи на її функціональне навантаження, а також залежно від методик, які використовуються.

Не допускається перенесення приладів, автоматичних піпет-дозаторів тощо з однієї кімнати в іншу.

Обладнання, яке використовують у лабораторії має бути технічно справним, мати технічний паспорт, а також робочу інструкцію.

Засоби вимірювання, зокрема автоматичні пікет-дозатори, термометри, мірний посуд мають бути калібровані у відповідних установах з метрологічного контролю.

Для запобігання перехресній контамінації і появи хибнопозитивних результатів необхідно контролювати зміну наконечників після кожної маніпуляції, використовувати одноразові мікропробірки із щільними накривками, використовувати твердотільні термостати під час виділення нуклеїнових кислот з біологічного матеріалу.

Відбір зразків та підготовка їх для дослідження

Відбір зразків проводять відповідно до нормативних документів, методичних рекомендацій, настанов чи інших документів де зазначено основні вимоги до відбору того чи іншого матеріалу. Однак у більшості випадків такі документи передбачають правила відбору скеровані на формування *репрезентативного зразка* для дослідження того чи іншого показника. Основною вимогою під час відбору зразків для молекулярно-генетичних досліджень є уникнення їх перехресної контамінації. Відбирають зразки в гумових рукавичках, використовуючи за можливості одноразові інструменти

(забір біологічного матеріалу). У випадку використання багаторазового інструментарію його обробляють мийними засобами та ретельно висушують під час переходу від проби до проби. Проби відбирають в чистий скляний або пластиковий посуд, також можна використовувати одноразові пластикові пакети.

Підготовка зразків для аналізу передбачає гомогенізацію зразка для кращої екстракції нуклеїнових кислот. Залежно від типу зразків це може бути перемелювання на лабораторному млинку або блендері, розтирання у ступці. Окремі зразки не потребують попередньої підготовки (кров, сеча, змиви).

Екстракція дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК)

Існує багато різних підходів для екстракції ДНК. Найбільш часто використовують такі методи, як сорбція ДНК на оксиді кремнію, екстракція ДНК за допомогою магнітних часточок, екстракція ДНК на колонках. Для виділення ДНК із рослин також часто використовують СТАВ-метод екстракції ДНК.

Екстракція ДНК за допомогою сорбції на оксиді кремнію за R. Voort

Обладнання та витратний матеріал

1. Ламінарний бокс.
2. Мікроцентрифуга 13–14 тис. об/хв.
3. Центрифуга-вортекс.
4. Твердотільний термостат для пробірок типу «Епендорф» на 25–100 °С.
5. Набір автоматичних дозаторів перемінного об'єму.
6. Наконечники пластикові одноразові універсальні з фільтром 200 мкл.
7. Наконечники пластикові одноразові універсальні з фільтром 10 мкл.
8. Наконечники пластикові одноразові універсальні з фільтром 1000 мкл.
9. Пластикові одноразові мікропробірки типу Eppendorf 1,5 мл.
10. Пластикові штативи для мікропробірок.
11. Ємкість для використаного пластику.
12. Одноразові гумові рукавички без тальку.
13. Штативи для мікропробірок 1,5 мл.
14. Реагенти для екстракції ДНК:
 - лізуючий розчин (гуанідинтіоціонат, 0,1 М Трис-НСІ (рН 6,4), 0,2М Na-ЕДТА (рН 8,0), 1 % Тритон X-100);
 - сорбент ДНК (оксид кремнію);
 - розчин для відмивання 1 (бгуанідинтіоціонат, 0,1 М Трис-НСІ (рН 6,4));
 - розчин для відмивання 2 (70 % етанол, 10 мМТрис-НСІ, (рН 7,5));
 - буфер для елюції ТЕ-буфер (10 мМТрис-НСІ (рН 7,5), 2 мМNa-ЕДТА).

Виконання роботи

1. Лізуючий розчин та відмивальний розчин 1 (якщо їх зберігали за 2–8 °С) прогрівають за 65 °С до повного розчинення кристалів).
2. Встановлюють у штатив необхідну кількість одноразових пробірок з розрахунку одна пробірка на кожен досліджуваний зразок та маркують їх.

3. Пробірку із сорбентом струшують на вортексі до повного ресуспендування.

4. В усі пробірки додають 300 мклізуючого розчину, 25 мкл сорбенту та 100 мкл досліджуваних зразків, ретельно перемішують пробірки на вортексі та прогривають у термостаті за $(65 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ протягом 5 хвилин.

5. Пробірки струшують на вортексі і витримують за кімнатної температури протягом 5хвилин до повного осадження сорбенту, після чого центрифугують 30 секунд за $10 \times 10^3\text{g}$. Надосадову рідину обережно видаляють, так, щоб не зачепити осадсорбенту (зручно використовувати вакуумний насос з колбою-пасткою для рідини, що відбирається).

6. У кожну пробірку додають по 300 мклрозчину для відмивання 1, ресуспендують на вортексі та осаджують центрифугуванням 30 секунд за $10 \times 10^3\text{g}$, надосадову рідину обережно видаляють.

7. Додають у кожну пробірку по 500 мклрозчину для відмивання 2, ресуспендують на вортексі та осаджують центрифугуванням 30 секунд за $10 \times 10^3\text{g}$., надосадову рідину обережно видаляють та повторюють процедуру промивання розчином для відмивання 2.

8. Осад сорбенту висушують у термостаті за $(65 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ протягом 5–7хвилин до повного випарювання рідини.

9. У кожну пробірку із сорбентом додають по 50 мкл буфера для елюції (TE-буфер), ретельно ресуспендують та поміщають у термостат за $(65 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ протягом 5–6 хвилин, проводячи струшування на вортексі через кожну хвилину.

10. Осаджують сорбент на мікроцентрифузі протягом 1 хвилини за $10 \times 10^3\text{g}$. Надосадова рідина містить очищену ДНК зразків, яку використовують для подальших досліджень.

Екстракція рибонуклеїнової кислоти (РНК)

Для екстракції РНК використовують також різні підходи, наприклад сорбція РНК на оксиді кремнію, екстракція РНК за допомогою магнітних часточок, фенол-хлороформна екстракція тощо.

Обладнання та витратний матеріал

1. Ламінарний бокс.
2. Мікроцентрифуга 13–14 тис. об/хв.
3. Центрифуга-вортекс.
4. Твердотільний термостат для пробірок типу «Епендорф» на 25–100 °С.
5. Набір автоматичних дозаторів перемінного об'єму.
6. Наконечники пластикові одноразові універсальні з фільтром 200 мкл.
7. Наконечники пластикові одноразові універсальні з фільтром 10 мкл.
8. Наконечники пластикові одноразові універсальні з фільтром 1000 мкл.
9. Пластикові одноразові мікропробірки типу Eppendorf 1,5 мл.
10. Пластикові штативи для мікропробірок.
11. Ємкість для використаного пластику.

12. Одноразові гумові рукавички без тальку.

13. Штативи для мікропробірок 1,5 мл.

14 Реагенти для екстракції ДНК:

- розчин для зв'язування РНК (гуанідінтіоціонат, 0,35 М Трис-НСІ (рН 6,4), 0,2 М Na-ЕДТА (рН 8,0), 3 % Тритон X-100, 6 % MgCl₂);
- сорбент ДНК (оксид кремнію);
- розчин для відмивання 1 (гуанідінтіоціонат, 0,1 М Трис-НСІ (рН 6,4));
- розчин для відмивання 2 (70 % етанол, 10 мМТрис-НСІ, (рН 7,5));
- буфер для елюції ТЕ-буфер (10 мМТрис-НСІ (рН 7,5), 2 мМNa ЕДТА).

Виконання роботи

1. Розчин для зв'язування РНК та розчин для відмивання 1 (якщо їх зберігали за 2–8 °С) прогріти за 65 °С до повного розчинення кристалів.

2. Встановлюють в штатив необхідну кількість одноразових пробірок з розрахунку одна пробірка на кожен досліджуваний зразок та маркують їх.

3. Пробірку із сорбентом струшують на вортексі до повного ресуспендування.

4. В усі пробірки додають 300 мкл розчину для зв'язування РНК, 25 мкл сорбенту та 100 мкл досліджуваних зразків, ретельно перемішують пробірки на вортексі та прогрівають у термостаті за $(65 \pm 0,5)$ °С протягом 5 хвилин.

5. Пробірки струшують на вортексі і витримують за кімнатної температури протягом 5 хвилин до повного осадження сорбенту, після чого центрифугують 30 секунд при $10 \times 10^3 g$. Надосадову рідину обережно видаляють, так, щоб не зачепити осад сорбенту (зручно використовувати вакуумний насос з колбою-пасткою для рідини, що відбирається).

6. У кожну пробірку додають по 300 мкл відмивального розчину 1, ресуспендують на вортексі та осаджують центрифугуванням 30 секунд за $10 \times 10^3 g$., надосадову рідину обережно видаляють.

7. Додають у кожну пробірку по 500 мкл розчину для відмивання 2, ресуспендують на вортексі та осаджують центрифугуванням 30 секунд за $10 \times 10^3 g$., надосадову рідину обережно видаляють та повторюють процедуру промивання розчином для відмивки 2.

8. Осад сорбенту висушують у термостаті за $(65 \pm 0,5)$ °С протягом 5–7 хвилин до повного випарювання рідини.

9. У кожну пробірку із сорбентом додають по 50 мкл буфера для елюції (ТЕ-буфер), ретельно ресуспендують та поміщають у термостат за $(65 \pm 0,5)$ °С протягом 5–6 хвилин, проводячи струшування на вортексі через кожну хвилину.

10. Осаджують сорбент на мікроцентрифузі протягом 1 хвилини за $10 \times 10^3 g$. Надосадова рідина містить очищену РНК зразків, яку використовують для подальших досліджень.

Зворотна транскрипція

Зворотна транскрипція – це процес синтезу кДНК з використанням РНК як матриці. Називається так, тому що в більшості живих організмів транскрипція відбувається в іншому напрямку, а саме з молекули ДНК синтезується РНК-транскрипт. Процес зворотної транскрипції забезпечується спеціальним ферментом – зворотною транскриптазою (ревертазою). За допомогою ревертази спочатку до матриці РНК комплементарно приєднуються дезоксирибонуклеозидтрифосфати і синтезується один ланцюг ДНК. При цьому утворюється гібридна об'єднана молекула РНК–ДНК. Потім фермент РНКаза Н видаляє рибонуклеотидний ланцюг із гібридної молекули, а на ланцюзі ДНК комплементарно за наявності ферменту ДНК-полімерази здійснюється синтез другого ланцюга ДНК.

Для проведення зворотної транскрипції використовують комерційні набори.

Проведення ПЛР у режимі реального часу (на прикладі визначення 35S-промотора в сої)

35S-промотор є одним із регуляторів експресії трансгенних вставок під час створення ГМ-рослин і використовують його для скринінгу під час дослідження зразків на ГМО. Як правило для контролю виділення ДНК для кожної рослини використовується детекція ділянки специфічного ендогенного гена. Так, для сої як ендогенний контроль найчастіше використовують ген, що кодує лектин (Iec).

Матеріал для дослідження: зразки ДНК бобів чи листя сої; контрольні зразки ДНК.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд

1. Система ПЛР у реальному часі (ABiPrism 7 000 (AppliedBiosystems), Rotor-Gene (CorbettResearch), Q-Cycler (Bio-Rad) CFX 96 (Bio-Rad) або подібні.
2. ПЛР-бокс з УФ-лампю.
3. Центрифуга-вортекс.
4. Холодильник з температурою 2–8 °С і морозильною камерою – 20 °С.
5. Набір автоматичних дозаторів змінного об'єму.
6. Одноразові наконечники з аерозольним бар'єром.
7. Оптичні 8-ми лункові стріпи на 0,2 мл.
8. 96-ти лункова термopідставка для мікропробірок.
9. Одноразові поліпропіленові пробірки місткістю 1,5 мл³ типу «Еппендорф».
10. Набір реагентів для детекції 35S-промотору та лектину сої:
 - ПЛР-суміш (ПЛР-буфер (без MgCl₂); розчин MgCl₂ молярної концентрації 2,5 ммоль; суміш дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (дНТФ), молярної концентрації 2,5 ммоль кожного; по 5 пмоль праймерів для детекції 35S-промотору та лектину сої, по 2,5 пмоль флуоресцентного зонда для детекції 35S-промотору (позначений флуоресцентним барвником FAM) та лектину сої

(позначений флуоресцентним барвником JOE), деіонізована вода;

- Таq ДНК-полімераза;
- Урацил–ДНК-глікозилаза.

Хід роботи

Перед початком аналізу готують (або розморожують) ПЛР-суміш. Готують реакційну суміш для досліджуваних зразків з розрахунку 19,7 мкл ПЛР-суміші, 0,2 мкл розчину Таq ДНК-полімерази і 0,1 мкл урацил-ДНК-глікозилази на один зразок. Приготовлену суміш ретельно перемішують на центрифусі-вортекс.

Відбирають необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл, додають у кожну лунку по 20,0 мкл отриманої ПЛР-суміші і по 5,0 мкл зразків ДНК, які досліджуються.

Для запобігання отримання хибно позитивних та хибно негативних результатів дослідження за проведення ПЛР у реальному часі використовують такий контроль:

- 1) позитивний;
- 2) негативний;
- 3) контроль без матриці (NTC, not template control);
- 4) негативний контроль виділення (НКВ).

У лунки, які призначені для позитивного і негативного контролю, вносять по 5,0 мкл, відповідно, реактиву «Позитивний контроль» і «Негативний контроль» (надаються для контролю правильності проведення ПЛР у реальному часі), для NTC контролю – 5,0 мкл деіонізованої води, а для НКВ контролю – 5,0 мкл НКВ, який отриманий під час виділення ДНК.

Дослідження проводять згідно з «Інструкцією з експлуатації» до конкретної системи ПЛР у реальному часі.

Температурний профіль ампліфікації задають згідно з даними, наведеними в табл. 2.

Таблица 2

Температурний протокол ампліфікації

Стадія	Режим ампліфікації		Процес	Кількість циклів
	Температура, °C	Час, хв		
1	50	2,0	Активація урацил–ДНК–глікозилази	1
2	94	9,0	Активація полімерази	1
3	95	0,2	Денатурація ДНК	45
	60	1,0	Відпалювання праймерів*	
	72	0,3	Елонгація ланцюга ДНК	

Примітка: * – стадія, на якій здійснюється збір даних флуоресценції

Для інтерпретації результатів якісного визначення вмісту ГМО проводять аналіз кривих ампліфікації досліджуваних зразків та контролів:

1. Зразок вважається позитивним, якщо спостерігається ампліфікація за флуоресцентними барвниками FAM (35S-промотор) та JOE (лектин сої) (рис. 6).

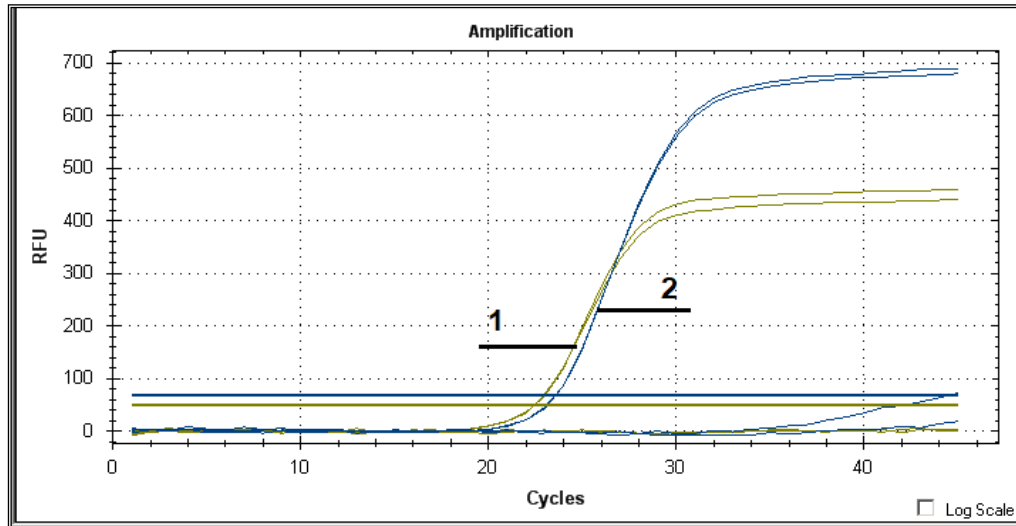


Рис. 6. Приклад зразка сої, в якому виявлено ГМО:
1 – криві ампліфікації лектину сої, 2 – криві ампліфікації 35S-промотору,
RFU – відносні одиниці флуоресценції

2. Зразок вважається негативним, якщо присутня ампліфікація лектину сої (барвник JOE) зі значенням Ct 23–24 (граничний цикл полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, що характеризує певний цикл ПЛР, за якого флуоресцентний сигнал перевищує певне базове значення) та відсутня ампліфікація 35S-промотору (рис. 7).

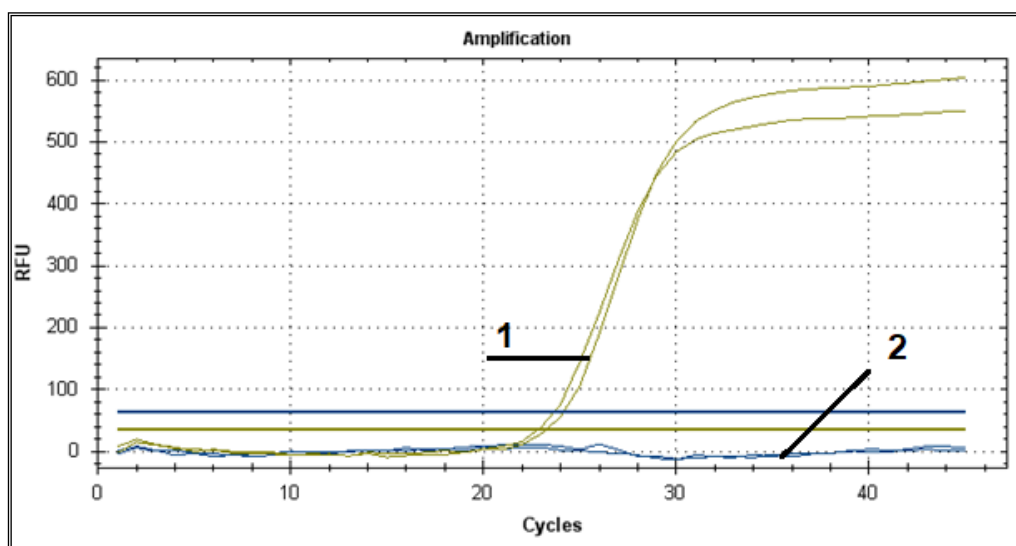


Рис. 7. Приклад зразка сої, в якому виявлено ГМО:
1 – криві ампліфікації лектину сої, 2 – криві ампліфікації 35S-промотору,
RFU – відносні одиниці флуоресценції

3. У позитивному контрольному зразку має відбуватися ампліфікація за барвниками FAM (35S-промотор) та JOE (лектин сої);

4. У негативному контрольному зразку має відбуватися ампліфікація тільки за барвником JOE (лектин сої);

5. У контролях NTC і НКВ ампліфікація за жодним із барвників відсутня.

Результати аналізу не враховують:

- за відсутності ампліфікації за барвником JOE у зразка, що випробовується;

- за відсутності ампліфікації за барвником FAM або JOE у позитивного контролю;

- за наявності ампліфікації за барвником FAM у негативного контролю;

- за наявності ампліфікації за барвником FAM або JOE у NTC і / або НКВ контролях;

- за великої розбіжності значення C_t у паралельних вимірюваннях ($SD > 0,5$).

Горизонтальний електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному гелі

Реактиви та обладнання

1. Камера для горизонтального електрофорезу.

2. Джерело постійної струму.

3. Набір автоматичних дозаторів перемінного об'єму.

4. Наконечники пластикові одноразові універсальні з фільтром на 200 мкл.

5. Трансілюмінатор для візуалізації продуктів розділення.

6. Агароза.

7. Трис-боратний буфер (ТБЕ-буфер).

8. Етидію бромід.

9. Маркер молекулярних мас.

Приготування агарозного гелю

Для приготування гелю відповідну наважку агарози, наприклад «TopVision» (Fermentas, Литва) розплавляють у трис-боратному буфері (ТБЕ) в мікрохвильовій пічці. Після повного розплавлення агарози у суміш додають інтеркалюючий барвник етидію бромід до кінцевої концентрації (2 мг/л), добре перемішують і охолоджують до температури 50–60 °С. Гель заливають у спеціальну форму (товщина гелю 5–6 мм) та поміщають гребінку для формування лунок. Після повного затвердіння гелю (30 хв за кімнатної температури) обережно виймають гребінку, не руйнуючи лунки.

Хід роботи

Готовий гель переносять у камеру для електрофорезу таким чином, щоб лунки були повернені у бік негативного електрода (анода). ДНК із лунок рухається

убік до позитивного електрода (катода). Наливають приготовлений ТБЕ буфер, щоб він зверху покрив гель на 4–5 мм. Зразки із продуктами ампліфікації перемішують із 6X буфером для завантаження та обережно вносять на дно лунки. Паралельно із зразками вносять маркер довжини фрагментів ДНК. Під'єднують камеру до джерела струму, дотримуючи полярності. Негативно заряджена ДНК починає рухатися в гелі від мінуса до плюса. При цьому більш короткі молекули ДНК рухаються швидше, ніж довгі.

На швидкість руху ДНК в агарозному гелі впливає концентрація агарози, напруга електричного поля, температура тощо. Всі молекули одного розміру рухаються з однаковою швидкістю.

Електрофорез проводять у градієнті напруги 10 В/см до того моменту, як блакитний барвник (ксиленціанол) пройде приблизно 1,0 см від лунок гелю. Після закінчення електрофорезу гель переносять на транслюмінатор та переглядають розташування смуг ДНК під ультрафіолетовим випромінюванням. Після закінчення електрофоретичного розділення буфер і гелі, що містять етідію бромід, дезактивують.

2.7.Паразитологічні аналізи/А. Соболта, В. Стибель/

2.7.1. Діагностування гельмінтозів та протозоозів у фекаліях тварин. Підбір розчинів та процедура проведення

Лабораторний аналіз фекалій надає розширену інформацію про наявність найпростіших, гельмінтів та їх фрагментів.

Залежно від мети, діагностування гельмінтозів та протозоозів проводять з науково-дослідними або профілактичними цілями, для встановлення екстенсивності й інтенсивності інвазії, а також для диференціації збудників. Застосовують якісні (встановлення видового складу паразитичних гельмінтів) та кількісні методи дослідження, за допомогою яких оцінюють інтенсивність інвазії (слабка, середня, сильна), а також ефективність проведених дегельмінтизацій.

Зажиттєве діагностування ґрунтується на вивченні епізоотологічних даних (зональні особливості хвороби, видовий склад збудників, порода і вік тварин, пора року, джерело інвазії), клінічних ознак хвороби та результатів лабораторних досліджень. Виявити паразитів можна у різних системах організму. Біологічним матеріалом для досліджень на наявність гельмінтів, їх фрагментів, личинок і яєць, а також цист найпростіших служать фекалії, сеча, дуоденальний вміст, жовч, мокрота, ректальний і перианальний слиз, кров, м'язова тканина. Найчастіше об'єктом дослідження є фекалії, у яких можна виявити статевозрілих гельмінтів, яйця, личинки або цисти, що паразитують у шлунково-кишковому тракті та органах дихання. Також кліщів, яких заковтують тварини. Гельмінтокопроскопічні дослідження поділяють на гельмінтоскопічні (виявлення статевозрілих гельмінтів або їх фрагментів), гельмінтоовоскопічні

(від лат. ovum– яйце) і гельмінтоларвоскопічні (від лат. larva– личинка), під час яких знаходять яйця або личинки паразитичних червів. Більшість гельмінтів та найпростіших схожі за морфологічними ознаками, виділяють подібні яйця (стронгілідного типу), ооцисти, і це ускладнює ідентифікацію. Обстеження фекалій, також може показати стан травлення, а саме неперетравлені м'язові волокна, краплі жиру, крохмаль тощо.

Правильність відбору проб

Для досліджень рукою в гумовій рукавичці беруть 4–10 г фекалій з прямої кишки або з підлоги, якщо вони свіжі і відомо, якій тварині належать. Від свиней, телят, овець, кіз фекалії слід брати середнім і вказівним пальцями в напальчниках. У кролів фекалії (кілька кульок) отримують натисканням на черевну стінку в ділянці прямої кишки. Від птахів, хутрових звірів, м'ясоїдних тварин, диких хижаків (у зоопарках) фекалії збирають з підлоги кліток (групові проби). Індивідуально – має бути кілька грамів фекалій, що забезпечить належну ідентифікацію зразка від тварини. Фекалії мають бути свіжими (до 2 годин), їх також можна зберігати в холодильнику в поліетиленових пакетах.

Перед проведенням методів зразок слід оглянути. Звертають увагу на його загальний вигляд; послідовність, колір, а також наявність крові або слизу, що може свідчити про специфічні паразитарні інфекції.

Флотація

Флотаційні методи ґрунтуються на принципі використання флотаційних розчинів, у яких більш висока щільність, аніж у паразитів. Ці методи відносно недорогі для виконання.

Підбір розчинів та методи

Для виготовлення флотаційних розчинів можна використовувати багато різних речовин. Що вище питома вага флотаційного розчину, то більший різновид яєць гельмінтів і цист найпростіших можна виявляти. Діапазон флотаційної рідини коливається від 1,18 до 1,3. У флотаційних методах широко використовують сольові розчини сульфату цинку, насичений розчин хлориду натрію, сульфату магнію тощо.

Розчин сульфату цинку 33 % ($ZnSO_4$, питома вага 1,18):

1. Розчиняємо 330 г сульфату цинку з водою до об'єму 1000 мл.
2. Перевіряємо питому вагу за допомогою ареометра.

Насичений розчин хлориду натрію ($NaCl$, питома вага 1,2) або магнію сульфату ($MgSO_4$, питома вага 1,32):

1. Додаємо сіль до теплої водопровідної води, доки вона не розчиниться і надлишок осяде на дно. Для гарантії насиченості розчину його слід залишити на ніч за кімнатної температури.
2. Перевіряємо питому вагу за допомогою ареометра.

Розчин цукру (питома вага 1.2–1.25):

1. Розчиняємо 454 г гранульованого цукру в 355 мл води, перемішуємо.
 2. Після того, як цукор розчиниться, додаємо 6 мл формальдегіду для запобігання росту мікроорганізмів (або 30 мл 10% формаліну до об'єму води 330 мл).
 3. Перевіряємо питому вагу за допомогою ареометра.
- В основному принципи флотації однакові.

Метод Фюллеборна

У склянку вносять 5 г фекалій і, помішуючи скляною або дерев'яною паличкою, додають насичений розчин кухонної солі (сульфату магнію, гіпосульфату натрію, сульфату цинку). Суспензію фекалій фільтрують крізь металеве сито і відстоюють упродовж 40–50 хв. Яйця з легкою питоною вагою спливають. Металевою петлею декілька крапель поверхневого шару переносять на предметне скло і досліджують під мікроскопом.

Модифікований тест Мак Мастера

1. Для жуйних тварин необхідно розмішати 4 г фекалій з 56 мл флотаційного розчину, щоб отримати загальну кількість в об'ємі 60 мл. Тест можна також проводити з 2 г фекалій і 28 мл флотаційного розчину (за наявності невеликої кількості фекалій). Добре перемішати і процідити через марлю або ситечко. Суміш не має бути сильно насиченою.

2. Фільтруючою піпеткою перенести матеріал в лічильну камеру і заповнити кожен комірок камери Мак Мастера. Має бути заповнено всю камеру, а не тільки ділянку під сіткою.

3. Зачекати 5 хвилин і досліджувати під мікроскопом. Яйця та ооцисти різних видів паразитів слід підраховувати окремо. У деяких випадках яйця можуть бути ідентифіковані до роду або до видів (наприклад, *Strongyloides*, *Trichuris* і *Nematodirus*), тоді як інші мають вважатися категорією паразитів (кокцидій, яйця).

Щоб визначити кількість яєць в одному грамі фекалій, треба додати їх кількість в обох камерах і помножити на 200. Однак, оскільки в тесті було використано всього 4 г калу, результат треба розділити на 4.

Центрифугування

Центрифугування є дещо ефективнішим за стандартні флотаційні методи, незалежно від розчину флотаційної рідини:

1. Змішуємо 3–5 г (близько 1 чайної ложки) фекалій з невеликою кількістю флотаційного розчину в папері або в пластиковому стакані. Котячі фекалії та дрібні гранули жуйних тварин можна подрібнити ступкою або витримати у воді до м'якого стану. Якщо проба містить велику кількість жиру або слизу, спочатку її промивають водою.

2. Проціджуємо суміш фекалій та флотаційного розчину через подвійний шар марлі, або ситечко.

3. Виливаємо суміш у 15-мл пробірку і центрифугуємо протягом 5 хвилин за 500–650 об/хв, надосадову рідину слід відціджуємо, осад ресуспендуємо флотаційним розчином, і повторюємо у 3 етапи.

4. Після центрифугування витягуємо пробірку з центрифуги і поміщаємо в стійку. Доливаємо флотаційний розчин до меніска і кладемо покривне скельце, чекаємо 5–10 хвилин, поміщаємо на предметне скло і досліджуємо.

Седиментація

Методи седиментації використовують під час діагностування гельмінтозів, збудники яких виділяють яйця з великою щільністю (трематоде, акантоцефал і деяких інших плоских гельмінтів та нематод). Вони більш трудомісткі, ніж методи флотації, що пов'язано зі складністю відмивання яєць гельмінтів в осаді досліджуваної суміші.

Метод послідовного промивання

Невелику кількість фекалій (5–10 г) розмішують у склянці з 10-кратною кількістю води. Суміш фільтрують крізь металеве сито або марлю і дають їй відстоятися упродовж 5 хв. Потім верхній шар рідини зливають, знову добавляють таку саму кількість води і відстоюють 5 хв. Так промивають декілька разів, доки поверхневий шар рідини не буде прозорим. Після прояснення верхнього шару рідини в склянці його зливають, а осад наносять на предметне скло для мікроскопії. За бажання можна додати одну краплю 0,1 % метиленового синього, який забарвлює фон у синій колір, але не фарбує яйця фасціол, які виділятимуть жовтувато-коричневим кольором.

Центрифужно-седиментаційний метод

1. Змішуємо 1 г фекалій з 10 мл 10 % формаліну або води. Заливаємо суміш в 15-мл скляну пробірку для центрифуги (з кришкою) до трьох чвертей.

2. Додаємо етил ацетат, поки трубка майже заповниться.

3. Закупорюємо і струшуємо пробірку приблизно 50 разів.

4. Центрифугуємо протягом 3–5 хвилин за 500 об/хв.

5. Після центрифугування має утворитися три шари:

(1) верхній шар буде містити етил ацетат, жир і сміття;

(2) середній шар буде містити формалін або воду;

(3) нижній шар осаду – дрібнодисперсні тверді частинки. Видаляємо супернатант, залишаємо тільки осад.

6. Ресуспендуємо осад у кілька крапель води або формаліну, поміщаємо одну або дві краплі на предметне скло, накриваємо і досліджуємо зі збільшенням $\times 10$.

Гельмінтоларвоскопія

Гельмінтоларвоскопічні методи застосовують для виявлення личинок паразитичних гельмінтів у фекаліях (диктіокаульоз), молоці (стронгілоїдоз, неоаскароз), виділеннях з очей (телязіоз), шкірі (онхоцеркоз). Вони диференціюються за розміром, будовою та формою.

Метод Бермана використовують для діагностування диктіокаульозу, протостронгілідозів та інших нематодозів тварин. Для дослідження проб фекалій за цим методом використовують апарат, що складається з лійки, гумової трубки завдовжки 10–15 см, сполученої верхнім кінцем з лійкою, та затискача, закріпленого на нижньому кінці гумової трубки. Пробу фекалій (10 г) загортають у марлю і поміщають у лійку. Попередньо лійку заливають теплою водою (35–38 °С). Апарат з пробою фекалій від овець і кіз залишають у спокої за кімнатної температури на 3–5 год, від великої рогатої худоби – на 12 год, від коней – на 8–12 год. За цей час личинки гельмінтів виходять із проби фекалій у воду і опускають гумовою трубкою до перекриття її затискачем. Потім затискач на трубці послаблюють, а рідину, що втікає, збирають у пробірку і центрифугують 2–3 хв за 1500 об./хв. Після цього верхній шар рідини зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії. Личинки гельмінтів рухливі і добре виявляються у рідині.

Метод Вайда використовують для діагностування легеневих гельмінтозів дрібних жуйних тварин. На предметне або годинникове скло кладуть декілька кульок фекалій тварин і додають невелику кількість води за температури 40°С. Через 40 хв. фекалії видалають і проводять мікроскопію рідини, що залишилася на склі. Ефективність методу не перевищує 70 %.

2.7.2. Додаткові методи досліджень для ідентифікації специфічних паразитарних інвазій

Прямий мазок використовують для виявлення протозойних трофозоїтів (лямблій, трихомонад, амеб та ін.) або інших елементів, які погано спливають або легко спотворюються розчинами флотації. Якість цього методу є низькою через малу кількість матеріалу.

Процедура проведення:

1. Змішати невелику кількість фекалій з краплею сольового розчину на предметному склі, щоб можна було читати газетний шрифт.
2. Накрити покривним склом і досліджувати за збільшення x 10 та x 40.
3. Основною характеристикою розпізнавання трофозоїтів є рух. Можна додати краплю розчину Люголя, який зафарбує внутрішні структури цист. Можна використовувати декілька крапель.

2.7.3. Диференційне діагностування псевдопаразитів

Проби фекалій можуть містити оманливих «псевдопаразитів» і «неправдивих паразитів». Досить часто зустрічаються фрагменти, які нагадують форми яєць, ооцист; до них відносять пилкові зерна, рослинні волоски, зерно, кліщі, спори цвілі та різноманітні нешкідливі рослинні та тваринні сміття. «Неправдиві паразити» – це яйця гельмінтів або цисти найпростіших, яких

знаходять у фекаліях, а належати вони можуть іншому внаслідок копрофагії або хижацтва. Один з найкращих способів уникнути помилок в оцінюванні проб фекалій – це провести оцінку різноманітних паразитів, які зазвичай заражають тварин.

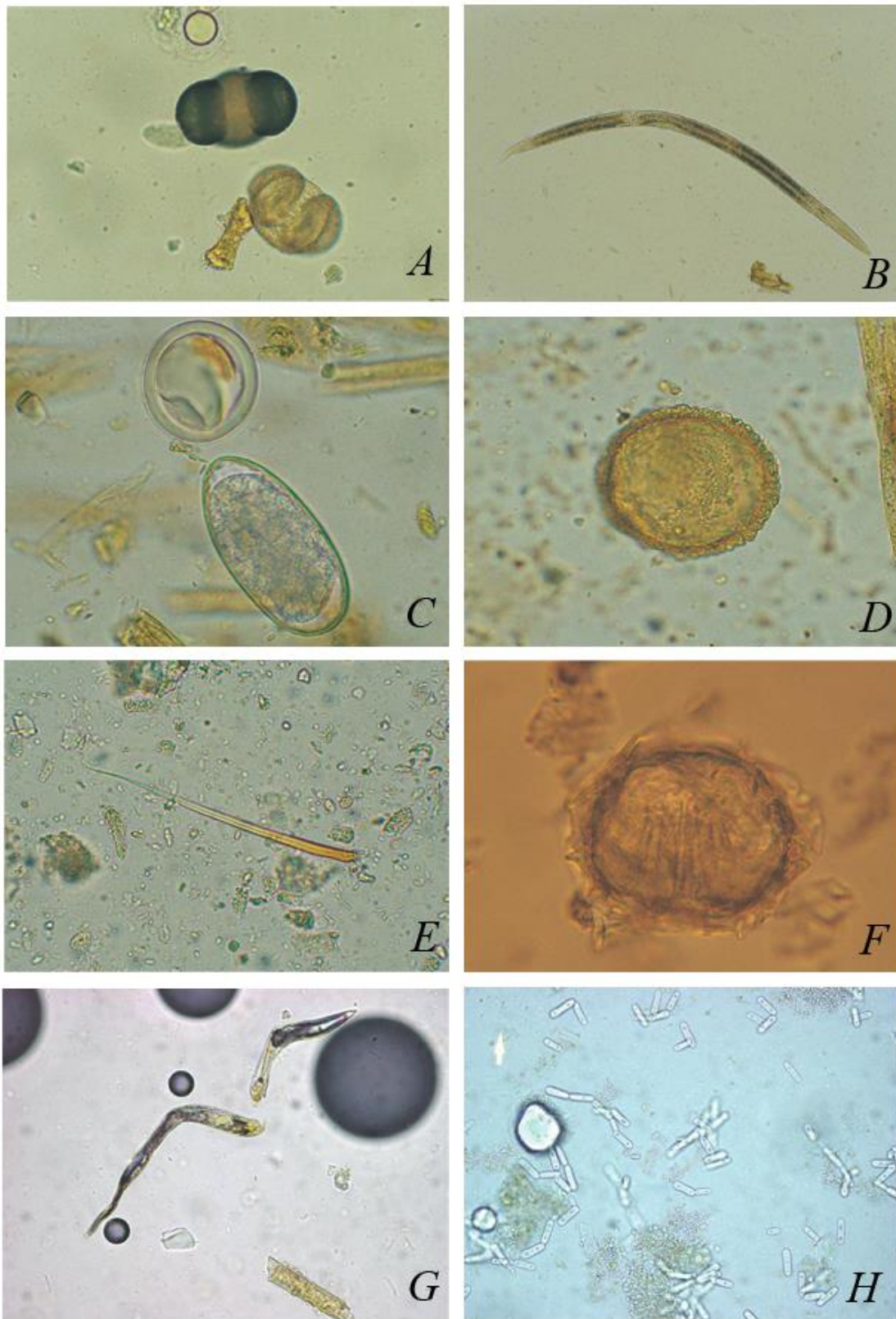


Рис. 1. Приклади псевдопаразитів

На рис. 1. зображено приклади псевдопаразитів:

(А) – Сосновий пилок є звичайним псевдопаразитом, знайденим у пробах фекалій багатьох тварин (x 400).

(В) – Дорослі вільноживучі нематоди, зустрічаються у пробах фекалій, зібраних зі землі.

(С) – Яйце у пробах фекалій вівці та псевдопаразит (позначений стрілкою). Характерними для розпізнавання псевдопаразитів є відсутність чіткої внутрішньої структури і розривів у зовнішньому шарі.

(D) – Пилкове зерно (x 400).

(E) Волос комах з фекалій комахоїдного птаха.

(F) – Артефакт у фекаліях жуйних має структури, що нагадують гачки ембріона плоского гельмінта, але відмінного ембріона немає, а зовнішній шар погано визначений (x 40).

(G) – Рослинні волоски та інші волокнисті матеріали, що можуть нагадувати личинок нематод. Вони можуть бути присутніми в різних формах і кольорах, але зазвичай можуть бути легко диференційовані від нематод, оскільки їм не вистачає чіткої внутрішньої структури, такої як травний тракт.

(H)– *Saccharomycesguttulatus*– непатогенні дріжджі у фекаліях кролів і спостерігали іноді у собак (x 400).

На рис. 2. зображено приклади псевдопаразитів:

(А) – Вільноживучі кліщі, які забруднюють корми для тварин. На відміну від багатьох паразитичних кліщів, вільноживучі види не мають спеціалізованих структур на ногах (присоски, гребінці тощо).

(В) – Яйця з вільноживучих кліщів. Як правило, дуже великі (>100 мкм). Розвинені ноги кліща всередині яйця (стрілка).

(С) – Неправдиві паразити: яйце цип'яка знайдене у пробі фекалій від теляти. Хоча конфігурація гачків усередині цього яйця чітко ідентифікує його як цип'як, це, швидше за все, яйце від гризуна або птаха.

(D) – Неправдиві паразити поширені в пробах від собак, як копрофаги. Яйця жуйних і кроликів виглядають, як собачі, але більші.

(E) – Неправдиві паразити: велика циста *Monocystis*, найпростіший паразит земляних черв'яків, знайдений у фекаліях змії (x 100).

(F) – Ооцисти *Eimeriaspp.* (стрілка) є типовим неправдивим паразитом у фекаліях собак. На цій фотографії також міститься окрема ооциста *Monocystis* (M), звільнена від великої цисти (x 400).

(Взято у Zajac A. Veterinary clinical parasitology / Anne M. Zajac, Gary A. Conboy. 8th ed. American Association of Veterinary Parasitologists:Wiley-Blackwell, 2012.P. 19–23).

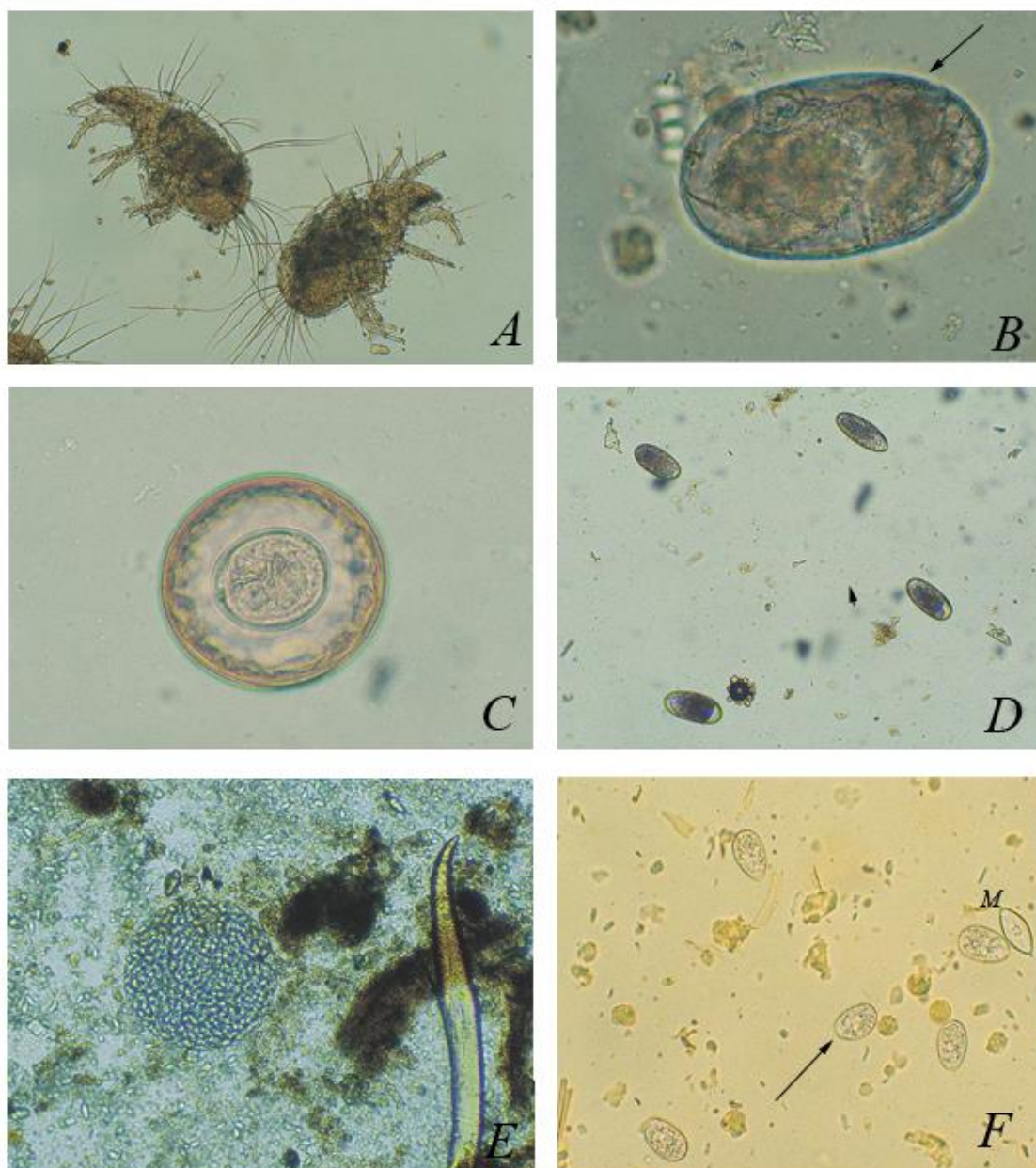


Рис. 2. Приклади псевдопаразитів

Література

1. Атлас гельмінтів тварин / І. С. Дахно, А. В. Березовський, В. Ф. Галат [та ін.]. Київ : Ветінформ, 2001. 118 с.
2. Глобальна паразитологія: підручник / В. Ф. Галат, А. В. Березовський, Н. М. Сорока[та ін.] ; за ред. В. Ф. Галата. Київ : ДІА, 2014. 568 с.
3. Паразитологія та інвазійні хвороби тварин: підручник / В. Ф. Галат, А. В. Березовський, Н. М. Сорока[та ін.] ; за ред. В. Ф. Галата. 2-ге вид., перероб. та доповн. Київ : Урожай, 2009. 368 с.
4. Сварчевський О. А., Секретарюк К. В., Тафійчук Р. І. Гельмінтологічні дослідження тварин і навколишнього середовища у ветеринарній медицині. Львів :Сполом, 2005. 110 с.

5. Секретарюк К. В., Сварчевський О. А. Основи екологічної зоопаразитології. Львів, 2007. 358 с.
6. Соболта А. Г. Методи діагностики ендopаразитів у свиней і птиці: методична розробка для лабораторних занять. Львів: ЛНУВМ та БТ імені С. З. Гжицького, 2014. 25 с.
7. Юськів І. Д. Методи діагностики ендopаразитів у собак, котів, кролів, гризунів і рептилій: методична розробка для лабораторних занять. Львів: ЛНУВМ та БТ імені С. З. Гжицького, 2014. 28 с.
8. Zajac A. Veterinary clinical parasitology / Anne M. Zajac, Gary A. Conboy. 8th ed. American Association of Veterinary Parasitologists: Wiley-Blackwell, 2012. 354 p.

2.8. Гігієна і безпека в біологічних лабораторіях

/О. Хіцька, Н. Богатко, Н. Вовкотруб/

2.8.1. Принципи біологічної безпеки в лабораторіях

Біозахист – це практичне застосування принципів і методів забезпечення біологічної безпеки, які дозволяють захистити працівників від впливу, пов'язаного з роботою, що виконується в лабораторії.

Біобезпека – забезпечення заходів безпеки для зменшення ризику втрати, розкрадання або застосування мікробіологічних агентів або токсинів з метою диверсії, що може призвести до неналежного або злочинного використання того чи іншого агента як біологічна зброя, наприклад для біотероризму. Лабораторна біобезпека описує принципи ізолювання, технології і методи, що використовуються для запобігання ненавмисному впливу патогенів і токсинів, або їх випадковому поширенню.

В основі практики біобезпеки лежить оцінювання та управління біологічними ризиками.

За допомогою оцінювання біологічного ризику, яке виконується як складова програми з біобезпеки, можна отримати інформацію про використовувані мікроорганізми і штами, їх фізичне перебування; персонал, якому необхідний доступ до патогену чи токсину.

Чинники, які слід враховувати під час оцінювання біологічного ризику:

1. Патогенність агента і інфекційну дозу.
2. Потенційні наслідки інфікування.
3. Природні шляхи передачі інфекції.
4. Інші шляхи інфікування, спричинені маніпуляціями в лабораторних умовах (парентеральний, повітряно-крапельний, з прийманням їжі).
5. Стабільність агента в навколишньому середовищі.
6. Концентрація агента і обсяг матеріалів, які передбачається використовувати в роботі.

7. Наявність відповідного «господаря» агента (людини або тварин).

8. Доступна інформація, отримана під час дослідів на тваринах, звіти про лабораторне інфікування або клінічні звіти.

9. Планова лабораторна діяльність (обробка ультразвуком, центрифугування тощо).

10. Будь-які генетичні маніпуляції з організмом, які можуть розширити ряд «господарів» агента або змінити його чутливість до відомих і ефективних схем лікування.

11. Наявність на місцях ефективних профілактичних і терапевтичних заходів втручання.

На основі інформації, виявленої під час оцінювання ризиків, встановлюють необхідний рівень біобезпеки запланованої роботи, обирають відповідні індивідуальні засоби захисту, розробляють стандартний порядок дій, метою яких є забезпечення найбільш безпечного проведення лабораторних робіт.

Управління біологічними ризиками передбачає:

- зниження ризику ненавмисного впливу патогенів і токсинів або їх випадкового витоку (біобезпека), і зниження ризику несанкціонованого доступу, втрати, крадіжки, використання не за призначенням, диверсій або умисного витоку біологічних матеріалів до допустимих, прийнятних рівнів (лабораторний біозахист);

- надання внутрішніх і зовнішніх гарантій (у межах закладу, району розташування, уряду, світового співтовариства тощо) щодо прийняття і ефективної реалізації відповідних заходів;

- забезпечення основи для безперервного підвищення рівня обізнаності з біобезпеки, лабораторного біозахисту, дотримання етичного кодексу поведінки та підготовки кадрів у рамках підприємства.

Однією з цілей підходу управління біологічними ризиками є розвиток всебічної культури лабораторних біобезпеки і біозахисту, що дозволяє біобезпеці і біозахисту стати частинами повсякденної лабораторної діяльності, покращуючи таким чином загальний рівень умов праці і очікуваний рівень управління лабораторіями.

2.8.2. Гігієнічні вимоги до приміщень лабораторій. Правила безпеки роботи на обладнанні

Для безпечного проведення лабораторних процедур у приміщенні необхідно забезпечити: достатність простору; стіни, стеля – гладенькі, легко миються, не прониклими для рідин, стійкі для реактивів і дезінфекційних речовин, підлога – не слизька; поверхня сидінь, полицок водонепроникна і стійка до дезінфекційних засобів, кислот, лугів, органічних розчинників і достатньо жаростійкою; освітлення достатнє; лабораторні меблі міцні, обладнані для доступу прибирання; лабораторне обладнання і прилади розміщені на достатній

площі; окреме приміщення для безпечної роботи з розчинниками, радіоактивним матеріалом і зниженими газами і для їх зберігання; окремі приміщення для верхнього одягу, для приймання їжі і пиття, кімнати відпочинку поза робочої зони лабораторії; раковини із проточною водою розміщати в кожній лабораторній кімнаті, переважно, ближче до виходу; двері повинні мати оглядові вікна, відповідати правилам протипожежної безпеки, за потребисамозачинятися; автоклав та інші засоби деконтамінації розміщати безпосередньо поблизу лабораторії.

Системи безпеки мають охоплювати протипожежну і електробезпечну, душ для термінової обробки і засоби промивання очей. Необхідно забезпечити готовність належним чином обладнаних приміщень або зон для надання першої допомоги.

Проектуючи нові приміщення, необхідно враховувати:

- можливість створення системи механічної вентиляції, що забезпечить надходження свіжого повітря і відведення відпрацьованого без його рециркуляції. Якщо такої системи немає, необхідно вжити заходів щодо обладнання вікон, які добре відчиняються, і оснащені протимоскітними сітками;
- систему регульованого підведення якісної води;
- систему електропостачання, систему газопостачання, систему протипожежної безпеки.

Поряд з надійними процедурами і практикою використання обладнання, що відповідає вимогам безпечності, дозволить скоротити ризики, пов'язані з біологічною безпекою.

Під час вибору безпечного лабораторного обладнання необхідно керуватися такими **принципами**:

1. Обладнання має бути сконструйовано таким чином, щоб обмежувати або не допускати контакту працівника з інфекційним агентом.
2. Обладнання має бути виготовлено із матеріалів, які непроникні для рідин, стійких до корозії і, які задовольняють вимоги механічної стійкості.
3. Обладнання не повинно мати гострих країв, шорсткості та незакріплених деталей.
4. Обладнання має бути сконструйовано і встановлено таким чином, щоб забезпечувати просте поводження і технічне обслуговування, очищення, деконтамінацію і контроль з метою сертифікації; використання виробів із скла та інших крихких матеріалів необхідно уникати.

2.8.3. Основи транспортування та методи роботи з біологічним матеріалом

Транспортування інфекційних та потенційно небезпечних біологічних матеріалів суворо регламентоване національними та міжнародними нормативними положеннями. У цих положеннях викладено порядок правильного використання пакувального матеріалу, а також інші вимоги до

вантажно-розвантажувальних операцій. Міжнародні типові правила не мають на меті замінити будь-які місцеві або національні вимоги. Проте у випадках, коли національні вимоги відсутні, слід використовувати міжнародні типові правила.

Згідно з Державними санітарними правилами та нормами, гігієнічними нормативами «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю» (ДСП 9.9.5.-080-02) будь-який матеріал, що надходить на дослідження до лабораторії, розглядається як потенційно небезпечний.

Транспортна безпека має забезпечувати захист біологічних матеріалів під час руху поза межами зон контрольованого доступу, в яких вони зберігаються, до прибуття на місце призначення. Заходи транспортної безпеки застосовують до біологічних матеріалів у межах однієї установи і між установами. Безпека транспортування матеріалів у межах установи передбачає ведення необхідної документації, підзвітність і контроль над переміщенням матеріалів між зонами обмеженого доступу всередині об'єкта, а також внутрішню доставку, пов'язану з процесами перевезення і отримання вантажу.

Заходи безпеки транспортування між установами мають забезпечувати надання відповідних дозволів і комунікацію між об'єктами до, під час і після транспортування, яке може містити послуги комерційних перевізників. Рекомендації Типових правил Організації Об'єднаних Націй з перевезення небезпечних вантажів є основою для розробки національних та міжнародних транспортних правил країн і містять положення, що стосуються безпеки перевезення небезпечних вантажів, зокрема інфекційних речовин, різними транспортними засобами (Bioriskmanagement:[Laboratorybiosecurityguidance]. Geneva : WHO, 2006. 41 p.).

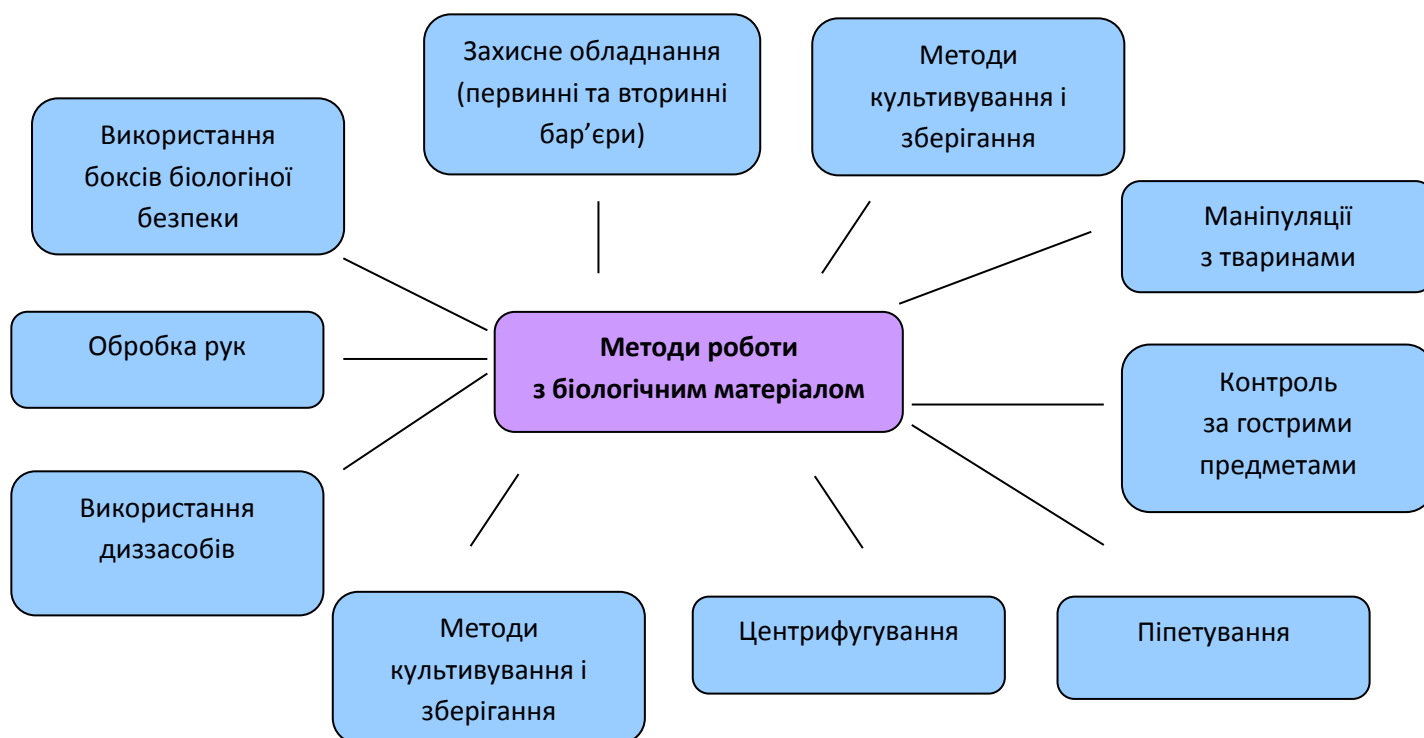
Персонал має одержати потрібну професійну підготовку і бути ознайомлений із регламентними та встановленими процедурами запобігання поширенню шкідливих матеріалів, належного пакування, маркування, реєстрації й транспортування біологічних матеріалів.

Міжнародні та внутрішні правила транспортування інфекційних речовин уведені для запобігання витоку цих матеріалів під час перевезення та захисту населення, співробітників, майна і довкілля від шкідливих наслідків, що можуть виникати під дією цих речовин.

Одним із важливих захисних моментів є обов'язкове дотримання спеціальних правил пакування та маркування небезпечних біологічних матеріалів. Захисне пакування має витримувати грубе поводження та інші впливи, що виникають під час транспортування, зокрема зміни атмосферного тиску й температури, вібрацію та вологість.

Засоби оповіщення про небезпечні матеріали вміщують: транспортні документи, етикетування, маркування ззовні пакування та іншу інформацію, необхідну для того, щоб працівники транспорту та члени бригади швидкого реагування могли правильно визначити матеріал і швидко відгукнутися на будь-

яку аварійну ситуацію. До того ж відправники та перевізники мають бути ознайомлені з цими правилами, щоб вони могли правильно підготувати відвантаження, а також визначити і зреагувати на ризики, пов'язані з цими матеріалами.



Найголовнішим елементом запобігання виникненню інфекцій є суворе виконання стандартних мікробіологічних практичних прийомів і методик. Люди, які працюють з інфекційними збудниками або потенційно інфекційними матеріалами, повинні бути обізнані з можливою шкодою й підготовлені та мати високий професіоналізм щодо володіння практичними прийомами і методиками, необхідними для безпечної роботи з таким матеріалом. Керівники чи особи, відповідальні за лабораторію, контролюють забезпечення або організацію необхідного професійного навчання персоналу. Кожна лабораторія має розробити або затвердити робоче керівництво з біологічної безпеки, в якому необхідно зазначити небезпеки, з якими, можливо, доведеться зіштовхнутися, і навести практичні прийоми та процедури, призначені для зниження чи усунення впливу цих чинників. Нові методи і методичні прийоми перед використанням їх в лабораторній практиці мають бути розглянуті комісією установи з контролю за додержанням вимог біологічної безпеки і затверджені її керівником.

2.8.4. Дезінфекція та стерилізація

Важливим і критичним аспектом дотримання норм і стандартів біобезпеки є правильний підбір і дотримання режимів знезараження матеріалів та відходів з лабораторій. Для реалізації програми біологічної безпеки в лабораторії важливо розуміти принципи знезаражування, чищення, стерилізації та дезінфекції.

Дезінфекція – процес зниження кількості мікроорганізмів (небактеріальних спор) (ISO 15190:2003).

Деконтамінація(знезараження) – будь-який процес видалення і/або знищення мікроорганізмів або зниження їх до безпечного рівня (ISO 15190:2003). Цей термін використовується також щодо видалення або нейтралізації небезпечних хімічних та радіоактивних матеріалів.

Стерилізація – процес, у ході якого знищуються і/або видаляються всі типи мікроорганізмів та спор.

Дезінфекційний засіб – хімічна речовина або суміш хімічних речовин, що використовуються для знищення мікроорганізмів, але не обов'язково спор. Дезінфекційні засоби, як правило, застосовуються до нерухомих поверхонь або об'єктів.

Хімічний герміцид – хімічна речовина або суміш таких речовин, що використовують для знищення мікроорганізмів.

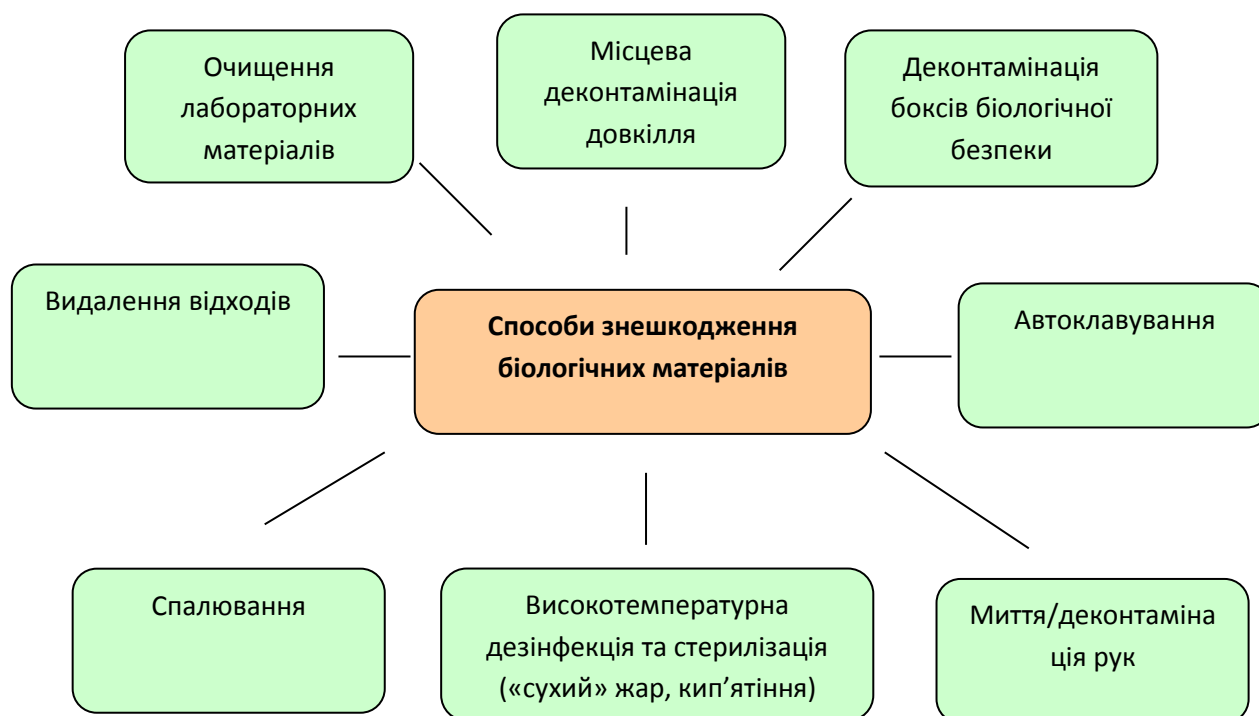
Дезінфекційні засоби мають бути гарантованої ефективності та безпечності, внесені до Облікового переліку засобів в Україні, мати інструкцію (методичні вказівки) щодо застосування, затверджену Головним державним санітарним лікарем України або його заступником і посвідчення про можливість застосування в Україні.

Вибір засобів хімічної дезінфекції, що застосовують в зоні має ґрунтуватись на таких критеріях: засіб має бути ефективним відносно збудника, з яким ведуться роботи (ефективність щодо того чи іншого агента має бути перевірена безпосередньо на місці роботи з ним); він має бути постійно наявним в робочій зоні, бути стабільним під час зберігання та за впливу зовнішніх чинників, зручним щодо застосування. Критичним аспектом в усіх без виключення країнах світу є обов'язкова наявність державної реєстрації засобу та акредитація його виробника. До чинників, що впливають на ефективність дезінфекції відносять вплив довкілля, час контакту, концентрацію та стабільність робочих розчинів, тип знезаражуваних поверхонь та наявність органічних сполук в дезінфектанті.

Знезараження біологічної лабораторії необхідно проводити з великою ретельністю. Основне завдання дезінфекції полягає у зниженні рівня мікробіологічного забруднення настільки, щоб усунути можливість передачі інфекції. Стійкість деяких мікроорганізмів до знезараження наведена (у порядку зниження) в табл. 1.

Стійкість мікроорганізмів до дезінфектантів у порядку її зниження

Спори бактерій <i>Bacillus subtilis, Clostridium sporogenes</i>
Мікобактерії <i>Mycobacterium tuberculosis var. bovis, Nontuberculous mycobacteria</i>
Безоболонкові віруси (не містять ліпідів) <i>Poliovirus, Coxsackievirus, Rhinovirus</i>
Гриби <i>Trichophyton spp., Cryptococcus spp., Candida spp.</i>
Веgetативні бактерії <i>Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella choleraesuis, Enterococci</i>
Оболонкові віруси (містять ліпід) <i>Herpes simplex virus, Cytomegalovirus, Respiratory syncytial virus, HBV, HCV, HIV, Hantavirus, Ebola virus</i>



У лабораторіях рівнів BSL-1–4 застосовують хімічні та температурні способи знезараження, а також методи на основі їх комбінацій. У лабораторіях BSL-2–4 деконтамінації підлягають всі відходи, у лабораторіях BSL-1 – лише генетично модифіковані похідні. У приміщеннях BSL-1–2 застосовують хімічне та періодичне термічне знезараження, а у BSL-3–4 – здебільшого термічне знезараження (періодичне та постійне).

2.8.5. Хімічна, протипожежна і електробезпека. Гігієнічні вимоги до освітлення, водопостачання, вентиляції, газопостачання, рівнів шуму та вібрації

Порушення системи ізоляції патогенних мікроорганізмів може призвести до виникнення таких надзвичайних випадків, як пожежа, хімічні, електричні або радіаційні аварії. З цієї причини в біологічній лабораторії необхідно підтримувати високий рівень безпеки в цих сферах. Розробка правил і контролю за їх виконанням знаходяться у відомі національних або місцевих органів, до яких слід звертатися за допомогою.

Лабораторії і приміщення для тварин інколи бувають об'єктом актів вандалізму. Для виключення подібних випадків необхідно забезпечити надійних захист і протипожежну безпеку. Необхідно регулярно перевіряти всі електричні установки і обладнання, зокрема системи заземлення. У лабораторних електричних ланцюгах має бути встановлені автоматичні вимикачі струму разі електричного замикання на землю. Необхідно мати чергове освітлення з вказанням запасного виходу, бажано наявність резервного генератора для живлення основного обладнання – інкубаторів, холодильників тощо, а також для вентиляції боксів з тваринами.

Усі приміщення лабораторії повинні мати природне та штучне освітлення, яке відповідає чинним вимогам. Для окремих кімнат (термальна, бокс для досліджень на стерильність, фотолабораторія та інші) допускається відсутність природного освітлення. У кожній кімнаті лабораторії має бути загальний вимикач. Світильники і арматура має бути закритого типу і доступні для вологої обробки.

Система водопостачання має бути обладнана запірними пристроями, які перешкоджають протитоку. Вакуумні магістралі мають бути захищені за допомогою упіймачів рідких дезінфекційних засобів і HEPA-фільтрів або аналогічних засобів. Альтернативні вакуумні насоси також мають бути належним чином захищені за допомогою відповідних упіймачів і фільтрів.

У лабораторіях необхідно передбачати обладнання автономної припливно-витяжної вентиляції із встановленням фільтрів тонкого очищення повітря, що викидається з небезпечної зони (або обладнання цих приміщень боксами біологічної безпеки). Необхідно мати надійну і належну систему газопостачання. Система має в обов'язковому порядку піддаватися належному технічному обслуговуванню. Рівні шуму та вібрації у виробничих приміщеннях мають відповідати чинним вимогам.

2.8.6. Організація безпечної роботи та навчання персоналу

Кожна лабораторія має провадити всебічну політику забезпечення безпеки, розробляти керівництво з безпеки і допоміжні програми. Відповідальність за це несе директор (керівник) інституту чи лабораторії, який

може покласти певні обов'язки на відповідального за біологічну безпеку чи інших співробітників. За безпеку роботи в лабораторії також відповідають всі керівники підрозділів та співробітники. Кожен співробітник несе відповідальність за свою власну безпеку та безпеку колег. Співробітники мають виконувати свою роботу безпечним чином і повідомляти керівництво про всі небезпечні дії, умови чи випадки. Безпечна і ефективна робота лабораторії багато в чому залежить від допоміжного персоналу, тому необхідно, щоб такий персонал пройшов належне навчання техніці безпеки.

Керівники лабораторій, відповідальні за біологічну безпеку мають розробити постійно діючу програму навчання з техніки безпеки для того, щоб лабораторний і допоміжний персонал був постійно обізнаний про безпечні методи роботи. Ефективність навчання щодо безпеки і охорони здоров'я, у тому числі й біологічної безпеки, залежить від зобов'язань, прийнятих адміністрацією, мотиваційних чинників, від цілей і завдань організації, належного первинного навчання перед допуском нових співробітників до роботи, належних засобів зв'язку. Ефективна програма навчання персоналу має містити такі елементи (рис. 1).

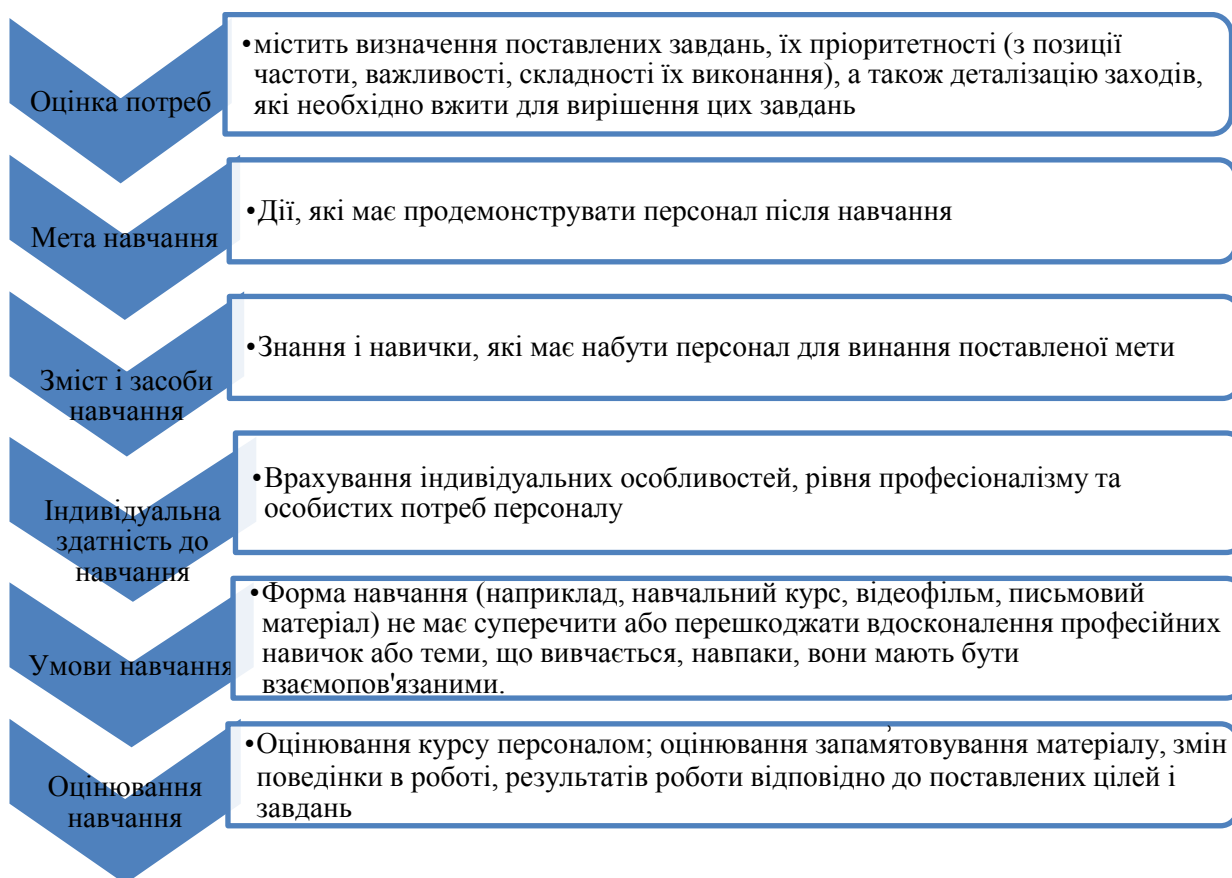


Рис. 1. Критерії програми навчання персоналу

Лабораторія повинна мати стандартні операційні процедури (СОП) та підтримувати записи для:

- a) визначення вимог до компетентності персоналу;
- b) підбору персоналу;
- c) навчання персоналу;
- d) нагляду за персоналом;
- e) уповноваження персоналу;
- f) моніторингу компетентності персоналу.

2.8.7. Оцінювання ризиків у біологічній лабораторії та алгоритм дій щодо управління ними

Під час виконання робіт у лабораторіях мікробіологічного профілю на працюючих можуть впливати небезпечні та шкідливі виробничі чинники (рис. 2).



Рис. 2. Класифікація небезпечних чинників у лабораторії

Для оцінювання ризиків, які можуть виникнути в лабораторії внаслідок впливу небезпечних чинників, необхідно здійснити низку процедур (рис. 3) та розробити ефективні заходи щодо усунення чи мінімізації ризиків (рис. 4).

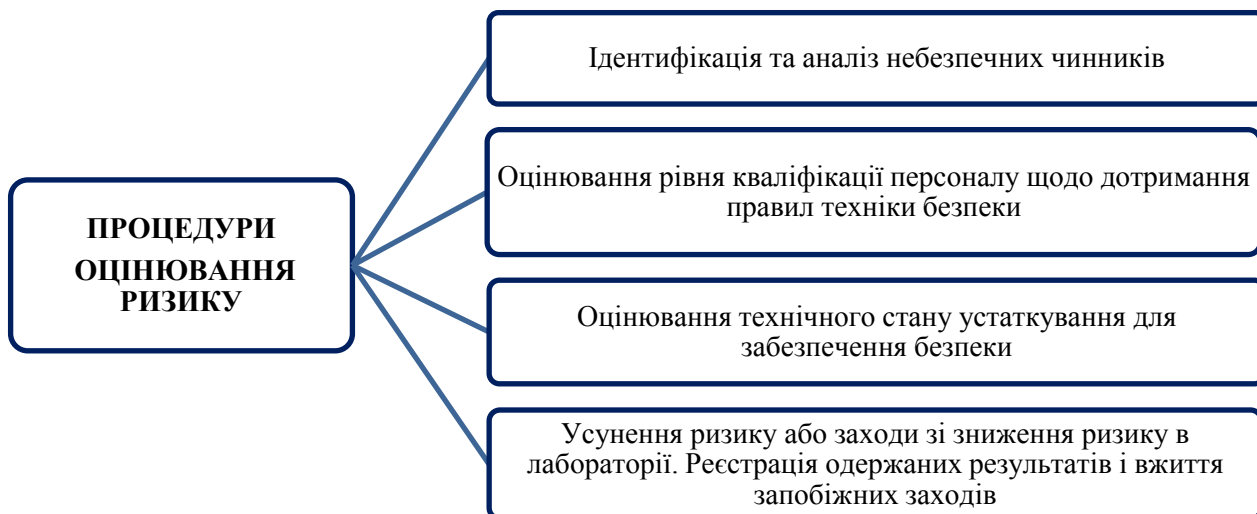


Рис. 3.Процедури оцінювання ризиків

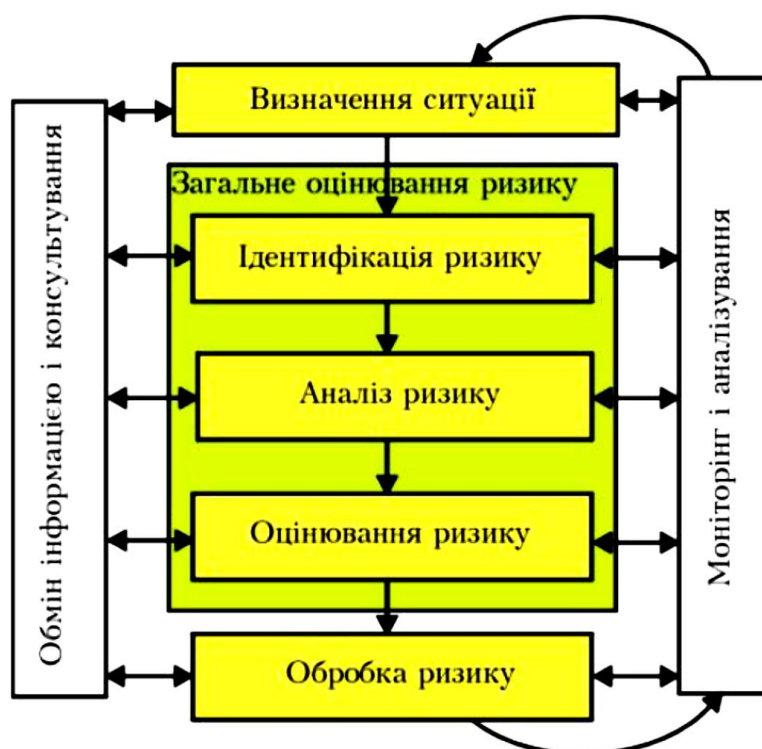


Рис. 4. Алгоритм управління ризиком

2.8.8. Порядок дій під час ліквідації наслідків аварій та нещасних випадків у лабораторіях

У разі аварій і нещасних випадків, пов'язаних з інфікуванням, отруєнням, пораненням, опіком, постраждалим (особисто або присутні працівники) зобов'язаний негайно сповістити про це завідувача лабораторії. Якщо аварія відбулася з розливанням та / або розбризкуванням інфекційного матеріалу, всі, хто перебував у кімнаті, у той самий час зупиняють роботу, затримують дихання, виходять із кімнати в передбокс, зачиняють за собою двері, обробляють руки

дезрозчином або етиловим спиртом, якщо обличчя не було захищене, то рясно обробляють його етиловим спиртом (70 %), потім густо змочують дезрозчином захисний одяг, починаючи із хустинки або шолома, знімають їх, занурюють у дезрозчин або кладуть у бокс для автоклавування. Після цього протирають відкриті частини тіла етиловим спиртом (70 %), переодягаються у змінний робочий одяг і обробляють слизові очей, носа й рота. Рот і горло полощуть етиловим спиртом (70 %), у ніс закачують розчин протарголу (1 %). У разі потрапляння ботулінічного токсину на відкриті ділянки шкіри його змивають великою кількістю води з милом (змивні води автоклавують).

Якщо аварія відбулася без розливання/розбризкування біологічного матеріалу, не виходячи з приміщення, на місце контамінації біологічним матеріалом накладають тампон із дезрозчином, викликають завідувача або особу, яка його заміщає, та продовжують дезінфікувати місця аварії. Після цього працівник виходить із приміщення, де відбулася аварія, знімає і занурює в дезрозчин захисний одяг. Відкриті частини тіла обробляють дезрозчином або етиловим спиртом (70 %). Якщо аварія відбулася в справному боксі безпеки – закінчують роботу, гасять спиртівку, вимикають обладнання (центрифуги і т. ін., не відчиняючи їх), на місце аварії накладають серветки, густо змочені дезрозчином. У боксі безпеки вмикають на 30 хвилин бактерицидні лампи та аварійну сигналізацію, проводять дезінфікування. Через 2 години після закінчення дезінфікування роботу в боксі безпеки можна продовжувати. Витяжна вентиляція під час аварії та дезінфікування має залишатися ввімкненою.

Якщо аварія пов'язана із пораненням або іншим порушенням цілісності шкірних покривів, роботу припиняють, руки обробляють дезрозчином, знімають рукавички та вичавлюють із ранки кров у дезрозчин, на місце поранення ставлять на 4–5 хв компрес із дезрозчину або етилового спирту (70 %). Обов'язково необхідно задокументувати ситуацію, що сталася. Працівник лабораторії в акті аварії має зазначити можливий інфекційний збудник, механізми та шляхи впливу (через шкіру, бризки на слизову оболонку або шкіру, аерозоль і т. ін.), місце й час події, використані засоби індивідуального захисту в момент ураження, характер наданої допомоги постраждалому (наприклад, характер і тривалість промивання та інших засобів, час, що пройшов після обробки).

Необхідно виконувати в біологічній лабораторії такі алгоритми:

1. Алгоритм дій у випадку розливання та / або розбризкування біологічно небезпечної речовини всередині шафи біобезпеки.
2. Алгоритм дій у випадку розлиття біологічно небезпечної речовини за межами шафи біобезпеки.
3. Алгоритм дій у випадку порушення роботи БББ (боксу біологічної безпеки).
4. Алгоритм дій у випадку пошкодження або біологічного забруднення центрифуги.
5. Алгоритм надання першої допомоги.

Робота в лабораторії після усунення наслідків аварій та нещасних випадків поновлюється з дозволу керівника лабораторії.

Нормативне забезпечення та педагогічні ресурси:

<https://www.who.int/in-vitro-diagnostic/biosafety-guidelines/en>

https://fssuir.sumdu.edu.ua/bitstream/123456789/46037/1/Holubnycha_biobezpeka.pdf

<https://www.twirpx.com/file/453879>

https://dnaop.com/html/3108/doc-ДСП_9.9.5-080-02

<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

<https://www.cap-acp.org/Laboratory-Biosafety-Manual.php>

<https://www.who.int/iris/handle/10665/69390>

<https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>

zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0213-19

<https://zakon.rada.gov.ua/go/2694-12>

<https://законодавство.com/...nakaz/nakaz-vid-23072002-280>

<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

<http://www.who.int/csr/>

<https://www.iso.org/standard>

ISO 31000 Risk management Principles and guidelines

IEC/ISO 31010 (en) Risk management – Risk assessment techniques

ISO Guide 73 Risk management – Vocabulary

Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів : Закон України // Відомості ВРУ. 2007. № 35. С. 484.

Державні санітарні норми і правила «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» (затверджені наказом Міністерства охорони здоров'я України від 24.01.2008 № 26).

Державні санітарні правила «Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності» (ДСП 9.9.5.035-99).

Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю» (ДСП 9.9.5.-080-02): Постанова Головного державного санітарного лікаря України від 28.01.2002 № 1.

Рекомендации по перевозке опасных грузов, 13-е пересмотренное издание. Нью-Йорк и Женева, Организация Объединенных Наций, 2003. URL :http://www.unecse.org/trans/danger/publi/unrec/rev13/13nature_r.html.

Технические инструкции по безопасной перевозке опасных грузов воздушным транспортом, Издание 2003–2004 гг. Монреаль, Международная организация гражданской авиации, 2002.

Economic Commission for Europe Inland Transport Committee. Restructured ADR applicable as from 1 January 2003. New York and Geneva, United Nations, 2002. URL :<http://www.unece.org/trans/danger/publi/adr/adr2003/ContentsE.html>.

Infectious substances shipping guidelines. Montreal, International Air Transport Association, 2003. URL :<http://www.iata.org/ads/issg.htm>.

Transport of Infectious Substances. Geneva, World Health Organization, 2004. URL :http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_9/en.

World Health Organization. Laboratory biosafety manual. Third edition. Geneva, World Health Organization, 2004. URL :http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en.

Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations. Fourteenth revised edition. United Nations, New York and Geneva, 2005. URL :http://www.unece.org/trans/danger/publi/unrec/rev14/14files_e.html.

International Health Regulations. World Health Assembly resolution WHA58.3, May 2005. URL :<http://www.who.int/gb/ebwha58.html#Resolutions>.

FAO Technical Consultation on Biological Risk Management in Food and Agriculture, Bangkok, Thailand, 13-17 Jan 2003. URL :http://www.fao.org/ag/agn/food/meetings/biosecurity_en.stm.

Biorisk management: [Laboratory biosecurity guidance]. Geneva : WHO, 2006. 41 p.

ISO 15190:2003 Medical Laboratories – Requirements for Safety (ISO 15190:2003, Медицински лаборатории – Требования безопасности).

Стандарти стосовно менеджменту системи якості ISO 9001, 17025, GLP, GMP.

Laboratory Biosecurity Handbook, CRC Press, 2007.

CDC/NIH Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition, 2007.

Canada's Laboratory Biosafety Guidelines, 3rd edition, 2004.

The International Biorisk Management Standard CWA 15798:2008. URL :www.cen.eu/CENORM/sectors/technicalcommittees/workshops/ws31/aps.

2.9. Видалення відходів/М. Сімонов, В. Стефанік/

2.9.1. Типи відходів у лабораторній практиці

Відходи – це все те, від чого необхідно позбутися. Необхідно встановити систему ідентифікації та визначити категорії для контамінованих матеріалів і відповідних контейнерів. При цьому необхідно додержуватися національних і міжнародних норм та правил. Категорії можуть бути такими:

1. Неконтаміновані (неінфекційні) відходи, які можуть бути повторно використані або видалені разом із загальними «побутовими» відходами.

2. Контаміновані / умовно-контаміновані та в тому числіколючі та різальні предмети – голки, скальпелі, ножі та шматки скла (їх у всіх випадках необхідно складати в контейнери із твердими стінками, оснащені накривками).

3. Контаміновані матеріали, призначені для деконтамінації шляхом автоклавування, які потім підлягають миттю та повторному використанню.

4. Контаміновані матеріали, призначені для автоклавування та видалення.

5. Контаміновані матеріали, що підлягають спалюванню.

2.9.2. Ризики, зумовлені відходами

Небезпечний характер лабораторних відходів обумовлений наявністю інфекційних або токсичних агентів, а також наявністю гострих предметів. Як результат неправильного поводження з лабораторними відходами можуть виникнути хвороби людини, хвороби тварин, хвороби рослин, токсичність для людини або тварин, загрози безпеки, забруднення повітря, землі, поширення мух та інших комах, поширення гризунів, запах і неестетичність ландшафту.

Усі люди, що вступають в безпосередню близькість з небезпечними лабораторними відходами схильні до ризику від впливу небезпеки, зокрема ті особи, які працюють у лабораторії, та інші особи, які залучені до обробки таких відходів або ж піддаються їх впливу як результат необережних дій.

Іншою небезпекою є потрапляння хімічних реагентів до відходів, котрі в подальшому будуть утилізовані як побутове сміття. Як результат виникає загроза забруднення довкілля, загроза для здоров'я працівників, котрі займаються утилізацією, виділенням токсинів, або ж можливістю вибуху тощо.

Важко в одному документі навести всі ризики, котрі можуть бути присутніми у лабораторії. Тому працівники лабораторії мають оцінити всі ризики, характерні для конкретної лабораторії. Також важливо розробити порядок дій працівників на випадок розлиття хімічних речовин, пошкодження контейнерів та інших нештатних ситуацій. Важливо передбачити засоби, за допомогою яких можна мінімізувати можливу нанесену шкоду. В подальшому використанні засоби разом з залишками пошкодженого матеріалу мають бути належним чином ізольованими та видаленими.

2.9.3. Збирання, сортування та тимчасове зберігання

Всі відходи, придатні для утилізації методами, що не відрізняються від методів утилізації побутового сміття, за винятком паперу і скла, що переробляється, називаються «контрольованими відходами». Елементи цієї категорії, які охоплюють брудний папір, пластик, гуму та дерево, мають, як правило, поміщати в контейнери для сміття, які є в кожній лабораторії, і збиратимуться очисниками. Проте, кожна лабораторія повинна також мати

контейнер або контейнери для певних предметів, які не допускаються в звичайні бункери для сміття.

Окремо мають зберігатися будь-які гострі предмети з металу або скла, всі дрібні порошки (бажано всередині пляшки або банки), брудні пробірки або інші предмети, забруднені хімічними речовинами (але не будь-які шприци або голки).

Контейнери для відходів, що контролює лабораторія, мають регулярно спорожняти і ніколи не допускати до переповнення. За жодних обставин будь-який предмет зі скла, гострих металів або дрібного порошку не можна помістити в звичайний лабораторний контейнер для сміття. Корки мають бути вилучені з усіх пляшок, відібраних для утилізації. Крім цього не має бути жодного помітного запаху хімікатів з будь-якої пляшки, яку відсортовано на утилізацію.

Скло та відходи зі скла мають зберігатися в маркованому надійному контейнері для відходів окремо від інших твердих відходів для зручності переробки. Порожні флакони з реагентами в належному стані можуть бути повторно використані в лабораторії після ретельного очищення та видалення старих етикеток.

Гострі відходи, такі як скальпелі, голки від шприців, бите скло тощослід зберігати для утилізації в контейнерах з твердими стінками, котрі не допустять ненавмисного поранення. Контейнери мають збирати ліцензовані компанії з утилізації.

Категорично забороняється зливати горючі рідини в раковину. Їх зливають у спеціально пристосовану тару, звідки їх вивозять для знешкодження.

Для запобігання неправильному сортуванню відходів контейнери слід промаркувати, наприклад відповідним написом та кольором. Бажано використовувати міжнародно визнані надписи та знаки.

Утилізовані леткі хімікати мають зберігати у ємностях з надійними накривками у добре вентильованих приміщеннях. Однак категорично забороняється зберігати відходи у витяжних шафах, де відбуваються реакції.

Цитотоксичні відходи мають зберігати окремо від інших відходів у визначеному безпечному місці.

Радіоактивні відходи мають зберігати в контейнерах, що перешкоджають іонізації. Відходи, які мають зберігати під час радіоактивного розпаду, мають бути позначені типом радіонукліда, датою та деталями необхідних умов зберігання.

Забороняється зберігати використані пляшки на підлозі або у раковині.

Сумісні хімічні речовини можуть зберігатися разом, а несумісні мають бути розділеними. До несумісних речовин також можна віднести речовини, які піддаються спалюванню та ті, що не піддаються, оскільки для них у подальшому передбачено різні методи утилізації.

2.9.4. Загальні вимоги до інвентарю та ємностей для зберігання відходів

Ємності для відходів мають знаходитися одночасно в легкій доступності але не перешкоджаючи роботі працівників.

Слід застосовувати маркування контейнерів для різних видів відходів. Часто застосовують маркування кольором. При цьому кольори мають бути контрастними. На всіх контейнерах, де є біологічна, хімічна або радіаційна загроза мають бути нанесені відповідні міжнародні позначки. Якщо використовують етикетки для маркування відходів, то їхній фон має контрастувати з кольором контейнера.

Всі ємності, що застосовують для накопичення відходів, мають бути герметичними та не допускати негативного впливу на оточення та довкілля.

Контейнер для гострих та різальних відходів має бути з міцними стінками, які унеможливають їх пошкодження. Однак не рекомендується використовувати металеві контейнери, виготовлені з матеріалу, котрий може кородувати. Ємність контейнерів має бути відповідною кількості утворених відходів та узгоджуватися з частотою їх видалення з приміщення лабораторії. Не рекомендується наповнювати контейнер більш ніж на 3/4 його об'єму. Крім цього слід врахувати кінцеву вагу заповненого контейнера. Він не має бути надто габаритним та важким.

Для негострих відходів можна використовувати міцні пакети. Після заповнення пакета на 3/4 рекомендується зав'язати пакет за допомогою надійної пластикової стяжки. Для вищої надійності рекомендується використовувати подвійні пакети, або вкладати заповнений пакет у відповідного розміру коробку з гофрованого картону. При цьому на коробці слід зробити відповідні позначки.

За умови роботи з культурою клітин слід враховувати умови зберігання відходів (наприклад чашки Петрі) у лабораторії. За кімнатної температури мікроорганізми будуть швидко розмножуватися. Тому необхідно або створити несприятливі умови для розмноження мікроорганізмів або врахувати це за планування частоти видалення відходів. Контейнер для відходів має бути стійким до речовин, які в ньому розміщені. Недопустимо накопичувати в одному контейнері залишки хімічних речовин, котрі взаємодіють між собою.

2.9.5. Видалення та транспортування

Видалення лабораторних відходів регулюється різними регіональними, національними та міжнародними нормами, тому до розроблення і здійснення програми з обробки, транспортування та видалення небезпечних відходів потрібно ознайомитися зі спеціальною літературою з цього питання.

У лабораторіях деконтамінація відходів та їх остаточне видалення тісно пов'язані між собою. Основний принцип полягає в тому, що інфіковані матеріали

мають бути деконтаміновані, автоклавовані або знищені в самій лабораторії. Перед тим як видалити з лабораторії будь-які об'єкти або матеріали, що мали відношення до потенційно небезпечних інфекційних матеріалів, мікроорганізмів або тварин, необхідно вирішити наведені нижче основні питання:

1. Чи підлягали ці об'єкти й матеріали ефективній стерилізації або дезінфікуванню за допомогою відповідних установлених процедур?

2. Якщо ні, то, чи упаковані ці об'єкти або матеріали встановленим способом для негайного знищення на місці або для перевезення в іншу лабораторію, де є можливості для їх спалювання?

3. Чи пов'язане видалення дезінфікованих або стерилізованих матеріалів / об'єктів із додатковою потенційною небезпекою (біологічною або іншою) для тих, хто безпосередньо проводитиме процедуру знищення, або для тих, хто може контактувати з об'єктами або матеріалами за межами лабораторії?

Всі категорії відходів, котрі підлягають вивезенню мають бути належним чином маркованими. Важливо дотримуватися міжнародно визнаного маркування небезпек, котрі можуть міститися у відходах. Наприклад «Біологічна небезпека», «Радіоактивні відходи», «Легкозаймиста речовина» тощо. Крім цього бажано, щоб маркування було незмінним протягом тривалого періоду часу.

Допускається об'єднання кількох малих контейнерів у більшому, але вони мають бути однієї категорії відходів, а великий контейнер повинен мати аналогічне малим маркування.

2.9.6. Ведення документації

Лабораторії мають вести чіткі та легко простежувані записи про поводження з відходами. Ця документація має важливе значення для виконання державного регулювання, планування та відстеження, зменшення відповідальності, полегшення перевірок та відповідей на запити та інформаційні листи. Для забезпечення виконання нормативних вимог потрібна докладна документація. Кожна лабораторія має унікальні та специфічні звітні періоди та дати подання, форми звітності про дані та час зберігання записів. Вимоги та процедури документації мають бути внесені до плану поводження з відходами лабораторії.

Ці вимоги зазвичай охоплюють:

- Документацію про характеристику лабораторних приміщень та території.
- Опис видів відходів та методи поводження з ними.
- Дати відкриття / закриття контейнерів для зберігання різнопланових відходів.
- Документи, що підтверджують вивезення відходів.
- Результати перевірки ефективності заходів щодо мінімізації кількості відходів.

Глава 3. ВЗЯТТЯ ЗРАЗКІВ

3.1. Відбір зразків (включаючи сипучі та упаковані зразки), транспортування, зберігання, обробка та переробка

/А. Гулбані, І. Гуледані/

Для визначення чи підтвердження причини захворювання або загибелі тварин, у разі підозри на інфекційну / інвазійну хворобу або на отруєння фахівець (лікар ветеринарної медицини) зобов'язаний правильно відібрати відповідний патологічний / біологічний матеріал та направити його до акредитованої (державної або уповноваженої) лабораторії ветеринарної медицини для проведення відповідних досліджень.

Крім того, в лабораторію можуть направляти зразки кормів, води, ґрунту, повітря для проведення різноманітних досліджень, а також проби крові та інший матеріал від тварин для бактеріологічних / вірусологічних, імунологічних, гістологічних, молекулярних, біохімічних та хіміко-токсикологічних аналізів.

У цій частині описують організацію, правила відбору та пересилання зразків, методи консервування і терміни доставлення до лабораторії патологічного / біологічного матеріалу для життєвого, а також посмертного діагностування інфекційних хвороб тварин, порядок оформлення супровідних документів до відібраних зразків.

Описують вимоги до пакування, маркування, документації до інфекційних матеріалів різних категорій та правила транспортування таких матеріалів.

У цій частині керівництва описують, який конкретно патологічний / біологічний матеріал відбирають за конкретних бактеріальних та вірусних хвороб тварин, які систематизовані для кожного окремого виду.

Цю частину розраховано на фахівців ветеринарної медицини та діагностичних лабораторій.

Вступ

Значні зусилля та ресурси витрачають на оптимізацію методології для мінімізації невизначеності вимірювань харчових аналізів. Однак тому, як відбирають зразки та чи є вони репрезентативними для цієї мети, приділяють значно менше уваги. Часто вибирають занадто мало одиниць, або їх вибирають таким чином, що вони не є репрезентативними для партії, що перебуває під контролем. Наслідками можуть бути ненадійні результати та втрата часу і сил, що в кінцевому підсумку може призвести до неправильних адміністративних рішень. Неправильні результати також будуть отримані, якщо зразки будуть неправильно промарковані, неналежно збережені або попередньо оброблені способом, що не відповідає правилам. Розмір вибірки має відповідати цілі – використання більшої чи меншої кількості зразків буде марною тратою грошей.

Тому дуже важливо ретельно продумати процедури відбору проб під час розробки проекту для нагляду, моніторингу чи інспекції.

Цей посібник призначений для всіх, хто займається аналізом їжі та прийняттям рішень на основі таких аналізів.

Є багато аспектів, які слід враховувати під час розробки процедури відбору проб. У деяких продуктах харчування досліджувані параметри розподіляють рівномірно (однорідно) по всій матриці, але часто сполуки / мікроорганізми розподіляються нерівномірно (гетерогенно). Звичайно, важливо також враховувати небезпеку для здоров'я, пов'язану з параметром, а також значення продуктів харчування, з якими може бути пов'язаний параметр, під час визначення плану відбору проб.

В ідеалі до всіх проб харчових продуктів слід застосовувати простий набір правил. Однак це неможливо і недоречно, наявність одного єдиного аналітичного методу для аналізу всіх типів сполук. Багато методів відбору зразків доступні для певних продуктів, і їх слід застосовувати там, де це доречно. Подібним чином, там, де вже існують правила відбору зразків, їх слід дотримуватися, щоб результати мали юридичну силу.

Визначення

Основна маса: Матеріал, який складається не з дискретних, ідентифікованих, постійних одиниць, а навпаки, з довільних, нерегулярних одиниць або матеріалу, що складається з дрібних частинок або одиниць, які було б недоцільно брати окремо.

Складений (сукупний) зразок: Зразок, що складається з частин від кожної одиниці, взятої пропорційно кількості продукту в кожній вибраній одиниці (ISO 7002-1986). Загальна сума всіх доданих зразків, відібраних з партії.

Примітка: Рівні порції, розмір яких слід вказати заздалегідь, також можна взяти з кожної одиниці.

Партія: Кількість товару, що доставляють одночасно і охоплюється одним набором документів. Вантаж може складатися з одної або декількох партій або частин партій (ISO 7002:1986).

Зустрічний зразок / повторний зразок: Зразок, відібраний з тієї самої партії, одночасно і таким самим чином, як зразок, що використовують для цілей примусового виконання, конкуруючий зразок має бути якомога подібнішим до нього. Зустрічний зразок має бути запечатаний і може використовуватися компанією для перевірки результатів офіційного аналізу.

Точкова проба: Кількість речовини, взята одночасно з більшої маси матеріалу (ISO 7002:1986) / Окрема порція матеріалу, зібрана однією операцією пристроєм для відбору проб, з частин партії, розділених у часі або просторі. Точкові проби можуть бути випробувані як окремо, так і комбіновані (комполитні) і перевірені як одиниця.

Експертиза: Звичайна випадкова вибірка, щоб перевірити, чи відповідає зразок заданим специфікаціям. Результати цих зразків визначають, чи потрібні подальші дії – (посилити перевірку) (Звіт ТНРВ № 5. 1995).

Елемент / одиниця: Фактичний або звичайний об'єкт (визначена кількість матеріалу), за яким може здійснюватися набір спостережень (ISO 7002-1986).

Лабораторний зразок / Кінцевий зразок: Зразок, підготовлений для відправлення в лабораторію і призначений для перевірки або тестування (ISO 7002-1986).

Партія: Визначена кількість деякого товару, виготовленого в умовах, які вважаються постійними (ISO 7002-1986).

Моніторинг: Повторюване спостереження або повторне вимірювання, проведене на зразках, репрезентативних для окремих продуктів харчування або дієти в країні чи певному районі країни (ВООЗ, 1979). Призначений збір інформації, що повторювано здійснюють щодо певного об'єкта або з певною метою протягом тривалого періоду часу.

Первинний відбір проб: Етапи відбору проб, які ведуть до лабораторної проби; тобто відбір проб проводять «на місці».

Зразок (загальний термін): Один або кілька предметів (або частина матеріалу), обраних певним чином із сукупності (або з більшої кількості матеріалу). Він призначений для надання інформації, що представляє склад продукту, і, можливо, служить основою для прийняття рішення щодо продукту чи процесу його вироблення (ISO 7002-1986).

План відбору проб: Заздалегідь визначена процедура, що дозволяє персоналу, що відбирає проби, вибрати, відібрати або відокремити зразки з партії, щоб отримати необхідну інформацію щодо партії.

Вторинний відбір проб: Зменшення / вилучення складеного (сукупного) зразка у зразки для дослідження.

Нагляд: Визначення стану продуктів у певний момент часу без повторних аналізів, тобто без мети виявлення будь-яких змін рівня речовин у продуктах (ВООЗ, 1979). Передбачуваний збір інформації, що здійснюється щодо певного об'єкта / цілі протягом певного періоду часу.

Тестовий зразок: Зразок, підготовлений з лабораторного зразка, відповідно до процедури, зазначеної в методі випробування, і з якого будуть відібрані проби (ISO 7002-1986).

Посилена перевірка: проводиться, коли є підстави вважати, що продукт не відповідає заданим специфікаціям. Якщо результати випробувань під час попередньої перевірки тієї самої або порівнянної партії перевищують законодавчу межу певного компонента, якщо є підстави вважати, що партія забруднена або є обґрунтована підозра, що партія, не відповідає специфікації, потрібно зібрати більше зразків, ніж за звичайної перевірки.

Ціль відбору проб

Перед відбором зразків слід визначити його мету: що підлягає випробуванню та передбачувану мету результатів. Слід ретельно розглянути потреби та очікування зацікавлених сторін та інших потенційних користувачів щодо результатів тестування. Доцільно також розглянути, чи насправді аналіз, а отже і вибірка, є виправдані.

Наприклад, якщо партію неналежно зберігали, а подальші дії виключені внаслідок неправильної обробки, відбір проб не потрібен. Якщо неправильно збережені зразки вилучають, контролер опиниться в дилемі, чи отримані результати аналізів будуть задовільними.

Під час перевірки, що проводять органи влади, зразок може бути частиною поточного проекту моніторингу, нагляду або посиленої або звичайної інспекції. Харчові продукти також можуть бути відібрані як частина дослідницького проекту або в рамках власного контролю якості виробником. Відбір проб може містити зразки готової продукції, напівфабрикатів, сировини та пакувальних матеріалів, а також відбір проб під час гігієнічного контролю та з виробничої лінії. Під час відбору зразків необхідно переконатися, що зразок є якомога репрезентативнішим для матеріалу, що підлягає дослідженню, і що остаточний розмір зразка є достатнім для аналізів.

Відбір зразків може бути вибірковою або цільовою. Різницю можна проілюструвати за аналогією зі швидкістю руху. За вибірковою перевіркою швидкості вибирають лише водіїв, які рухаються занадто швидко (або дуже повільно). Під час проведення цільової перевірки швидкості обирають представників дорожнього руху, щоб порівняти середнє значення та відхилення в різний час або місці.

Об'єктивний відбір проб. Метою об'єктивного відбору (випадкової інспекції, спостереження, моніторингу) є отримання репрезентативної випадкового зразка з партії або географічного району, про який йде мова. Кожна порція / зразок повинен мати однакову ймовірність відбору проб.

Об'єктивний відбір проб використовують для інспекції та моніторингу харчових продуктів. Під час моніторингу один і той самий тип харчових продуктів перевіряють на однакові параметри, повторювано, протягом місяця / років, щоб перевірити, чи змінюються параметри, та визначити відповідності / невідповідності. Важливо, щоб відбір проб проводили випадковим чином для максимального забезпечення її репрезентативності для партії.

Вибірковий відбір проб. За вибіркового відбору зразки, зазвичай, збирають, щоб проілюструвати або задокументувати незадовільні умови або підозру на фальсифікацію продукту. Відбір зразків є навмисно упередженим і спрямований на конкретні товари або виробників, часто у відповідь на інформацію, отриману раніше від об'єктивної вибірки. За так званих посилених інспекцій слід відбирати більше зразків, ніж за об'єктивного відбору непідозрілих

партій, збільшуючи ймовірність доведення невідповідності товару законодавству. Цей тип відбору проб необов'язково є репрезентативним для всієї партії, оскільки зразки не можуть бути вибрані випадковим чином, і, отже, результати не можуть розглядати статистично. З іншого боку, ресурси можна найкраще використовувати за вибіркового відбору проб. Скарги споживачів, такі як забруднення комахами та випадки зараження шкідниками, такими як щури на складі, як правило, призводять до вибіркового відбору проб. Проби відбиратимуть у місцях, де найімовірніше доведено зараження. За аналогією, температурні перевірки проводять у місцях, де очікується, що умови будуть найбільш критичними.

Правила перемикання. Об'єктивний та вибіркового відбір проб можуть доповнювати одне одного. Якщо спостереження підсилює підозри щодо проблем із деякими продуктами харчування певного походження чи компанії, тоді слід провести вибіркового відбір проб, зосередившись на цих продуктах. Перехід від одного плану відбору зразків до іншого називається правилами переключення. Якщо аналіз виявляється дефектним або суперечливим під час використання об'єктивної вибірки, можна перейти на вибіркового відбір проб, зосередившись на продемонстрованій проблемі. Коли результати вказують на те, що дотримання цього більш жорсткого плану більше не потрібно, тоді можна повернутися до моніторингу за допомогою об'єктивного плану відбору проб.

Опис проєкту, процедура відбору проб

Під час планування проєкту слід надати опис, що містить такі теми:

- Чому відбувається відбір проб – мета?
- Які аналіти / параметри слід визначити?
- Які матриці слід відбирати, які продукти харчування?
- Де проводити відбір проб – місце?
- Як брати проби – обладнання та методи, вибір персоналу?
- На скільки великі елементи / агрегати мають бути вибрані – тип планів вибірки?
- Як маркувати зразки?
- Яку інформацію слід записувати під час вибірки – протокол вибірки?
- Як транспортувати або відвантажувати зразки – чи необхідна будь-яка попередня обробка?
- Хто повинен проводити аналіз зразків (яка лабораторія)?
- Як зберігати та попередньо обробляти зразки в лабораторії?
- Які аналітичні методи слід використовувати?
- Як та кому аналітичні результати повідомляють та хто використовує?
- Як оцінювати результати та стежити за ними?

Характер досліджуваних параметрів та матриці

Використовувані зусилля та ресурси мають відображати:

- властивості параметра, що визначають щодо небезпеки для здоров'я;
- дієтичну важливість харчових продуктів;
- наслідки для окремих груп із серйозною непереносимістю певних харчових продуктів;
 - цільове призначення продукту (пряме споживання, сировина, напівфабрикати, добавки тощо);
 - доступні методи аналізу;
 - законодавчі вимоги;
 - яка складова інформація потрібна; середнє значення або мінливість складу.

Важливо, щоб були відомі фізичні та хімічні властивості аналіту. Якщо аналітметаболізується або зазнає фізичних або хімічних змін, це слід враховувати під час вибору пристрою та обладнання для відбору проб, а також мати на увазі підготовки та зберігання. Важливо також знати, чи складається партія з окремих предметів чи із сукупності однорідних.

Успіх в отриманні репрезентативних зразків харчових продуктів безпосередньо залежить від фізичних характеристик продукту (наприклад, рідини, порошку, грудочок, газу) та типу потенційного забруднення. Невизначеність у відборі проб прямо пропорційна варіації частинок зразка. Для фіксованого розміру зразка, що менший розмір окремих компонентів, то менша помилка відбору проб. Легше отримати репрезентативні зразки харчових продуктів, які є або рідкими, наприклад вода, молоко або пиво, або пасти або порошку, ніж з продуктів, що складаються з більших компонентів неправильної форми, наприклад зерно, цілі горіхи, фрукти, змішані продукти харчування / корми тощо. Це не обов'язково стосується відбору зразків для дослідження на генетично модифіковані організми, оскільки ДНК може бути надто фрагментованим, якщо розміри частинок занадто малі. Для повної та вичерпної теорії відбору проб та помилки вибірки читач посилається на роботи доктора П'єра Гі; Відбір зразків твердих частинок, теорія і практика, Elsevier, Амстердам, 1992 р. Склад і складність харчової матриці має значний вплив на отримання репрезентативних зразків, особливо за надзвичайно низьких концентрацій та / або коли забруднення неоднорідно розподілене по партії. У таких випадках слід робити більше кроків. Гі та інші автори детально розробляють це твердження.

Такі небезпечні сполуки, як мікотоксини та патогени, часто нерівномірно розподіляються в продуктах харчування. Під час відбору проб неоднорідного матеріалу кількість проб слід збільшити, щоб отримати репрезентативну вибірку. Під час дослідження спалахів харчових отруєнь рекомендується відбирати велику кількість проб, щоб отримати великі сукупні / складені зразки всіх підозр на продукти харчування. Однак може знадобитися приймати зразки менших

розмірів, ніж бажано, через труднощі з отриманням достатньої кількості матеріалу (більша частина його вже з'їдено), надмірні витрати або бажаний розмір зразка занадто великий для обробки. Перед відбором зразків завжди бажано проконсультуватися з лабораторією, у разі виникнення будь-яких особливих вимог щодо обсягу та обробки зразка.

Для сенсорного аналізу інші міркування можуть бути зроблені. Аналіз потенційно шкідливих продуктів має бути виключений із зрозумілих причин, коли справа доходить до дегустації, але перевірка на зовнішній вигляд та запах може бути доречною в деяких ситуаціях.

Доречно періодично робити однорідними сенсорні проби шляхом змішування або подрібнення. Зразки є або однорідними (всі види рідин), або вони є неоднорідними зразками, і їх слід аналізувати як такі. Таким чином, важливо зазначити, що само собою зрозумілим є те, що випробувані зразки є репрезентативними для лабораторних зразків і що лабораторні зразки є репрезентативними для відповідної партії.

Де виконується відбір проб – місце

Рішення про те, де проводити відбір проб, залежить від мети проєкту. Якщо метою є перевірка критичних точок (на складі або на конкретному виробничому етапі), слід визначити критичні точки. Наприклад, у холодильному сховищі або в холодильному фургоні зразки слід відбирати з найближчих до дверей предметів (і зверху, і знизу), приблизно всередині складу (і зверху, і знизу) і недалеко від повітрязабірника до холодильної установки. Іноді доводиться вивантажувати весь фургон, оскільки можуть існувати певні міркування щодо того, що можна перевірити лише певні частини партії. Якщо товар зберігається за кімнатної температури замість +4 °С, немає необхідності відбирати проби та аналізувати, перш ніж вживати будь-які заходи. Плями на підлозі, що вказують на відтавання, є типовими ознаками.

Якщо мета інспекції пов'язана із споживанням, відбір проб слід проводити у виробника, оптового продавця / імпортера чи роздрібного продавця. Зразки для правозастосування слід брати якомога ближче як до походження проблеми, так і до продукту, тобто під час виготовлення або за імпорту, щоб оцінювання результатів та подальші дії були якомога ефективнішими.

Обладнання

Матеріали, з яких вироблене обладнання для відбору проб (зокрема інструменти, контейнери та кришки), не мають спричиняти будь-яких змін у зразку, що може вплинути на результати дослідження. Усі поверхні обладнання для відбору проб та контейнерів для зразків мають бути чистими та сухими, гладкими та без щілин, а кути бажано закруглені. Крім того, під час відбору зразків для мікробіологічного дослідження все використовуване обладнання має бути стерильним. Іноді вказується в правилах обладнання, яке

використовуватимуть, і саме його і слід використовувати. Також може бути використаний автоматичний або напівавтоматичний відбір проб. Таке обладнання має проходити відповідні випробування перед використанням та через регулярні проміжки часу під час використання.

Інструменти для відбору проб. Інструменти напр. совок (а не ложки), ножі, піпетки, свердла та зонди мають відповідати призначенню. Слід перевірити чи інструменти не виділяють різні частини партії. Є спеціальні зонди для відбору проб, прилади для відбору проб та шнеки. Ці спеціальні прилади–схожі на спис імплантати, що використовують для відбору зразків з текстильних мішків, що містять каву, крупи тощо.

Для мікробіологічних досліджень слід використовувати стерильні інструменти для відкривання герметичних упаковок та для відбору проб. У виняткових випадках можуть бути використані інструменти, що використовуються продавцем / власником магазину, і в цьому випадку це слід зазначити у звіті про відбір проб. Інструменти мають бути виготовлені з матеріалу, який легко чиститься та стерилізується. Важливо бути готовим до відбору зразків, маючи в наявності необхідні інструменти. Перед використанням інструментів слід якомога менше торкатися їх і захищати від забруднення, поки не буде проведено відбір проб. Переважно слід використовувати стерильні одноразові інструменти та контейнери. Для мікробіологічного аналізу повторний відбір проб є неприйнятним, оскільки він збільшує ризик забруднення.

Під час мікробіологічного відбору проб важливо вимірювати температуру. Не вимірюйте температуру на відібраній пробі, оскільки вимірювання може забруднити пробу. Слід застосовувати калібровані термометри, здатні вимірювати температури від $-300\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$, з точністю до $\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Калібрування має бути простежено до рекомендованих термометрів.

Сенсорні дослідження. Зразки для сенсорних аналізів зазвичай не отримують із великих партій, де наведені вище приклади пристроїв для відбору проб є доречними. Більш поширеними є природні або вироблені продукти (наприклад, ковбаси, консервні банки з горохом та пляшки вина), або «біологічні одиниці»: шинка, яблука, риба та ягоди. Навряд чи щипці чи зонд будуть особливо придатними для таких зразків. Для сенсорних аналізів процедура відбору проб залежатиме від того, як обираються одиниці для аналізу, а не від інструментів, які використовуватимуть.

Контейнери для зразків. Форма та місткість контейнера мають відповідати продукту, що відбирається. Ємності та кришки для відбору проб має бути з матеріалів та конструкції, що забезпечить належний захист зразка.

Примітка! Використовуйте стерильні контейнери для відбору проб для мікробіологічних досліджень. Ємності та кришки для зразків мають бути зі скла, відповідних металів або пластмаси. Можуть використовуватися одноразові пластикові контейнери, стерильні пластикові банки, ємності з пластикових

ламінатів, зокрема алюмінієву фольгу або поліетиленові пакети, з відповідними засобами закриття. Будь-яка пробка або втулка мають бути нерозчинними, не абсорбуючими та жиростійкими і не мають впливати на запах, аромат, властивості або склад зразка. Контейнер бажано щоб був непрозорим. Якщо контейнер прозорий або напівпрозорий, слід зберігати в темному місці.

Якщо зразок являє собою товар, який можна придбати в роздрібному магазині, може бути доречним використовувати звичайний інструмент, з яким мають справу в магазині, та упаковку товару, наприклад коробки для тортів або пакети на пекарні.

Важливо спілкуватися з лабораторією щодо необхідних запобіжних заходів, контейнерів, попередньої обробки та розміру лабораторної проби. Розмір контейнера має відповідати цілі. Контейнери повинні мати надійні кришки, що дозволяють їм щільно закриватися.

Техніка взяття проб

За необхідності слід дотримуватися правил та процедур відбору проб, описаних у методах.

Потрібно вживати запобіжних заходів, щоб уникнути забруднення зразків або будь-яких інших змін, що негативно впливають на результати досліджень. Під час відбору проб слід забезпечити, щоб вибірка була якомога репрезентативнішою для партії / цілі, і що обсяг вибірки достатній. Зразки повинні мати приблизно однакову вагу і братися на різних ділянках партії. Було показано, що відбір та змішування багатьох невеликих додаткових зразків у композит замість змішування невеликої кількості зразків більших одиниць / предметів матиме правильніше середнє значення партії. Кожна партія, що підлягає дослідженню, має бути відібрана окремо. Якщо одночасно відбирається кілька зразків з контейнерів або резервуарів, для різних випробувань спочатку відбирають пробу для мікробіологічного дослідження, а ємність для зразків закривається відразу після відбору проб. Не забувайте зазначати температуру в місці відбору проб.

Персонал для відбору проб. Відбір проб має проводити кваліфікований та відповідно підготовлений оператор. Уповноважений працівник відбору проб має проводити офіційний відбір проб. У програмах моніторингу протягом більш тривалого періоду часу всі оператори мають проходити однакову підготовку та інструкції, щоб отримати зразки, які можна порівняти. У складних ситуаціях перед відбором проб корисна пробна робота для розуміння протоколів та для виявлення потенційних проблем й підводних каменів.

Відбір проб твердих речовин із сипучих матеріалів. Для отримання репрезентативних зразків слід використовувати спеціальний пристрій для відбору проб з рідини чи сипучих речовин, зонди або шнеки для відбору проб

твердих речовин, круп, порошку чи паст з основної маси, а не лопатку. Коли використовують лопатку, відбирається лише верхній шар. Більш репрезентативна проба отримується у разі використання зонда. Однак мета відбору проб визначає, яку техніку слід використовувати.

Використовуючи лопатку ймовірність отримання частинок з нижнього шару невелика. Отже, зразки не будуть репрезентативними для партії. Існує ймовірність того, що товари нижчої якості можуть бути в нижньому шарі.

Під час відбору проб з рідин, суспензій та паст матеріал слід ретельно перемішати ручним або механічним способом. Для порошку рекомендується застосовувати механічний метод відбору проб. Зразок слід брати відразу після перемішування, або, якщо це можливо, поки продукт все ще перемішується.

Відбір проб з потоку. Для контролю певних процесів, для контролю якості сировини або кінцевого продукту або під час перевірки зернових культур може бути практичним відбирання проби з потоку. Щоб зробити вибірку якомога випадковішою, важливо взяти вибірку з усього потоку на частку часу (А), а не на вибірку з однієї конкретної частки потоку протягом усього часу (В). Шляхом вибірки з певної фракції існує ймовірність того, що певні частинки будуть невраховані.

Відбір проб предметів. Під час відбору проб продуктів у роздрібних упаковках, призначених для споживачів, слід брати проби з невідкритих упаковок, щоб уникнути забруднення з навколишнього середовища та інших осіб. Зразки слід відбирати якомога випадковіше відповідно до потреб дослідження.

Підготовка складеного зразка. Всі отримані зразки збирають і негайно поміщують у відповідний контейнер. Ємність використовуваних контейнерів для зразків має бути такою, щоб вони майже до кінця заповнюються зразком, що дозволяє належним чином перемішувати вміст, але уникаючи збивання під час транспортування. Зразок ретельно перемішують лопаткою відразу після збирання.

Для мікробіологічних досліджень складені зразки нефасованої їжі або зразки з більших упаковок не мають важити менше 200 г. Загальна кількість зразка попередньо розфасованих харчових продуктів, як правило, не має важити менше 100 г. Для хімічного аналізу розмір зразка та складених зразків залежать від параметра, що цікавить, а також його розподілу в матриці та неоднорідності матриці.

Для сенсорного аналізу розмір зразків залежить від продукту. Що стосується продуктів, які можна нарізати та змішати (морква / морквяні кубики, ковбаси / ковбасні слайси, риба / рибне філе тощо), мета аналізу визначає – варто спробувати на смак всі частинки проби чи всі частинки разом. Вибираються всі частинки, якщо метою є отримання інформації про розбіжності між

одинацями. Слід розглянути другий варіант, який зазвичай призводить до спрощення статистичної моделі, якщо метою є вирівнювання фізичних коливань.

Кількість відібраних зразків

Кількість зразків для вибірки, тобто обраний план відбору проб, визначається:

- метою відбору проб (НАССР і критичні контрольні точки на основі аналізу ризику);
- прийняттого довірчого інтервалу та прийнятною невизначеності;
- характеристики (однорідність) партії;
- характеристики (чим шкодять здоров'ю, розподілу тощо) аналізу;
- економічності.

Щодо певних аналітів / параметрів у харчових продуктах існують правила, інструкції та вказівки щодо методу відбору проб та кількості зразків, і їх слід використовувати там, де це можливо. Частіше за все збирається занадто мало зразків, але з економічних причин також важливо зазначити, що не слід відбирати більше зразків, ніж потрібно.

У планах відбору проб визначається кількість зразків, які потрібно взяти. Вони являють собою твердження про критерії прийнятності, що застосовують до партій, на основі відповідного аналізу необхідної кількості зразків. Під час дослідження властивостей, пов'язаних зі здоров'ям (наприклад, під час оцінювання мікробіологічного псування, мікробіологічної небезпеки, токсинів та канцерогенних сполук), слід застосовувати більш суворі плани відбору проб, ніж під час дослідження складових характеристик та товарних дефектів. Плани відбору проб описані у додатку.

Пломбування та маркування зразків

Зразки або контейнери для зразків мають чітко і постійно маркуватися безпосередньо перед або після взяття зразка, щоб забезпечити надійну ідентифікацію. Маркування мають проводити відповідно до протоколу відбору проб.

Якщо зразки мають бути перевезені в іншу лабораторію, на транспортному матеріалі слід чітко маркувати ім'я, адресу та номер телефону одержувача. Якщо транспортний матеріал потрібно повернути, ім'я відправника має бути написано на етикетці. Інші позначення на транспортному матеріалі можуть бути такі: «крихкий», «зберігати в холоді», «зберігати в замороженому стані» тощо.

Щодо онлайн-реєстрації зразків. Важливо, щоб зразок був позначений так, щоб він простежувався до інформації в електронній системі.

Якщо можливо, зразки розфасованих харчових продуктів слід доставляти в лабораторію в герметичній оригінальній упаковці. У разі великої кількості харчових продуктів, які не розфасовані, або упаковок, занадто великих для доставки в лабораторію, зразки слід перемістити в контейнери, використовуючи

обладнання, що гарантує, що зразок не забруднений мікробіологічно та / або хімічно. Якщо контейнер для зразків має бути офіційно опечатаний, це слід робити у присутності представників усіх зацікавлених сторін. Пломба може складатися з міцної стрічки або подібного матеріалу, що унеможлиблює фальсифікацію без пошкодження пломби. Дата, номер зразка та прізвище чи ініціали персоналу, що займається відбором проб, і, можливо, штамп або подібне йому, зазначають на печатці. Якщо потрібно кілька зразків, всі мають бути підготовлені однаково. Підготовка лабораторної проби, зменшення проби, подрібнення та гомогенізація мають проводити у відповідних (захищених) місцях.

Звіт про відбір проб

Заповнений звіт про відбір проб має містити інформацію, перелічену нижче, яка забезпечує однозначну ідентифікацію відбір проб та надає інформацію про характеристики вибірки:

- Місце відбору проб (наприклад, виробник, оптовий / роздрібний продавець, транспортний засіб, споживач та приміщення, холодильник, лічильник тощо).

- Номер партії (ідентифікація) / код ферми (+ дата виробництва, дата упаковки, термін придатності та, можливо, номер виробництва).

- Дата та час відбору проб.

- Назва та характер (склад) зразка.

- Параметри, що підлягають аналізу.

- Чітке маркування відповідно до зразка, напр. лабораторний код.

- Назва виробника, можливо, реєстраційний або авторизаційний код.

- Для товарів, які швидко псуються: температура зразка або приміщення, де він зберігався на момент відбору проб.

- Інформація про продукти, які відбирають, наприклад, де взяті проби (зовні, посередині), підготовка, обробка, зберігання, час доставки.

- Інформація про транспортні умови; час відвантаження, температура тощо.

- Інформація про зразки та герметизацію.

- Також має бути внесена додаткова інформація, що описує відібраний продукт або інша інформація, яка може допомогти лабораторії, або для оцінювання результатів.

- Причина відбору проб, напр. рутинна перевірка, скарга, підозра на харчове отруєння, моніторинг перевірки якості, сенсорні зміни.

- Метод відбору проб, якщо метод відрізняється від методу, який використовується як звичайний / встановлений метод, або якщо є зауваження щодо відбору проб.

- Ім'я, адреса, електронна пошта та номер телефону персоналу / співробітника, який здійснює відбір проб.
- Назва, адреса, електронна пошта та номер телефону лабораторії.

У разі підозри на харчове отруєння звіт про відбір проб повинен бути доповнений інформацією про перебіг хвороби (час інкубації та симптоми) та іншою відповідною інформацією.

Звіт про відбір проб має бути підписаний, а також має бути зроблено необхідну кількість копій. У деяких випадках може знадобитися підписати протокол відбору проб як персоналу / службовцю, що займається відбором проб, так і представнику продавця продуктів харчування. Процедури в таких ситуаціях мають бути описані у внутрішніх рекомендаціях щодо відбору проб. Зазвичай компанія отримує можливість отримати зразок / копію зразка, коли її продукція відбирається з метою примусового контролю, торгівлі та суддівської тяжби. Цей зразок слід брати в тому самому місці, часі, ітаким самим способом, а також він має максимально нагадувати офіційний зразок. Один із зразків надсилають на аналіз. Якщо є сумніви щодо результатів аналізу першого зразка, аналізують другий зразок (контрольний зразок).

Умови транспортування та доставки зразків

Під час обробки, зберігання та транспортування зразків з ними не має відбуватися жодних змін до їх вивчення. Слід застосовувати всі необхідні запобіжні заходи, щоб уникнути забруднення або зміни складу зразків під час транспортування або зберігання. Зразок має бути відправлено у лабораторію якомога швидше після відбору проб. Час доставки зразків до лабораторії слід узгодити заздалегідь із агентами доставки. Лабораторія також має бути інформована про кількість та тип зразків, що підлягають дослідженню.

Товари, що швидко псуються, слід аналізувати якомога швидше після відбору проб. Тому дуже важливо, щоб такі зразки транспортувалися до лабораторії якомога швидше і зберігали їх за встановленої температури. Слід зазначити, що деякі особливо швидкопсувні товари, напр. свіжа риба та молюски не можна транспортувати дуже довго, до того як вони зіпсуються. Під час транспортування таких продуктів харчування важливо мінімізувати час транспортування та забезпечити якомога нижчу температуру зразка, не заморожуючи його.

Свіжу рибу та молюсків слід упаковувати в подрібнений лід або сніг, а також перевозити в ізольованих та герметичних контейнерах. Інші контейнери прийнятні, якщо зразки зберігаються нижче 2 °C протягом усього транспортування.

Для мікробіологічних досліджень аналіз починають протягом 24 годин після відбору проб, разом з транспортуванням. Для деяких параметрів у воді може знадобитися коротший інтервал часу між відбором проб та аналізом.

Під час відбору зразків заморожені зразки слід зберігати в попередньо охолодженому контейнері і поміщати в морозильну камеру відразу після відбору проб. Потім їх слід транспортувати до лабораторії в ізольованих коробках. Якщо тривалість транспортування така, що існує ризик відтавання зразків, слід використовувати сухий лід (сніг з твердого двоокису вуглецю) або, можливо, охолоджувальні елементи.

Під час транспортування сухих продуктів або консервів охолодження зазвичай не потрібно. Однак температура не має перевищувати 25 °С, а зразки мають бути захищені від високої вологості.

Зберігання та попередня обробка зразків у лабораторії

Під час відбору проб та підготовки лабораторних зразків слід вживати запобіжних заходів, щоб уникнути будь-яких змін, які можуть вплинути на вміст, аналітичне визначення або зробити зразки нерепрезентативними.

Реєстрація зразків у лабораторії. Після прибуття до лабораторії слід перевірити:

- чи зразки супроводжує протокол відбору проб (накладна), що містить необхідну інформацію;
- маркування зразків узгоджують зі звітом; якщо ні, зразки слід викинути;
- чи зразки були правильно транспортовані (за необхідності перевірити температуру);
- чи цілі контейнери для зразків.

Лабораторія повинна мати письмову стандартну процедуру для перевірки та відхилення зразків.

Якщо зразки надходять до лабораторії після закінчення зазначеного періоду часу від забору зразків, і їх пізно досліджувати (зокрема, це стосується мікробіологічного аналізу), або якщо температура зразка занадто висока, або якщо зразки (упаковка або обгортка) пошкоджені чи забруднені під час транспортування, слід розглянути можливість відхилення зразків. Однак, якщо такі зразки все таки будуть аналізувати, зазначені недоліки слід завжди фіксувати та зазначати у звіті про аналіз. Зразки їжі, які підозрюють у тому, що вони викликають захворювання, слід завжди досліджувати, навіть якщо помічено недоліки під час транспортування. Етичні причини також вказують на те, що сенсорний аналіз, де включена дегустація, не слід проводити на потенційно отруйних зразках.

Підготовка лабораторних зразків. Після первинного відбору проб лабораторія отримує або складений зразок, або одну пробу, і якщо відбір проб проводили правильно, зразок представляє партію. Зразок може складатися від декількох грамів до багатьох кілограмів. Для невеликих кількостей зразків лабораторія може проаналізувати всю пробу, але в більшості випадків лабораторії доведеться зменшити обсяг проби. Часто для аналізу потрібно лише

кілька міліграмів або грам. Зазвичай лабораторія забезпечує аналітичні результати з похибкою вимірювань із 95 % довірчим інтервалом, також тому, що це вимагається органами з акредитації. Вимірювання має містити невизначеність, яка походить від зменшення лабораторної проби / вилучення зразків (вторинна проба). Цей внесок у невизначеність часто може бути більшим, ніж внесок в аналіз. Лабораторія має завжди прагнути до того, щоб невизначеність результатів була якомога нижчою, і тому повинна мати добре описані та відповідні процедури і обладнання для зменшення зразків та відбору підпроб. Багато видів зразків (круп, сухий корм та порошок) можна вигідно зменшити за допомогою комерційного пристрою для розділення проб.

Використовуючи такий розділювач, зразок можна розділити на декілька частин з дуже однорідним складом, що також може бути задокументовано статистично. Якщо розділити зразки за допомогою обладнання неможливо через занадто великі частинки, слід розглянути варіант подрібнення зразків перед поділом.

Зазвичай використовують метод розділення проби на 4 частини для зменшення обсягу вибірки. Весь складений зразок гомогенізують (якщо це можливо), а потім ділять на 4 частини / частини. Потім протилежні чверті об'єднують і знову ділять на 4, поки не буде отриманий бажаний розмір лабораторної проби.

Після зменшення лабораторної проби об'єм проби все ще зазвичай перевищує десятикратний об'єм, необхідний для аналізу. Зменшена проба часто є неоднорідною, хоча вона видається однорідною. Таким чином, зразок потрібно подрібнити або, наприклад, перетворити в суспензію перед відбором однієї або декількох проб, які потім аналізують окремо або у вигляді складеної проби.

Для твердих та рідких зразків харчових продуктів необхідні спеціальні процедури поділу та відбору підпроб. Часто для цього доступні промислові методи, які описано в стандартах (наприклад, молочні продукти, стандарти ISO / IDF). Тверді сири мають дуже неоднорідний склад від поверхні до центра. Отже, необхідно відібрати геометрично репрезентативні зразки, а зразок сиру слід натерти перед аналізом, наприклад, під час аналізу жиру та білка.

Протилежні чверті має бути вилучено.

Ще одним складним напрямом є аналіз рибної сировини. Аналіз філе риби для визначення, наприклад, жиру та води, проводять, як правило, після гомогенізації в кухонному комбайні. Коли м'ясо рибного фаршу виглядає однорідним, підпроби відбирають для аналізу. Випробування показали, що фарш неоднорідний навіть після гомогенізації в кухонному комбайні, і що це може статистично впливати на комбіновану невизначеність вимірювань [пор. Лабораторне відбір зразків для хімічного аналізу].

Обробка зразків може мати прямий вплив на результати, і тому може знадобитися вжити надзвичайних заходів для захисту зразка. Багато вітамінів

розкладаються, якщо зразок не захищений від світла за допомогою УС-фільтрів на вікнах та спеціальних світильників. Процеси подрібнення можуть видалити воду із зразків, і, наприклад, під час аналізу корму корекцію втрат води вносять до кінцевого аналітичного результату.

Оптимізація підпроб може базуватися на записі аналітичної невизначеності, розділеної на типи зразків. Якщо лабораторія реєструє результати повторних визначень для різних матриць, аналіз даних може показати, які матриці забезпечують найбільшу розбіжність. Тоді лабораторія може працювати над цілеспрямованим удосконаленням. Часто результатом є те, що візуальне оцінювання дає помилкове відчуття безпеки; зразки, які здаються однорідними, можуть бути дуже неоднорідними. Особливо для дослідження деяких аналітів, таких як вітаміни та мінерали, це може бути складним завданням.

Для сенсорного оцінювання продуктів природа продукту визначає спосіб подачі зразків. Також важлива статистична модель; якщо встановлена статистична модель, слід дотримуватися певної програми.

Наприклад, під час оцінювання моркви існує кілька варіантів:

1) Кожному оцінювачу подається одна або кілька морквин *a*. Оцінювач дає середню оцінку, якщо одночасно подають кілька морквин *b*. Оцінювач дає оцінку кожній морквині окремо.

2) Усі морквини зі зразка (що репрезентують сорти, місце вирощування, умови зберігання чи інші чинники) нарізають кубиками. Кожен оцінювач отримує певну кількість поданих зразків (зазвичай 50–100 г) або сенсорних копій, необхідних для статичної моделі.

3) Морква ділять на стільки частин, скільки оцінювачів на панелі. Можливим недоліком є те, що смак моркви залежить від того, наближається чи частина до верху або близько до кінчика *a*. Оцінювачі отримують випадково частини моркви *b*. Кожен оцінювач отримує завжди однакову частину моркви.

Варіант 3 може здатися дещо ненормальним, частково тому, що він передбачає, що морква велика та / або наявна дуже мала кількість оцінювачів. Однак 3*b* часто використовують на великих розмірах філе та на подібних зразках. Практичні міркування щодо кодування та подачі також відіграють певну роль: зазвичай неможливо заздалегідь підготувати зразок та проаналізувати його, тобто подати його оцінювачам, коли це підходить для керівників лабораторій. Зокрема, під час підготовки (зазвичай нагрівання) зразків можуть виникнути проблеми.

Зберігання зразків до і після дослідження. Коли зразки зберігають у лабораторії, вони мають бути захищені від змін, спричинених хімічними, фізичними чи механічними чинниками.

Лабораторія повинна мати достатньо охолоджувальних приміщень для зберігання зразків / залишків зразків, але їх не слід зберігати разом з мікробіологічними середовищами, реагентами тощо. Під час зберігання зразків

у холодильнику або морозильній камері до або після транспортування температура холодильника має бути між 1 °C і 5 °C, а в морозильній камері – -15 °C або нижче.

Зразки, які слід зберігати в лабораторії протягом певного періоду часу перед дослідженням, наприклад у зв'язку з дослідженнями стабільності, слід зберігати відповідно до інструкцій щодо зберігання на упаковці. Температуру таких сховищ мають контролювати з такою самою точністю, як і в інших пристроях.

Зразки сушених або консервованих продуктів можуть зберігатися за кімнатної температури.

Залишки зразка слід зберігати так само, як і вихідний зразок (копію), протягом певного періоду часу, відповідно до лабораторної системи забезпечення якості. Умови зберігання мають бути оцінені для кожного окремого зразка. Зразки продуктів, які швидко псуються, слід охолоджувати / заморожувати.

Попередню обробку зразків для мікробіологічного дослідження. Попередня обробка зразків для мікробіологічних досліджень мають проводити відповідно до NMKL 91, 6. Ред., 2010: Підготовка дослідної проби та первинна суспензія продуктів харчування та кормів для тварин для кількісного мікробіологічного дослідження. Для продуктів, що утворюють грудочки або твердий гель, може знадобитися розведення вище, ніж 1:10, що є найпоширенішим розведенням.

Заморожені продукти слід розморожувати за максимальної температури + 4 °C протягом 18 годин. Менші зразки, що легко розморожуються, можна поміщати в термостатичну шафу за температури максимум 37 °C протягом 15 хвилин.

Для гомогенізації можуть використовувати різні типи обладнання. Гомогенізатор типу Stomacher є найкращим, оскільки він простіший у використанні, ніж інше схоже обладнання. Однак він не підходить для гомогенізації продуктів, що містять тверді частинки, які можуть проникнути в поліетиленові пакети. Стерильні та нестерильні поліетиленові пакети, із фільтрами та без них, є у продажу для гомогенізаторів Stomacher. Кожен випадок необхідно оцінювати індивідуально. Час гомогенізації має бути фіксованим, і не можна допускати, його змінювання від зразка до зразка; тридцять секунд підходить для більшості продуктів. Бажано використовувати електронний таймер, який зупиняє гомогенізацію після встановленого часу.

Інтерпретація аналітичних результатів

Невизначеність, пов'язана з результатами аналізу, присутня завжди. Невизначеність аналізу може бути внесена в результат, але про невизначеність у зв'язку з відбором проб згадується рідко. Ця розбіжність існує, незважаючи на той факт, що невизначеність, пов'язана з відбором проб, напевно, набагато

більша порівняно з невизначеністю, отриманою під час аналізу. Однак оцінювання невизначеності відбору проб є більш багатостороннім та складним.

Багато мікробіологічних вимірювань є частиною нагляду (наприклад, контроль якості), і там часто не встановлено обмеження. Регламент ЄС про мікробіологічні критерії (ЄС 2073/2005) передбачає встановлені обмеження для декількох патогенних мікроорганізмів, а також для кількох гігієнічних та індикаторних організмів.

Похибка вимірювання (ПВ) від вибірки, як правило, буде більшою, ніж похибка, пов'язана з аналізом. На додаток до ПВ з аналізу та відбору проб, гетерогенність та систематична похибка відбору проб будуть входити до загальної ПВ.

3.2. Матриці та прикладні технології

3.2.1. Агропродовольство

3.2.1.1. М'ясні продукти/М. Мікіашвілі/

Сфера дії

У цьому документі описано методи відбору проб, зберігання та транспортування м'яса та м'ясних продуктів, зокрема м'ясо та продукти з птиці.

Методи відбору проб

Загальні вимоги

Відбір проб проводить фахівець, уповноважений зацікавленими сторонами та належним чином навчений у відповідній галузі. Він має діяти самостійно і не допускати втручання третьої сторони, під свою відповідальність він може скористатися допомогою інших осіб. Фахівець з відбору проб та його помічники мають вжити відповідних заходів для запобігання забрудненню запасів або партії та відібраних проб (наприклад, помити руки перед відбиранням проб).

До зразків, що надсилають до лабораторії, слід додати супровідний документ (наприклад, звіт або протокол або акт), який підписують фахівець з відбору проб та представники зацікавлених сторін.

Супровідний документ має містити таку основну інформацію:

- ім'я та адресу фахівця з відбирання проб;
- імена та адреси представників зацікавлених сторін (якщо вони є);
- місце, дата та час відбору проб;
- тип та джерело (походження) поставки або партії;
- кількість одиниць продукції, що складають поставку або партію;

- маркування (знак) та номер партії;
- ідентифікація використаних вагонів, вантажівок або суден;
- назву пункту відвантаження;
- назву пункту призначення товару;
- дату прибуття доставки або партії;
- найменування та адресу продавця (виробника);
- ім'я та адресу покупця;
- номер та дату рахунка-фактури або контракту;
- метод відбирання проб;
- кількість зразків, відібраних з кожної партії;
- позначення (назву) відібраних зразків;
- номер та маркування партії (партій), з якої були взяті зразки;
- масу окремих одиничних зразків;
- назву організацій (наприклад, лабораторія, центр), куди надсилають вибрані зразки.

У супровідному документі також слід зазначити всі чинники, які можуть вплинути на відбір проб, такі як умови пакування та умови навколишнього середовища (температура та вологість), температуру продукту та певний тип зразків, методи стерилізації інструментів та контейнерів, що використовують для відбору проб, а також будь-яку іншу спеціальну інформацію, що стосується матеріалів, з яких відбираються зразки.

За можливості представникам зацікавлених сторін слід надати зразок.

Кожен зразок, надісланий до лабораторії, має бути ізольований (запечатаний) та промаркований. Пломбування мають здійснювати таким чином, щоб доступ до вмісту або етикетки був відкритий лише тоді, коли печатку пошкоджено.

Етикетки повинні мати якість та розмір, відповідний до використання (наприклад, злегка забарвлену, жиростійку, водонепроникну пластину з посиленням отвором).

Маркування має бути незмивним і його неможливо було стерти та містити інформацію, необхідну для ідентифікації одиничних зразків:

- тип та джерело (походження) поставки або партії (партій);
- кількість одиниць продукції, з яких складається поставка або партія (партії);
- місце, дату відбору проб;
- назву продавця (виробника) та покупця;
- номер та маркування партії (партій), з якої було взято одиничні зразки;
- температура навколишнього повітря на момент відбору проб.

Вимоги до обладнання та контейнерів, що використовуються для відбору проб

Загальні вимоги

Матеріали, що використовують для виготовлення ємностей, що безпосередньо контактують із зразками, мають бути водо- та жиростійкими, нерозчинними та неабсорбуючими.

Вмісткість і форма ємності для відбору проб мають відповідати розміру одиничного зразка, який потрібно взяти, і бути надійно закритою, наприклад, використовуючи пляшки, банки з гумовими, пластиковими корками, металеві або пластикові гвинтові ковпачки. Перед закриттям ковпачок має бути покритий тонкою плівкою з інертного матеріалу. Різьбові ковпачки повинні мати ущільнювальну прокладку з інертного матеріалу.

Матеріали та обладнання не мають впливати на результати дослідження. За необхідності вплив світла та / або кисню слід мінімізувати.

Вимоги до обладнання та пакування, що використовують для відбору зразків для хімічного аналізу

Обладнання та контейнери для відбору проб мають бути сухими та чистими та не впливати на хімічний склад продукту.

Вимоги до обладнання та пакування, що використовують для відбору зразків для сенсорного (органолептичного) аналізу

Обладнання та контейнери для відбору проб мають бути сухими та чистими та не впливати на смак чи запах продукту.

Вимоги до обладнання та контейнерів, що використовуються для відбору зразків, призначених для мікробіологічного аналізу та для інших цілей (наприклад, для біологічних, паразитологічних, серологічних, гістологічних, токсикологічних тестів) або для визначення стійкості продуктів методом контролю температури

Обладнання та контейнери для відбору проб мають бути чистими, стерильними та не впливати на мікрофлору харчових продуктів.

За необхідності обладнання та контейнери для зразків стерилізують одним із таких способів:

1) волога стерилізація – не менше 20 хвилин за температури не нижче 121 °C;

2) суха стерилізація – не менше 1 години за температури не нижче 170 °C в сушильній шафі з примусовою циркуляцією повітря для підтримки відповідної температури в шафі або гарячого повітря в стерилізаторі без примусової циркуляції повітря за температури від 180 до 185 °C протягом 15 хвилин або за температури від 160 до 165 °C протягом 120 хвилин.

Користування інструментами дозволяється шляхом занурення в етиловий спирт з подальшим підпалюванням.

Якщо неможливо використовувати ці методи, а також якщо обладнання або упаковку слід використовувати негайно після стерилізації, можна застосувати один із таких методів:

- 1) вплив пари протягом 1 год за 100 °С;
- 2) занурення в 96 % етанол з подальшим підпалюванням до повного згоряння етанолу;
- 3) обробка всіх робочих поверхонь полум'ям вуглеводневого газу (пропаном або бутаном).

Кількість відібраних зразків

Кількість зразків, які потрібно взяти для отримання репрезентативного первинного зразка поставки або партії (партій), має відповідати стандартним методам відбору проб для конкретного виду продукції, зазначеного в контракті або іншій угоді між зацікавленими сторонами.

Для різних типів досліджень (хімічний, мікробіологічний, фізичний або сенсорний аналіз) відбір проб проводять окремо для кожного типу.

Методи відбору проб

Класифікація м'яса та м'ясних продуктів для відбору проб

Для визначення методу відбору проб м'ясо та м'ясні продукти класифікуються за видами:

А – поставка або партія м'яса та м'ясних продуктів, у вигляді окремих продуктів або окремих упаковок продуктів будь-якої маси (наприклад, ковбаси, сосиски; напівфабрикати, фарш, упакований під вакуумом; ковбаса нарізана; консерва варена, шинка) або у вигляді шматочків м'яса, або тушок (частин тушок) масою не більше 2 кг;

В – тушки, частини туш, м'ясо, солоне, сушене або інші способи консервування шматками вагою понад 2 кг (наприклад, подрібнений бекон, половина бекону, нарізане свіже або заморожене м'ясо, свіже або заморожене кісткове м'ясо, яловича тушка або чверть, свиняча напівтуша, тушка баранини, тушка птиці, оленина), а також м'ясо, отримане методом сепарації або сублимоване м'ясо.

Залежно від маси та товарної якості продукції може знадобитися відібрати вторинні зразки, використовуючи лише частину (частини) кожного первинного зразка, беручи до уваги типи досліджень, для яких їх відбирають.

Відбір зразків м'яса або м'ясних продуктів типу А

Як первинну пробу беруть частину або цілий шматок продукту. Відповідно до стандартних методів відбору проб для конкретного виду продукції з кожної партії відбирають необхідну кількість первинних зразків.

Забір зразків м'яса та м'ясних продуктів типу В

Відповідно до стандартних методів відбору проб для конкретного виду продукції з кожної партії відбирають необхідну кількість первинних зразків і упаковують або для подальшого відбору вторинних зразків для руйнівного контролю в лабораторії (наприклад, для хімічних або мікробіологічних досліджень), або для неруйнівного контролю (наприклад, візуальний огляд, органолептичний аналіз, мікробіологічне дослідження за допомогою тампона).

Жодна окрема проба, взята з туші або іншого великого шматка м'яса, не може бути репрезентативною для продукту загалом, проте практично неможливо провести дослідження цілої туші або великого шматка м'яса. Тому для відбору первинних або вторинних проб (залежно від їх призначення) слід обрати один із таких методів відбору проб.

Забір проб, як правило, здійснюється такими способами:

а) одиничні зразки з поверхні (наприклад, для виявлення бактерій групи кишкової палички або сальмонел) відбирають шляхом протирання всієї поверхні продукту (або вибраних ділянок) великими вологими тампонами або (для кількісних мікробіологічних досліджень) шляхом маркування, використовуючи шаблон (трафарет) ділянок, з яких потім вирізають зразок або, якщо йдеться про заморожене м'ясо, вишкрібають з поверхні;

б) з первинної проби масою від 500 до 1000 г, взятої для хімічного або мікробіологічного дослідження, беруть вторинну пробу з боку поверхні свіжого зрізу, завдаючи мінімальної шкоди тканині;

в) зразок м'яса для мікробіологічного дослідження (наприклад, для визначення причин псування кісток) береться з ураженої частини туші за допомогою інструменту з нержавіючої сталі для розсічення м'яса, а із замороженого м'яса – за допомогою терки;

г) зразки жиру (наприклад, для визначення вмісту жиророзчинних речовин, таких як пестициди) беруть, якщо це можливо, з тваринного ниркового жиру або внутрішнього жиру птиці;

д) зразки соку, який виділяється (наприклад, із замороженого м'яса, упакованого під вакуумом) беруть асептично за допомогою стерильних шприців та / або колб та банок через фольгу або після відкриття упаковки. Якщо м'ясо повертається до партії, це потрібно робити після розпакування під вакуумом.

Температура

Температуру кожної партії має бути зазначено, якщо це можливо.

Пакування зразків

М'ясо та м'ясні продукти типу А

Якщо окремі одиничні зразки знаходяться у герметичному контейнері, додаткова упаковка не потрібна. Для інших видів продуктів необхідно помістити кожен зразок у відповідну тару, ретельно закрити, ізолювати та маркувати.

М'ясо та м'ясні продукти типу В

Кожен окремий зразок упакований у пакет з відповідного полімерного матеріалу, ретельно закритий, ізолюваний та маркований.

Мікробіологічні тампони поміщають у стерильні контейнери, а зразки сепаруючого соку – у стерильні колби або пляшки.

Примітка: Якщо є можливість упаковувати різні одиничні зразки разом в один або кілька контейнерів, тоді немає потреби ізолювати та маркувати кожен окремий зразок, дотримуючись вимог щодо ізоляції та маркування цих контейнерів.

Транспортування та зберігання відібраних зразків

Відібрані зразки надсилають до лабораторії відразу після відбору проб, і температура зразка має відповідати температурі зберігання продукту; у разі охолодження продуктів харчування, зразки транспортують:

а) за температури від 0 до 2 °С, якщо дослідження проводитиметься протягом 24 годин;

б) за температури не вище мінус 24 °С, якщо дослідження проводитиметься більше ніж через 24 години; зразки для фізичного або сенсорного (органолептичного) аналізу, як правило, не мають заморожувати.

Під час транспортування необхідно вжити запобіжних заходів проти потрапляння прямого сонячного світла на вибрані зразки. Зразки мають доставляти до лабораторії в цілому стані, без ушкодження цілісності упаковки та ізоляції (пломб).

3.2.1.2. Морепродукти та риба/Н. Поварова/

Організація роботи виробничої лабораторії

Провідна роль у забезпеченні випуску підприємствами високоякісної продукції належить відділам технічного контролю і заводським лабораторіям.

Роботу ВТК і заводських лабораторій з підвищення якості продукції мають проводити одночасно в декількох напрямках.

До основного напрямку належать контрольні-аналітичні функції заводської лабораторії. ВТК і заводська лабораторія здійснюють контроль виробництва в такому порядку:

1) контролює якість сировини;

2) контролюють правильність ходу технологічного процесу відповідно до технологічних інструкцій з метою підвищення якості продукції та зменшення втрат у виробництві;

3) виявляють причини браку і зниження сортності рибопродуктів і розробляють заходи щодо їх ліквідації;

4) перевіряють якість допоміжних матеріалів, щоб не допустити використання у виробництві недоброякісних матеріалів, що можуть викликати зниження якості продукції або підвищення втрат. Перевіряють якість тари і пакувальних матеріалів з метою забезпечення збереження товару під час транспортування і зберігання в торговельній мережі;

5) перевіряють витрати сировини на одиницю продукції, витрати матеріалів і тари з метою зменшення втрат виробництва і зниження собівартості продукції;

б) контролюють якість готової продукції з метою забезпечення випуску із заводу виключно стандартних високоякісних товарів. Всі види продукції, що випускається підприємством, можуть бути поставлені споживачеві тільки після якісного приймання їх ВТК або лабораторією.

Терміни та визначення

Партія—кількість товару однорідного за якістю та найменуванням, виготовленого протягом визначеного інтервалу часу в одних і тих самих умовах, призначеного для імпорту / експорту, оформленого одним документом, що засвідчує якість та однією вантажно-митною декларацією.

Вибірка—кількість одиниць товару, які відбирають від загальної кількості товарних одиниць для перевірки.

Об'єм вибірки—кількість товару, що відбирають з кожної партії.

Зразок— окрема одиниця досліджуваного об'єкта (товару).

Проба—кількість нештучного товару чи частина зразка, що відібрана з партії, яку досліджують, тотожна складом і ознаками партії.

Точкова проба— проба, відібрана за один прийом відпродукції. Вона характеризує якість товару в одному об'єкті чи тарному місці або на певному заданому рівні резервуара чи транспортного засобу.

Об'єднана проба— складена з ретельно перемішаних точкових проб, відібраних у відповідному порядку та об'єднаних у вказаному співвідношенні, для якої характерні середні значення характеристик товару.

Аналітична проба— частина об'єднаної проби, яку використовують для лабораторного дослідження.

Контрольна проба— частина об'єднаної проби, яка зберігається в лабораторії протягом двох місяців і використовується для арбітражних досліджень.

Арбітражна проба— частина об'єднаної проби, яка зберігається у особи, що направила зразок на дослідження, або в дослідницької організації, в опечатаному цією організацією вигляді. Використовується для арбітражних досліджень під час виникнення розбіжностей або оскарження прийнятого дослідницькою організацією рішення.

Процедура відбору проб та зразків

На переробні заводи жива, заснула, охолоджена або підсолена риба надходить великими партіями в прийомних і транспортних судах уже розсортованої за породами, розмірами і свіжістю. Однак трапляються випадки, коли на місці лову сортування риби неможливе і риба надходить змішаною за породами і розмірами, а іноді і за якістю.

Вельми істотну допомогу під час вирішення питання про якість риби-сировини можуть надати відомості про час (дату), місце, знаряддя і характер лову риби, а також терміни та умови перевезення. Ці відомості, отримані приймальником від здавача, можуть внести ясність під час розпізнавання причин і ступеня дефектів сировини.

Жива риба, доставлена рибозавод у прорізах, не викликає сумніву щодо свіжості. Для визначення інших ознак (розміру, вгодованості, стану зовнішніх покривів) від живої риби відбирають зразок у такий спосіб: виловлюють зюзьгою з різних місць прорізи окремі екземпляри риби, які і піддають зовнішньому огляду. За наявності в прорізи снулої риби її відділяють від живої.

Більш складним є відбір зразків свіжої, охолодженої або підсоленої риби, доставленої на рибозавод видобувними, прийомними або транспортними судами. Розмір вихідного зразка для визначення якості риби залежить від кількості риби на судні, а також від ступеня її однорідності, однак він не має перевищувати 1–2 ц.

Відбір зразків ускладнюється можливою неоднорідністю риби за якістю в різних шарах одної і тієї самої скрині або відсіку. Тому, якщо це допускається умовами, після попереднього зовнішнього огляду всієї риби і вибірково окремих екземплярів відбір вихідного зразка виробляють в три прийоми: на початку вивантаження скрині або відсіку, після вивантаження половини всієї риби, і нарешті, від останньої чверті. Для кращої характеристики якості риби кожному окрему виїмку складають з декількох приватних виїмок. Окремі виїмки з'єднують разом, складаючи таким чином вихідний зразок для всієї партії.

Після визначення загальної ваги вихідного зразка рибу розсортовують за породами, розмірами і якістю в окремі таровані носилки.

Ще більші труднощі зустрічаються під час відбирання зразка для лабораторного дослідження, оскільки, володіючи мінімальною вагою, він має водночас досить повно характеризувати партію риби органолептичними прийомами і є зайвим за очевидної свіжості риби або, навпаки, явним її псуванням.

Під час відбору лабораторних зразків можуть настати такі два випадки.

1. Вихідний зразок є за зовнішніми ознаками абсолютно однорідним за свіжістю, і, таким чином, будь-який окремих екземпляр риби буде достатньо характеризувати всю партію. Однак рекомендується брати не менше трьох-п'яти примірників залежно від розмірів риби. Дрібну рибу – кільку, тюльку, хамсу,

салаку та ін., відбирають за вагою в кількості не менше 500 г. Відібрані екземпляри негайно надходять на дослідження, і результати випробування відносять до партії загалом.

2. Вихідний зразок є сумішшю примірників риби різної свіжості. У такому випадку виявляється необхідність сортування вихідного зразка за зовнішніми ознаками. Потім від кожної частини вихідного зразка, що складається з одноманітною за якістю риби, після її зважування відбирають середній зразок для лабораторного дослідження так само, як і при однорідній партії. Знаючи вагові співвідношення окремих категорій в початковому зразку, результати дослідження можна віднести до цілком певної вагової частини цієї партії. Астраханське відділення ВНИРО (2) рекомендує такі практичні прийоми відбору зразків риби, доставленої на завод в підсоленому вигляді.

Для визначення якості (сортності) риби з кожної скрині транспортного судна роблять 25–30 виїмок.

Вага кожної виїмки має бути:

а) для оселедця нерозібраного – близько 5 кг;

б) для дрібного оселедця, пузанки, а також вобли від 2,5 до 3,0 кг.

Відібраний вихідний зразок (сума всіх виїмок) розсортовують за зовнішніми ознаками і отриманий результат відносять до всієї партії. У разі коли не потрібно визначення сортності, а тільки виявлення середньої солоності риби і партії, застосовують наступний спосіб відбору зразків зі скринь транспортних судів.

З різних місць кожної скрині відбирають 150–200 екземплярів риби переважаючого розміру. Відібрану рибу розсортовують за консистенцією на три категорії: а) жорстку, б) середню і в) м'яку. Від кожної категорії, пропорційно її вазі, відбирають відповідну кількість риби для складання середнього зразка для хімічного дослідження.

Основні питання експертизи

Хімічний аналіз дає успішні практичні результати лише в тому випадку, коли зразок для дослідження має склад, типовий для всієї партії.

Кількість зразків, що беруться для проведення аналізів, визначають заздалегідь, керуючись вимогами відповідних нормативних документів. Працівник, що займається відбором зразків, має взяти, принаймні, мінімальну кількість товарів, необхідну для лабораторних досліджень. У випадку герметично запакованої тари, що містить пакунки для роздробної торгівлі, найменший пакунок може звичайно вважатися відповідним зразком для досліджень.

Досліджуваний зразок має характеризувати типові властивості товарів всієї партії, тому й метод його одержання має важливе значення. Більшість нерідких матеріалів, і деякі рідкі матеріали, можуть бути

неоднорідними, тому потрібно провести старанну роботу для одержання відповідного зразка з дуже великої партії. У тих випадках, коли партія, з якої беруть зразок, велика, потрібно взяти невеликі порції зразка з різних місць партії, щоб потім комбінувати їх в один легко оброблюваний зразок, що має такий середній склад, як і вся партія. Якщо працівник, що відбирає зразки, не має технічної можливості змішати порції зразка чи не може визначити однорідні порції, чи ні, він має відправити кожен порцію зразка окремо.

Рідкі зразки, що зберігаються в металевих банках чи бочках, потрібно брати після струшування, перемішування чи збовтування достатньою мірою, тому що вони не завжди можуть бути однорідними.

Порошок, часточки чи мулисті зразки, які заповнені в тару, потрібно збирати з порції, яка не контактує безпосередньо з повітрям. Як правило, ці зразки потрібно брати з більш ніж двох окремих контейнерів. Проте це правило не стосується однорідних товарів, таких як продукти в консервних банках чи пляшках.

Такі зразки, як нафтопродукти чи меляси, які зберігаються у баку чи цистерні, потрібно брати з кожного з трьох шарів (зверху, посередині і знизу) після того, як бак чи цистерну наповнюють і вмісту дають час стабілізуватися.

Для запобігання чи зведення до мінімуму забруднення, слід бути обережним у застосуванні методів взяття зразків, пристроїв для взяття зразків і тари для зразків (наприклад, тара, виготовлена з поліетилену чи поліпропілену з подвійним ковпачком, один з яких є нарізним ковпачком, щоб уникнути втрати і забруднення вмісту).

Для зразків, чутливих до атмосфери (вологи, діоксиду вуглецю і т. ін.), потрібно застосовувати швидке взяття зразків. Завжди слід використовувати чистий і сухий апарат для взяття зразків і тару. Зокрема, для зразків, чутливих до сонячного світла, використовують темну тару.

Після того як зразок взятий, потрібно вжити суворих запобіжних заходів, щоб уникнути заміни чи підробки зразків. Такі заходи можуть містити герметизацію тари із зразком чи опечатування офіційною печаткою.

Кожний зразок потрібно відразу маркувати, зазначаючи назву, кількість, дату взяття зразка, місце для того, щоб повністю виключити можливість плутанини під час визначення проб та результатів їх досліджень.

Етикетки прикріплюють до зразків таким чином, щоб вони не відірвалися або пошкодилися під час відкриття зразка на дослідження і зривання печатки, тому що під час дослідження ідентифікаційна етикетка має залишатися незайманою.

Потрібно обережно поводитися з горючими, вибуховими, токсичними, корозійними чи отруйними зразками, а на тарі з такими зразками має бути спеціальне маркування, таке як «Небезпечно».

У випадку швидкопсувних продуктів пробу потрібно чітко маркувати як «швидкопсувний продукт» та забезпечити транспортування за температури від 0 до 5 °С і, не більш ніж через 2 години, передати до експертних митних підрозділів, за випадком тих продуктів, на які у нормативно-технічній документації передбачені спеціальні умови для транспортування.

Таблиця 1

Способи відбору та розмір проб риби, морських ссавців, морських безхребетних та продукти їх переробки

Найменування продукту	Транспортний засіб, тара	Пристрій для взяття проб	Розмір точкової проби	Кількість об'єднаної проби
1	2	3	4	5
Сирець (риба і безхребетні), жива, охолоджена, морожена, фарш, солонина, пряна, маринована, в'ялена, підв'ялена, сушена і копчена риба, солоні баличні пікети, в'ялені і копчені баличні вироби, пасти, гідролізати, концентрати, в'язига, харчові та кормові відходи	Цистерни, бочки, блоки, ящики	Сачок для живої риби, ніж із нержавіючої сталі	Із різних місць транспортної тари беруть по три точкові проби (один екземпляр або частину одного екземпляра, блока риби, фале, рибної ковбаси; декілька екземплярів або жменю дрібної риби (снітка, тюльки) чи частину продукту). Із морожених блоків відокремлюють два протилежних діагональних куски до 0,1 кг кожний, а з середини – суцільну за шириною і глибиною блока смугу до 0,2 кг. Із кожної транспортної тари відбирають по 1 чи 2 одиниці споживчої тари	1,0 / 1,0 кг, але не менше 1 уп. / 1 уп. для роздробної торгівлі
Морожені: м'ясо, очеревина та інші продукти (у тому числі печінка) із морських	Блоки, куски	Ніж із нержавіючої сталі	Від кожної транспортної тари після розмороження продукту відбирають із різних місць блока чи куски три точкові проби не більш 0,3 кг кожна	1,0 / 1,0 кг, але не менше 1 уп. / 1 уп. для роздробної торгівлі

1	2	3	4	5
ссавців, печінка риб				
Жир риб та морських ссавців, спермацетова олія	Бочки, бідони, циліндри чи барабани, склянібутилі	Сифон, скляна трубка чи трубчатий пробовідбірник, пробовідбірний кран, зональний пробовідбірник	Із бочок, бідонів, циліндрів та скляних бутилівпісля ретельного перемішування беруть одну пробу не більш 2,0 дм ³ . Іззалізничних і автоцистерн відбір проби проводиться безперервно і рівномірно протягом всього часу заповнення чи розвантаження кожної цистерни. Міцністьструї регулюють так, щоб об'єднана проба становила 0,02 % об'єму залізничної цистерни і 0,07 % – автоцистерни. Ізтанківсудів і стаціонарнихемностей проби відбирають пошарово через 2 м. Із нижнього шару – на відстані 0,5 м віддна, із верхнього – 0,2 м відповерхні жиру. У разінеоднорідності жиру у нижньому шарі– через кожні 0,5 м до однорідного шару	
Кристалічний спермацет	Брикети	Гвинтовий щуп	Із кожної розкритої транспортної тари, ізрізнихмісць кожного брикету, три проби по не менше 0,10 кг	
Безхребетні і продукти, вироблені з них	Блоки, ящики, коробки, банки	Ніжізнержавіюч оїсталі	Ізрізнихмісць кожної розкритої транспортної тари відбирають три точкові проби не менше 0,2 кг. З одного із морожених блоків транспортної	

1	2	3	4	5
			тари відокремлюють два протилежних за діагоналлю куски по 0,1 кг кожний, а з середини блоку – суцільну за шириною і глибиною смугу близько 0,2 кг. Із кожної транспортної тари по 1-2 одиниці споживчої тари	
Кормове борошно і крупа, хітин, хітазон	Мішок, ящик	Пробовідбірний щуп	Із різних місць розкритої транспортної тари декілька точкових проб (з верхньої, середньої і нижньої частини упаковки) по 0,05 кг	1,0 / 1,0 кг, але не менше 1 уп. / 1 уп. для роздробної торгівлі
Рибний клей	Контейнери, ящики, пачки, бочки, бідони	Скляні трубки, пробовідбірний щуп	Із кожної розкритої транспортної тари по 1 пачці, а під час фасування розсипом – пластини чи обрізки до 0,1 кг. Із кожної транспортної тари рідкого клею відбирають декілька точкових проб по 0,3 кг, а застиглого – по 0,5 кг кожну	
Перлинний пат, перламутровий препарат	Банки	Ложка із нержавіючої сталі	Із кожної розкритої транспортної тари відбирають по 3 банки, а цих відбирають не менше 10 точкових проб по 0,5 кг	
Справжня амбра	Куски		Із кожної розкритої транспортної тари відбирають декілька точкових проб амбри дрібної і амбри-крихти по 0,03 кг кожну, а великих – не менше 10 кусків із транспортної тари і від них відламують декілька	

1	2	3	4	5
			проб по 0,03 кг	
Рідкікормові продукти, криль і кормові продукти з крилю (крім борошна)	Банки	Пробовідбірний щуп	Із кожної розкритої транспортної тари декілька точкових проб по 0,3 кг	1,0 / 1,0 кг, але не менше 1 уп. / 1 уп. для роздробної торгівлі

Примітка: На ікру, ікряну пасту, кулінарні вироби (зокрема ковбаси), сирінапівфабрикати об'єднану пробу не складають.

Література

1. Риба та рибні продукти. Правила приймання, методи відбирання проб : ДСТУ 7972:2015 / Технічний комітет стандартизації «Рибне господарство» (ТК 33). Київ: ДП «УкрНДНЦ».

2. Безопасность и качество рыбо- и морепродуктов/ Г. Аллан Бремнер; пер. с англ. В. Широкова; науч. ред. Ю. Г. Базарнова. Санкт-Петербург : Профессия, 2009. 512 с.

3.2.1.3. Продукти рослинного походження/І. Мдінарадзе/

Відбір проб продуктів переробки фруктів і овочів

Правильний відбір проби для проведення досліджень поряд з правильним використанням прийнятого методу визначення одиничного показника якості продукції є однією з найважливіших завдань.

Склад підготовленої проби має відображати якість всієї партії продукції загалом. Для складання вихідного і середнього зразків необхідно брати з однорідної партії продукції таку кількість одиниць упаковки (банок, ящиків, бочок та ін.), яке відображало б якість всієї партії. Практично число одиниць продукції, відібраної для приготування вихідного зразка, встановлюють правила приймання, викладеними у відповідних стандартах.

Терміни і визначення

Точкова (миттєва) проба: Кількість продукту однієї назви, відібраного одноразово з однієї точки певної партії.

Об'єднана проба: Проба, отримана шляхом об'єднання всіх точкових проб, відібраних з різних місць партії, і характеризує якість всієї партії.

Скорочена (середня) проба: Представницька частина об'єднаної проби, отримана в процесі послідовного розподілу або скорочення таким чином, щоб

маса або об'єм відповідали вимогам, що висувають до лабораторних і контрольних проб.

Лабораторна проба: Частина скороченої проби, призначена для проведення лабораторних випробувань (аналізів).

Контрольна (арбітражна) проба: Частина скороченої проби, що зберігається в лабораторії, яка проводить випробування (аналізи), або у виробника продукції і призначена для повторного проведення випробувань (аналізів) в разі виникнення розбіжностей в оцінюванні якості продукту за результатами випробувань (аналізів).

Приймальне число, Ac: Найбільше число невідповідностей або невідповідних одиниць у вибірці в плані вибіркового контролю за альтернативною ознакою, за якою допускається приймання партії.

Бракувальне число, Re: Найменша кількість невідповідностей або невідповідних одиниць у вибірці в плані вибіркового контролю за альтернативною ознакою, за якою партія не підлягає прийманню.

Відбір проб продукції різної консистенції здійснюють різними предметами.

Всі харчові продукти можуть бути об'єднані в 6 груп:

- рідкі однорідні матеріали;
- рідкі неоднорідні матеріали, здатні розшаровуватися і утворювати емульсії;
 - матеріали твердої мазальної консистенції, фасовані в крупну тару (бочки, ящики та ін.);
 - сипучі матеріали;
 - плоди, овочі, консервовані продукти.

Проби рідин відбирають спеціальними трубками-пробниками або насосом конструкції Бахтіна (трубка з поршнем, кульковими клапанами і зливним відведенням).

Проби сипучих і дрібнозернистих продуктів відбирають спеціальним мішковим щупом з різних місць – верхнього, середнього і нижнього шарів мішка. Проби сипучих продуктів, що насипані у вагонах, кузовах машин, засіках, відбирають вагонним щупом.

Проби твердих і мазальних продуктів, фасованих в ящики або бочки, відбирають масляним щупом. Рідкі неоднорідні продукти найзручніше відбирати під час розвантаження тари (цистерн і т. ін.) на початку, в середині і наприкінці зливу. Вибірки рідких продуктів (сиропів, екстрактів, соків та ін.), фасованих у бочки, балони або бутлі, проводять від кожної виділеної і розкритої одиниці фасування в такій кількості: від кожної бочки – 200 см³, від кожного бутля – 100 см³. Причому розкриттю підлягає 3 % одиниць фасування, але не менше трьох бочок. Така сама кількість ящиків підлягає розкриттю, якщо продукція фасована в ящики або клітки. Вибірки продукції в'язкої, мазальної консистенції відбирають з різних шарів розкритої одиниці тари в кількості не менше 200 г.

Вибірки консервованих харчових продуктів для складання вихідного зразка, якщо ця продукція упакована в ящики або коробки, відбирають, керуючись даними про кількість одиниць упаковок в однорідній партії. Так, якщо в партії до 500 одиниць упаковок (ящиків, коробок, клітин), то для розкриття відбирають 5 одиниць. Якщо ж величина партії перевищує 500 одиниць, то відкриттю підлягають 8 і більше одиниць упаковок.

Від кожної відібраної і розкритої упаковки відбирають вибірки відповідно до вимог до правил приймання і методів відбору проб. Вибірки окремих одиниць фасування об'єднують і вони становлять вихідний зразок.

Підготовка проб для фізико-хімічного дослідження полягає в отриманні однорідної маси продукту шляхом його подрібнення, розтирання, перемішування (залежно від його виду).

Перед подрібненням проби проводять такі операції:

- у продуктах кісточкових плодів видаляють кісточки; в інших продуктах видаляють спеції, гілочки, чашолистки і сторонні домішки;
- продукти, що містять тваринні жири, нагрівають на водяній бані, в термостаті або сушильній шафі до розплавлення жиру;
- заморожені продукти попередньо розморожують у закритому посуді; рідку фазу, що утворюється під час розморожування, додають до подрібненого продукту.

Пробу продукту залежно від консистенції подрібнюють за допомогою м'ясорубки, дробарки, гомогенізатора, міксера або в ступці до отримання гомогенної маси. Якщо від продукту відокремлено рідину для визначення співвідношення частин, то після подрібнення твердої частини обидві фази з'єднують і перемішують. Так само роблять і в тих випадках, коли немає необхідності визначати співвідношення частин консервів.

Проби рідких і пюреподібних продуктів однорідної консистенції тільки перемішують.

Підготовлену пробу продукту поміщають у скляну посудину. Для визначення вітамінів навіску беруть відразу після приготування проби, а для інших фізико-хімічних аналізів – у міру потреби протягом доби. При цьому пробу зберігають за температури від 0 до 5 °С.

Під час підготовки проб продуктів необхідно враховувати низку вимог:

- для визначення масової частки важких металів (токсичних елементів) подрібнення проводять в апараті з матеріалу, який не може забруднити продукт металами;
- для визначення масової частки вітаміну С в продукті не допускається його зайва аерація, нагрівання і контакт з металевими поверхнями;
- для визначення механічних домішок методом флотації пробу товару не розтирають, а тільки подрібнюють і перемішують.

Правила відбору проб продуктів переробки фруктів і овочів

До продуктів переробки фруктів і овочів відносять фруктові та овочеві соки, нектари, соковмісні напої, фруктові та овочеві концентровані соки, пюре та концентровані пюре, морси і концентровані морси, киселі, компоти, в тому числі виготовлені зі сушених фруктів (сухофруктів), джеми, повидло, варення, фруктові та овочеві соуси, кетчупи.

Правила приймання

Продукти переробки фруктів і овочів приймають партіями. Для перевірки відповідності маркування, зовнішнього вигляду і цілісності транспортної упаковки від кожної партії продуктів має бути відібрано випадковим чином вибірку, обсяг якої зазначено в табл. 1.

Таблиця 1

Обсяг партії, одиниці транспортної упаковки, шт.	Нормальний контроль			Посилений контроль		
	Обсяг вибірки, одиниці транспортної упаковки, шт.	Приймальне число, Ac	Бракувальне число, Re	Обсяг вибірки, одиниці транспортної упаковки, шт.	Приймальне число, Ac	Бракувальне число, Re
До 25 вкл	2	0	1	3	0	1
Від 26 до 90 вкл	2	0	1	5	0	1
Від 91 до 150 вкл	3	0	1	8	0	1
Від 151 до 500 вкл	5	0	1	13	0	1
Від 501 до 1200 вкл	8	0	1	20	0	1
Від 1201 до 10000 вкл	13	0	1	32	1	2
Більш ніж 10000	20	0	1	50	1	2

Результати перевірки вважають задовільними, якщо число одиниць транспортної упаковки у вибірці, що не відповідає встановленим вимогам, менше або дорівнює приймальному числу Ac, і партію бракують, якщо воно більше або дорівнює бракувальному числу Re.

Для перевірки продуктів переробки фруктів і овочів у транспортній упаковці за органолептичними і фізико-хімічними показниками від кожної партії

продуктів має бути відібрано випадковим чином вибірку, обсяг якої зазначено в табл. 2.

Таблица 2

Обсяг партії, одиниці транспортної упаковки, шт.	Обсяг вибірки, одиниці транспортної упаковки, шт.	
	Нормальний контроль	Посилений контроль
До 15 вкл	1	2
Від 16 до 25 вкл	2	3
Від 26 до 90 вкл	2	5
Від 91 до 150 вкл	3	8
Від 151 до 280 вкл	5	13
Більш ніж 280	8	20

Результати перевірки вважають задовільними, якщо у вибірці не буде виявлено жодної одиниці транспортної упаковки, продукт в якій не відповідає встановленим вимогам.

Для перевірки відповідності маркування, зовнішнього вигляду і цілісності споживчої упаковки, поміщеній у транспортну упаковку, від кожної партії продуктів переробки фруктів і овочів має бути відібрано випадковим чином вибірку, обсяг якої зазначено в табл. 3.

Результати перевірки вважають задовільними, якщо число одиниць споживчої упаковки у вибірці, що не відповідає встановленим вимогам, менше або дорівнює приймальному числу A_c , і партію бракують, якщо воно більше або дорівнює бракувальному числу R_e .

Таблица 3

Обсяг партії, одиниці споживчої упаковки, шт.	Нормальний контроль			Посилений контроль		
	Обсяг вибірки, одиниці споживчої упаковки, шт.	Приймальне число, A_c	Бракувальне число, R_e	Обсяг вибірки, одиниці споживчої упаковки, шт.	Приймальне число, A_c	Бракувальне число, R_e
До 25 вкл	3	0	1	5	0	1
Від 26 до 90 вкл	5	0	1	8	0	1
Від 91 до 150 вкл	8	0	1	13	0	1
Від 151 до 500 вкл	13	0	1	20	0	1
Від 501 до 1200 вкл	20	0	1	32	1	2
Від 1201 до 10000 вкл	32	1	2	50	1	2
Більше ніж 10000	50	1	2	80	1	2

Для перевірки вмісту одиниці споживчої упаковки (маса нетто (об'єм) фасованих продуктів) і середнього вмісту партії фасованих продуктів і масової частки складових частин продуктів, упакованих у споживчу упаковку, від кожної партії продуктів переробки фруктів і овочів має бути відібрано випадковим чином вибірку, обсяг якої вказано в табл. 4.

Таблиця 4

Обсяг партії, одиниці споживчої упаковки, шт.	Нормальний контроль			Посилений контроль		
	Обсяг вибірки, шт.	Приймальне число, Ac	Бракувальне число, Re	Обсяг вибірки, шт.	Приймальне число, Ac	Бракувальне число, Re
Продукція в споживчій упаковці місткістю до 0,35 дм ³ вкл						
До 50 вкл	2	0	1	3	0	1
Від 51 до 150 вкл	2	0	1	5	1	2
Від 151 до 500 вкл	3	0	1	8	1	2
Від 501 до 3200 вкл	5	1	2	13	2	3
Більше ніж 3200	8	1	2	20	3	4
Продукція в споживчій упаковці місткістю від 0,35 до 1,00дм ³ вкл						
До 150 вкл	2	0	1	3	0	1
Від 151 до 1200 вкл	2	0	1	5	1	2
Від 1201 до 35000 вкл	3	0	1	8	1	2
Більше ніж 35000 вкл	5	1	2	13	2	3
Продукція в споживчій упаковці місткістю більше ніж 1,00дм ³						
До 50 вкл	1	0	1	2	0	1
Від 51 до 501 вкл	2	0	1	3	0	1
Від 501 до 35000 вкл	2	0	1	5	1	2
Більше ніж 35000	3	0	1	8	1	2

Результати перевірки (для масової частки складових частин продуктів, упакованих в споживчу упаковку) вважають задовільними, якщо число одиниць споживчої упаковки у вибірці, що не відповідають встановленим вимогам, менше або дорівнює приймальному числу Ac, і партію бракують, якщо воно більше або дорівнює бракувальному числу Re.

Партія фасованих продуктів за вмістом одиниці споживчої упаковки (маса нетто (об'єм) фасованих продуктів) та середньому вмісту партії фасованих продуктів приймається за одночасного виконання таких умов:

а) середній вміст партії має бути більше або дорівнювати значенню маси нетто (обсягу), зазначених у маркуванні;

б) кількість бракованих пакувальних одиниць (у яких негативні відхилення вмісту пакувальної одиниці перевищують межу допустимих негативних відхилень) має бути менше або дорівнювати приймальному числу A_c ;

в) не допускається наявність пакувальних одиниць, у яких негативне відхилення вмісту пакувальної одиниці перевищує подвійне значення межі допустимих негативних відхилень.

Партію бракують у разі невиконання хоча б однієї з вищеперерахованих умов.

Для перевірки фізико-хімічних показників продуктів переробки фруктів і овочів у споживчій упаковці від кожної партії продуктів має бути відібрано випадковим чином вибірку, обсяг якої зазначено в табл. 4. Для проведення фізико-хімічних випробувань (аналізів) допускається використовувати продукти в споживчій упаковці, після перевірки вмісту одиниці споживчої упаковки (маса нетто (об'єм) фасованих продуктів) і середнього вмісту партії фасованих продуктів і масової частки складових частин, якщо це допускається умовами випробувань (аналізу). У разі отримання незадовільних результатів хоча б за одним з фізико-хімічних показників проводять повторні випробування (аналізи) на подвоєній вибірці. У разі отримання незадовільних результатів повторних випробувань (аналізів) хоча б за одним із фізико-хімічних показників партія не підлягає прийманню.

Обладнання для відбору проб

Для відбору проб з транспортної упаковки використовують:

- погрузна металева посудина;
- трубки пробовідбірні для відбору рідких і в'язких продуктів;
- щупи різної конструкції для відбору проб густих і в'язких продуктів;
- совок для відбору проб пастоподібних продуктів.

Для відбору проб продуктів зі споживчої упаковки застосовують:

- трубки пробовідбірні;
- совки.

Вимоги до відбору проб

Відбір проб проводять з неушкодженої споживчої або транспортної упаковки таким чином, щоб зберегти проби від зовнішнього впливу навколишнього середовища або випадкового забруднення.

Залежно від фізичного стану продукту, видів транспортної та споживчої упаковки застосовують різні методи відбору проб, що забезпечують подавання проби.

Обладнання для відбору проб має бути чистим, сухим і не мати стороннього запаху, а матеріал, з якого його виготовлено, не має впливати на якість проби.

Допускається проводити відбір проб рідких продуктів одного найменування, поданих до одноразового приймання або постачання, в однорідних транспортних засобах або в однорідній транспортній упаковці, одним пробовідбірником, забезпечуючи кожного разу його промивання порцією продукту, що відбирається. Порцію продукту, яку використовують для промивання, відкидають.

У процесі відбору, транспортування та зберігання проб слід вживати заходів, що виключають зміни фізико-хімічних або органолептичних показників.

Відбір проб з транспортної упаковки

Точкові проби рідких продуктів переробки фруктів і овочів відбирають по всій висоті через доступний отвір ємності з використанням відповідного обладнання.

Таблица 5

Найменування показників	Мінімальна маса або об'єм, кг (дм ³)			
	Об'єднаної проби	Скороченої проби	Лабораторної проби	Контрольної проби
Органолептичні	1,00	0,50	0,25	0,25
Фізико-хімічні	2,0	1,0	0,5	0,5
Мінеральні і сторонні домішки	3,0	1,0	0,5	0,5
Масова частка складових частин	8,0	2,0	1,0	1,0

Перед відбиранням проб рідких продуктів уміст ємності перемішують одним з доступних способів для забезпечення однорідності продукту.

Число точкових проб від кожної одиниці транспортної упаковки має бути не менше двох. Маса точкової проби має бути від 0,3 до 3,0 кг залежно від маси об'єднаної проби, зазначеної в табл. 5. Під час перемішування рідкого продукту проводять візуальну перевірку наявності сторонніх домішок. У разі виявлення, домішки відбирають з продукту за допомогою обладнання для відбору проб і направляють до лабораторії разом з пробами.

Відбір проб зі споживчої упаковки

Відбір проб продуктів зі споживчої упаковки проводять з випадкової вибірки.

Точкові проби відбирають шляхом відбору рівних кількостей продукту з кожної одиниці споживчої упаковки. Точкові проби змішують з метою формування об'єднаної проби. Об'єднану пробу ретельно перемішують і видаляють частину продукту з метою отримання скороченою проби.

Скорочену пробу продукту в споживчій упаковці ділять на дві рівні частини з метою отримання лабораторної та контрольної проб.

3.2.1.4. Молочні продукти/Н. Ткаченко/

Відбір проб молочних продуктів

Правильний відбір проб молочних продуктів для проведення досліджень, поряд з правильним використанням прийнятого методу визначення одиничного показника якості продукції, є одним із важливих завдань під час оцінювання якості молочних продуктів.

Готові молочні продукти, призначені для реалізації, мають відповідати вимогам чинних нормативних документів.

Проби молочних продуктів відбирають відповідно до ДСТУ ISO 707:2002, яким встановлено правила приймання, методи відбору проб молочної продукції і підготовка їх до аналізу.

Нормативна документація передбачає здавання-приймання готової продукції партіями. У такому випадку *партією* називають сукупність одиниць продукції одного найменування в однорідній тарі, з однаковими фізико-хімічними і органолептичними показниками (одного ґатунку), вироблених на одному підприємстві-виробникові, одному технологічному обладнанні, протягом одного технологічного циклу, за одним виробничим режимом, однією датою виготовлення і одним оформленим супровідним документом. У випадку змішування партій, продукцію сортують на однорідні партії.

До відбору проб перевіряють зовнішній вигляд і маркування транспортної тари за кожною одиницею в партії, а в споживчій тарі – за кожною її одиницею з транспортної тари з продукцією, що внесена у вибірку.

Вибірка – це сукупність одиниць продукції, яка відібрана для контролю партії. Об'єм вибірки (число одиниць транспортної або споживчої тари, що складають вибірку) для партій **питних видів молока, вершків, рідких кисломолочних продуктів** у транспортній тарі становить 5 %, **сметани** – 10 % одиниць транспортної тари з продукцією. За наявності в партії менше 20 одиниць питних видів молока, вершків і кисломолочних напоїв чи менше 10 одиниць сметани відбирають одну.

Об'єм вибірки вказаної продукції у споживчій тарі наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Число одиниць транспортної тари з продукцією в партії	Число одиниць транспортної тари з продукцією у вибірці
До 100	2
Від 101 до 200	3
Від 201 до 500	4
Від 501 і більше	5

Перед розпакуванням тари з продукцією її очищують від забруднень, промивають водою та обтирають. Після розкриття визначають температуру, об'єм молочних продуктів за кожною одиницею тари з продукцією, внесено у вибірку, для продукції в цистернах – в кожній цистерні або її секції.

У першу чергу відбирають проби для мікробіологічного аналізу, потім для визначення органолептичних показників, далі – фізико-хімічних.

З вибірки відбирають по одиниці споживчої тари. Об'єм однієї проби від молока, вершків, сметани чи рідких кисломолочних продуктів у споживчій тарі дорівнює об'єму цієї продукції, внесеної у вибірку. З об'єднаної проби питного молока після перемішування для аналізу виділяють пробу об'ємом 0,5 дм³.

Під час підготовки проб рідких кисломолочних продуктів чи сметани їх перемішують шляхом п'ятикратного перевертання тари або шпателем протягом однієї хвилини після розпакування тари.

Проби, що мають густу консистенцією попередньо підігрівають до температури (32±2) °С на водяній бані з температурою (38±2) °С, а потім охолоджують до температури (20±2) °С. З об'єднаної проби кисломолочних напоїв виділяють пробу для аналізу об'ємом 0,1 дм³, а сметани – пробу масою близько 100 г.

Об'єм вибірки від партії **сиру кисломолочного чи виробів з нього** у транспортній тарі становить 10 % одиниць транспортної тари з продукцією. Точкові проби відбирають щупом, зануривши його на дно тари. Із кожної одиниці транспортної тари відбирають три точкові проби: одну – з центра, дві інші – на відстані 3...5 см від бокової стінки тари, продукт ретельно перемішують шпателем, складають об'єднану пробу масою приблизно 500 г. Із об'єднаної проби для аналізу відбирають 100 г продукту.

Об'єм вибірки від партії **сиру кисломолочного чи виробів з нього** у споживчій тарі наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Число одиниць транспортної тари з продукцією в партії	До 50	Від 51 до 100	Від 101 до 200	Від 201 до 300	Від 301 і більше
Число одиниць транспортної тари з продукцією у вибірці	2	3	4	5	6

Із кожної одиниці транспортної тари з продукцією, включеної у вибірку, відбирають дві одиниці тари з продукцією, якщо виріб має масу до 250 г і одну одиницю, якщо виріб має масу 250 г і більше.

Для складання об'єднаної проби від сиру кисломолочного у споживчій тарі продукцію звільняють від тари. Продукт переносять у посуд і ретельно перемішують. Із об'єднаної проби для аналізу відбирають пробу масою приблизно 100 г, а для продукції з наповнювачами – близько 150 г.

Проби рекомендують досліджувати одразу після підготовки. Якщо такої можливості немає, зразки зберігають за температури 2...8 °С і не більше 4 годин.

Під час підготовки до аналізу проб сиркових виробів з наповнювачами, попередньо за допомогою пінцета відділяють цукати, горіхи, родзинки тощо.

Відбір точкових проб **морозива** в гільзах, внесених у вибірку, проводять нагрітим у воді до температури (38±2) °С щупом, який занурюють у продукт на відстані 2...5 см від стінки по діагоналі до дна гільзи протилежної стінки. Зі щупу знімають шпателем шар морозива на всю довжину щупа і переносять у посуд. Морозиво залишають за кімнатної температури до повного танення. Із підготовленої маси відокремлюють горіхи, цукати, родзинки та інші наповнювачі (в разі їх наявності), ретельно її перемішують, складають об'єднану пробу масою близько 500 г. Із об'єднаної проби відбирають пробу для аналізу масою близько 100 г. Об'єм вибірки від партії морозива у споживчій тарі становить 10 % одиниць транспортної тари з продукцією, за наявності в партії менш як 10 одиниць відбирають одну. Із кожної одиниці транспортної тари з продукцією, внесеною у вибірку, відбирають одну одиницю споживчої тари з продукцією.

Для складання об'єднаної проби від морозива в споживчій тарі, внесеного у вибірку, відбирають 0,1...0,2 % загальної кількості пакувальних одиниць. Кожну одиницю фасованого морозива досліджують окремо.

Об'єм вибірки від партії тортів із морозива становить один торт. Торт масою менш як 500 г використовують повністю як пробу, призначену для аналізу. Від торта масою понад 500 г за симетрично розташованого оздоблення для аналізу відбирають ¼ частину торта, розрізавши його по діагоналі. У разі несиметричного оздоблення торт розрізають по діагоналям на чотири частини і відбирають дві з них з урахуванням пропорційної кількості оздоблення.

Торт або частини торта звільняють від оздоблення за допомогою пінцета або шпателя, ретельно перемішують і для аналізу відбирають пробу масою 100 г. Оздоблення вміщують у окремий посуд і також спрямовують на дослідження. Під час підготовки проб до аналізу морозиво перемішують, перевертаючи місткість з пробою не менш як три рази. Температура проби має бути (20±2) °С.

Об'єм вибірки від кожної партії **вершкового масла** у транспортній і споживчій тарі становить 5 % одиниць транспортної тари з продукцією. Якщо в партії менш як 20 одиниць, відбирають одну. З кожної внесеної до вибірки одиниці транспортної тари з фасованим маслом відбирають 3 % одиниць споживчої тари з продукцією. Точкові проби від масла у транспортній тарі,

внесеного у вибірку, відбирають щупом. Під час пакування масла в ящики щуп занурюють по діагоналі від торцевої стінки до центра моноліта масла. Пробу масла з температурою нижче 10 °С відбирають щупом, підігрітим у воді до температури (38±2) °С.

Для складання об'єднаної проби від нижньої частини стовпчика масла, відібраного щупом з кожної одиниці транспортної тари з продукцією, відбирають ножем точкову пробу масла масою близько 50 г і вміщують у місткість для складання об'єднаної проби. Верхню частину стовпчика масла завдовжки 1,5 см, що залишилася на щупі, повертають на своє місце і обережно розрівнюють поверхню масла.

Від масла у споживчій тарі, внесеного у вибірку, точкову пробу масою близько 50 г відбирають ножем від кожного брикету масла, попередньо знявши пакувальний матеріал і зовнішній прошарок продукту завтовшки 0,5...0,7 см. За маси брикету 50 г і менше об'єднану пробу складають з цілих брикетів, не знімаючи зовнішнього прошарку.

Об'єднану пробу масла розм'якшують на водяній бані з температурою (30±2) °С за постійного перемішування. З підготовленої проби на аналізи відбирають 50 г масла.

Від партії **твердих сирів** відбирають вибірку у обсязі, наведеному у табл. 3.

Таблиця 3

Число одиниць транспортної тари з продукцією в партії	Число одиниць транспортної тари з продукцією у вибірці
До 5	1
6...15	2
16...25	3
26...40	4
41...60	5
61...85	6
86...100	7
Понад 100	5 %, але не менш як 7

З кожної одиниці транспортної тари з продукцією, яку внесено у вибірку, відбирають одну головку, брусок сиру чи одну одиницю споживчої тари з продукцією.

Точкові проби сиру відбирають щупом з двох протилежних боків кожної головки сиру, що внесена у вибірку. Щуп вводять на глибину $\frac{3}{4}$ довжини. Для визначення органолептичних показників точкову пробу відбирають з одного боку головки сиру. Під час відбирання точкових проб великих твердих сичужних сирів, що мають форму циліндра чи бруска, щуп вводять з торцевого боку ближче до центра; під час відбирання точкових проб дрібних твердих сичужних

сирів, що мають круглу форму, щуп вводять з верхньої частини головки до центра. Від вийнятих стовпчиків сиру відділяють корковий прошарок завдовжки близько 1,5 см. Подальшу за корковим прошарком частину стовпчиків довжиною завдовжки 4,5 см розміщують у ємність для складання об'єднаної проби. Під час відбору точкових проб дрібних твердих сичужних сирів, що мають форму низького циліндра, щуп вводять з циліндричної поверхні, а в ті, що мають форму бруска – з діагоналі торцевого боку.

Відбір точкових проб м'яких сирів (рокфор, камамбер, дніпровський), розсільних (сулугуні, бринза) та складання об'єднаної проби проводять відповідно до вимог чинної нормативної документації на сири м'які.

Для складання об'єднаної проби розсільних сирів використовують цілий стовпчик сиру, відібраний щупом. Відбір точкових проб від сиру сулугуні і сирів подібної форми проводять, вирізаючи ножом сектор дуги завдовжки близько 2 см. Проби сиру відбирають окремо для визначення фізико-хімічних і органолептичних показників. Не дозволено використання однієї проби для цих аналізів.

Для фізико-хімічних досліджень точкові проби твердих, м'яких сичужних сирів і близьких до них за консистенцією розсільних сирів протирають через дрібну тертушку, ретельно перемішують, складають об'єднану пробу; точкові проби м'яких і пастоподібних плавлених сирів розтирають у ступці і складають об'єднану пробу. З об'єднаних проб виділяють пробу для аналізу масою 50 г.

Від партії **плавленого сиру** відбирають і розкривають кожну десятку одиницю упаковки, а з кожної контрольованої одиниці беруть один сирок. Якщо плавлений сир у розфасовці по 30 г з кожного контрольного місця беруть по 2 сирки.

Для хімічного дослідження від кожного сирку одного виду і однакової масової частки жиру відрізають 20 г і вміщують в одну місткість. Відібрані проби ретельно подрібнюють, перемішують і беруть близько 50 г як об'єднану пробу у чисту склянку з пробкою. Органолептичну оцінку плавлених сирів проводять за температури 14...16 °С.

Об'єм вибірки від партії **згущених молочних консервів і сухих молочних продуктів** у транспортній тарі становить 3 % одиниць транспортної тари з продукцією, але не менш як дві одиниці згущених молочних консервів і не менш як три одиниці сухих молочних продуктів. Об'єм вибірки від партії молочних консервів і сухих продуктів у споживчій тарі становить також 3 % одиниць, але не менше двох одиниць.

За реалізації продукції від кожної варки згущених молочних консервів відбирають по дві банки №7 для контрольованого зберігання на молочноконсервному комбінаті. Під час фасування у велику тару від кожної партії відбирають два зразки по 500 г і зберігають їх запломбованими в герметичній упаковці. Контрольні зразки зберігають 4–6 місяців – для продукції

поточного вживання і 12–15 місяців – для продукції тривалого зберігання і на експорт.

Для кожної партії сухих молочних консервів відбирають зразки для контрольного зберігання на комбінаті: 2 місця у дрібній фасовці і два зразки по 200 г від крупного фасування, герметично запакованої у поліетиленові пакети і запломбовані. Зразки зберігають 8 місяців для продукції у герметичній тарі і 3 місяці – в негерметичній упаковці. Після вказаного терміну зразки знімають із зберігання і спрямовують на промислове перероблення.

Перед відбором проб згущені молочні консерви у бочках і флягах ретельно перемішують мішалкою, а у споживчій тарі – шпателем 1–2 хвилини після відкупорювання.

Якщо на дні банки із згущеними молочними консервами є осад, банку занурюють у воду температурою (55 ± 5) °С і знову перемішують до отримання однорідної маси, температура продукту не має перевищувати (28 ± 2) °С, далі охолоджують до температури (20 ± 2) °С. Після перемішування продукту в цистернах точкові проби відбирають від різних місць щупом або пробовідбірником, занурюючи його на дно тари. Із кожної одиниці упаковки точкові проби відбирають в однаковій кількості і складають з них об'єднану пробу масою 1 кг. Із об'єднаної проби відбирають для аналізу пробу масою 300 г.

Відбір точкових проб сухих молочних продуктів у транспортній тарі, внесених у вибірку, проводять щупом із різних місць кожної одиниці транспортної тари з продукцією. Щуп занурюють у продукт на відстані 2...5 см від стінки по діагоналі до дна тари. Точкові проби збирають у місткість і становлять об'єднану пробу масою 1-2 кг, з неї відбирають пробу для аналізу масою 200 г.

Проби сухих молочних продуктів ретельно перемішують і розтирають у ступках. У відібраних пробах готової продукції визначають органолептичні, фізико-хімічні і мікробіологічні показники на відповідність чинним нормативним документам.

Право на оформлення документації та випуск готової продукції в реалізацію має завідувач лабораторії або працівник лабораторії, на якого наказом керівника підприємства покладено відповідальність за випуск готової продукції.

Змінний майстер або технолог цеху на партію готової продукції випишує паспорт і передає її у лабораторію для контролю якості. Працівник лабораторії перевіряє подану продукцію за органолептичними і фізико-хімічними показниками, перевіряє стан тари, маркування та пакування на відповідність продукції вимогам нормативних документів і випишує посвідчення про якість за встановленою формою. Сертифікат якості – єдиний документ, який дає право на випуск цієї партії продукції з підприємства. У разі випуску продукції без посвідчення на особу, яка допустила порушення, накладається адміністративне стягнення.

3.2.1.5. Вино та алкогольні напої/О. Готсірідзе/

Загальні принципи всесвітньої організації виноградарства і виноробства та вимоги аналізу вин

Збірник міжнародних методів аналізу вина було вперше опубліковано у 1962 році. Усі методи та принципи аналізу вина та сусла було затверджено Генеральною Асамблеєю Міжнародної організації виноградарства та виноробства (OIV) і щороку випускається Підкомісією.

Збірник відіграє важливу роль у гармонізації методів аналізу. Багато країн, які вирощують виноград, ввели його визначення та методи у свої власні нормативні акти. Європейський Союз визнає всі методи в Збірнику та робить їх обов'язковими для виконання у всіх державах-членах, підтверджуючи тісну співпрацю між ЄС та OIV.

Таким чином, завдяки своїй провідній ролі в гармонізації методів аналізу, Збірник сприяє міжнародній торгівлі. З *Міжнародним кодексом енологічних практик* та *Міжнародним енологічним кодексом* він становить суттєву наукову, юридичну та практичну користь.

Схема та формулювання методу аналізу OIV

Витяг зі стандарту ISO 78-2:1999

1. Назва.

2. Вступ.

Необов'язково.

3. Сфера дії.

У цьому пункті коротко зазначається метод хімічного аналізу та конкретно продукт, до якого його застосовують.

4. Визначення.

5. Принцип.

Цей факультативний пункт указує основні етапи використовуваного методу, основні принципи.

6. Реагенти та матеріали.

У цьому пункті мають бути перелічені всі реагенти та матеріали, використані під час випробування, а також їх основні характеристики та, за необхідності, вказано ступінь їх чистоти.

Дається:

- продукція, яку використовують у комерційній формі;
- розчини певної концентрації;
- стандартний титрований розчин;
- стандартний контрольний розчин;
- стандартний розчин;
- стандартне правильне рішення.

7. Обладнання.

У цьому пункті мають бути перелічені назви та суттєві характеристики всіх приладів та обладнання, які використовуватимуть під час аналізу або випробування.

Примітка: кожен реагент мають згадувати за допомогою конкретного контрольного номера.

8. Відбір проб (підготовка зразків).

Має бути:

- процедура відбору проб;
- підготовка дослідної проби.

9. Процедура.

Кожну послідовність дій має бути описано однозначно і стисло. Цей пункт, як правило, містить такі підпункти:

1) Частина випробування (цей підпункт має містити всю інформацію, необхідну для приготування проби з досліджуваного зразка).

2) Визначення або випробування (цей підпункт має бути описаний точно, щоб полегшити опис, розуміння та застосування процедури).

3) Калібрування (за необхідності).

10. Обчислення (результати).

Цей пункт має вказувати метод розрахунку результатів. Мають бути визначені одиниці виміру, використовуване рівняння, значення алгебраїчних символів, кількість десяткових знаків після коми.

11. Точність (у випадку міжлабораторної перевірки).

Такі дані мають бути вказані:

- кількість лабораторій;
- середнє значення Концентрації;
- повторюваність і відтворюваність;
- стандартне відхилення повторюваності та відтворюваності;
- посилання на документ, що містить опубліковані результати міжлабораторних випробувань.

12. Додаток.

Додаток, що стосується пунктів точності.

Додаток щодо статистичних та інших даних, отриманих за результатами міжлабораторних випробувань.

13. Бібліографія.

Додаток, що стосується пунктів точності

Зокрема у цьому додатку зазначається:

- свідчення про повторюваність;
- свідчення про відтворюваність.

Додаток щодо статистичних та інших даних, отриманих за результатами міжлабораторних випробувань.

Статистичні та інші дані, отримані за результатами міжлабораторних випробувань, можуть бути наведені в інформаційному додатку.

Приклад: таблиці, що дає статистичні результати.

Ідентифікація зразка А В С	А	В	С
Кількість лабораторій, що беруть участь			
Кількість прийнятих результатів тесту			
Середні значення (г / 100 г проби)			
Істинне або прийняте значення (г / 100 г)			
Стандартне відхилення повторюваності (Sr)			
Коефіцієнт повторюваності варіації			
Межа повторюваності (r) (2,8 x Sr)			
Стандартне відхилення відтворюваності (SR)			
Коефіцієнт відтворюваності варіації			
Межа відтворюваності (R) (2,8 x SR)			

Незважаючи на те, що не буде необхідним вносити всі дані, наведені в таблиці, рекомендується вносити, принаймні, такі дані:

- кількість лабораторій;
- середнє значення концентрації;
- стандартне відхилення повторюваності;
- стандартне відхилення відтворюваності;
- посилання на документ, що містить опубліковані результати міжлабораторних випробувань.

Види аналізу вина та сусла

1) Фізичний аналіз.

2) Хімічний аналіз.

Органічні складники:

- цукор;
- алкоголь;
- кислоти;
- газ;
- інші хімічні сполуки.

Неорганічні складники:

- аніони;
- катіони;
- інші неорганічні сполуки.

3) Мікробіологічний аналіз.

4) Інший аналіз.

Методи аналізу вин та сусла

Загальні зауваження

1. Чисте вино або сусло мають використовувати для хімічного та фізичного аналізу. Якщо вино або сусло мутні, його спочатку фільтрують через фільтрувальний папір у закритій лійці або центрифугують у закритому посуді. Ця операція має бути зазначена в будь-якій необхідній документації.

2. Посилання на метод, що застосовують для кожного визначення, має міститися в будь-якій необхідній документації.

3. Одиниці виміру для різних величин (об'єму, маси, концентрації, температури, тиску тощо) мають відповідати рекомендаціям IUPAC (Міжнародного союзу чистої та прикладної хімії).

4. Що стосується використовуваних реагентів та розчинів для титрування, використовувані хімічні речовини мають бути «аналітичного класу», а вода має бути дистильованою або еквівалентна чистій, якщо інше не вимагається в тексті.

5. Ферментні методи та визначення ряду параметрів мають базуватися на абсолютних вимірах поглинання, що вимагає калібрування спектрофотометрів на довжини хвилі та поглинання. Довжина хвилі може бути відкалібрована за допомогою Hg-ліній: 239,94, 248,0, 253,65, 280,4, 302,25, 313,16, 334,15, 365,43, 404,66, 435,83, 546,07, 578,0 та 1014,0 нм.

Поглинання можна калібрувати за допомогою комерційних еталонних розчинів, отриманих від відповідних постачальників, або фільтрів нейтральної щільності.

6. Наведені основні бібліографічні посилання. Посилання на робочі документи Підкомісії мають позначку «F.V., O.I.V.», а потім рік публікації та номер документа.

«Мальвідиндиглюкозид»– опис

Наявність пігментів антоціанінудиглюкозиду у червоному або рожевому вині, зокрема мальвідинудиглюкозиду, використовується як ознака того, чи було вино виготовлене з використанням фруктів, відмінних від видів *Vitisvinifera*, які не містять значної кількості диглюкозидів.

«Мальвідиндиглюкозид» – метод хімічного аналізу

1. Принцип.

Диглюкозидмальвідину, окислений азотною кислотою, перетворюється на речовину, яка в амонійному середовищі випромінює яскраву зелену флуоресценцію в ультрафіолетовому світлі. Інтенсивність флуоресценції утвореної сполуки вимірюється порівнянням з флуоресценцією розчину, титрованого хініном сульфатом, інтенсивність флуоресценції якого стандартизована за еталоном диглюкозидумальвідину. Вільний діоксид сірки, який послаблює флуоресценцію, попередньо має поєднуватися з надлишком ацетальдегіду.

2. Якісна експертиза.

2.1. Обладнання.

2.1.1. Ультрафіолетова лампа дозволяє вимірювання за 365 нм.

2.2. Реагенти.

2.2.1. Розчин ацетальдегіду.

Паральдегід, який кристалізується 10 г.

Етанол 96 % (v/v) 100 мл.

2.2.2. Соляна кислота, 1,0 М.

2.2.3. Розчин нітрату натрію, 10 г/л.

2.2.4. Етаноль, 96 % (v/v), що містить 5 % концентрований розчин аміаку ($\rho_0 = 0,92$ г/мл).

2.2.5. Контрольне вино, що містить 15 мг диглюкозидумальвідину на літр.

2.2.6. Вино, що не містить диглюкозидмальвідину.

2.3. Технологія.

У пробірку додати:

- 10 мл вина;
- 1,5 мл розчину ацетальдегіду, зачекайте 20 хвилин.

У 20 мл пробірку для центрифуги:

- 1 мл вина, яке взаємодіяло з ацетальдегідом;
- 1 крапля соляної кислоти;
- 1 мл розчину нітрату натрію.

Перемішати, зачекати 2 хвилини (максимум 5 хвилин);

додати: 10 мл аміачного етанолу.

Подібним чином обробити 10 мл вина, що містить 15 мг/л мальвідинудиглюкозиду (контрольне вино). Перемішати, зачекати 10 хвилин і центрифугувати.

Відфільтрувати чисті рідини зверху у відкалібровані пробірки. Спостерігати різницю в зеленій флуоресценції між випробуваним вином та контрольним вином під ультрафіолетовим світлом за 365 нм.

Для рожевих вин можна підвищити чутливість, використовуючи:

- 5 мл вина, обробленого ацетальдегідом (2.3);
- 0,2 мл соляної кислоти, 1 М (2.2.2);
- 1 мл розчину нітрату натрію, 10 г/л (2.2.3);
- 5,8 мл аміачного етанолу (2.2.4).

З контрольним вином зробити те ж саме.

2.4. Інтерпретація.

Вина, які не флуоресцирують або мають суттєво нижчу флуоресценцію, ніж контрольне вино, можна вважати такими, що не мають диглюкозидумальвідину. Ті, у кого флуоресценція трохи менше, дорівнює або більша за контроль, повинні мати кількісне визначення.

3. Кількісне визначення.

3.1. Апаратура.

3.1.1. Обладнання для вимірювання флуорисценції:

- довжина хвилі випромінювання 365 нм;
- довжина хвилі флуоресцентного випромінювання 490 нм.

3.1.2. Оптична кварцова комірка (довжина шляху 1 см)

3.2 Реагенти.

3.2.1. Див. якісне оцінювання.

3.2.2. 2 мг/л розчину хініну сульфату.

Приготуйте розчин, що містить 10 мг дуже чистого сульфату хініну в 100 мл сірчаної кислоти, 0,1 М. Потрібно розбавити 20 мл цього розчину до 1 літра розчином сірчаної кислоти, 0,1 М.

3.3. Процедура.

Застосуйте той самий метод, який описаний у якісній експертизі (2), за винятком того, що аліквота вина, обробленого ацетальдегідом, у кожному випадку (червоні та рожеві вина) становить 1 мл.

Помістіть у клітинку 2 мг/л розчину хініну сульфату, відрегулюйте флуорометр на повний діапазон (коефіцієнт пропускання T, рівний 100 %), регулюючи ширину щілини або чутливість.

Замініть цю трубку на ту, що містить вино, що досліджується: це значення T1. Якщо відсоток передачі T1 перевищує 35, розбавляйте вино вином без мальвідиндиглюкозиду, флуоресценція якого має бути менше 6 % (це має бути встановлено попереднім випробуванням).

Примітка:

1) Саліцилова кислота (саліцилат натрію), що додається до вина для стабілізації перед аналізом, викликає помилкову флуоресценцію, яку можна усунути екстракцією ефіру.

2) Неправдива флуоресценція спричинена додаванням карамелі.

3.4.Обчислення.

Інтенсивність флуоресценції 1 для вина безSO₂для зазначених вище умов використання, за винятком обробки ацетальдегідом, відповідає 0,426 мг диглюкозидумальвідину на літр вина. З іншого боку, червоні та рожеві вина, що не містять диглюкозидумальвідину, дають флуоресценцію, що відповідає значенню T приблизно 6 %.

3.5.Вираження результатів.

Кількість диглюкозидумальвідину виражається в міліграмах на літр вина з точністю до цілого числа.

3.2.2.Ветеринарна медицина

/Т. Гаркавенко, А. Меженський, М. Карпуленко, Г. Київська, О. Ложкіна, Н. Алексєєва, М. Сапачова, Е. Дзюба, Т. Кожницька, Н. Меженська, О. Литвиненко, І. Ружинська/

Проби мають відбирати згідно із знаннями епізоотології та патогенезу досліджуваної хвороби або попереднього діагнозу чи клінічних ознак хвороби. Це допоможе відбирати проби тканин або рідин, які найчастіше містять інфекційний збудник або докази інфекції. Знання охоплюють дані про тканинну сприйнятливність або цільовий орган, тривалість та місце інфікування в кожному типі тканини, тривалість і шлях зараження або часові рамки, в яких можуть бути дані про минулу інфекцію, такі як наявність антитіл, які виявляють розгорнутими дослідженнями. Ці знання можна використати під час визначення способу відбору проб. У багатьох дослідженнях захворювань стада чи зграї доцільно збирати проби від здорового поголів'я для порівняльного епізоотологічного або базового аналізу (наприклад, для випадкового контролю та поголовного – для діагностичного дослідження) та для валідації.

Якщо для фіксації (знерухомлення) тварин потрібне використання хімічних препаратів, необхідно враховувати вплив цієї хімічної речовини на результати досліджень (наприклад, токсикологічні дослідження). Деякі лабораторні дослідження несумісні зі специфічними антикоагулянтами крові та консервантами тканин, такими як гепарин, формалін, сухий лід (експозиція досліджуваної проби до підвищених рівнів CO₂) або навіть заморожування. Важливо відбирати проби наскільки можливо асептично, щоб уникнути забруднення мийними засобами та антисептичними речовинами, які використовують для очищення місця відбору в тварини, оскільки ці речовини можуть перешкоджати процедурам лабораторних досліджень. На дослідження проб патогенних мікроорганізмів, а також для досліджень на молекулярному рівні можуть негативно впливати хімічні речовини або детергенти, які використовують під час виробництва або підготовки інструментів для відбору (наприклад, хімікати, що використовують для виготовлення певних видів

змащувань, та мийних засобів, які використовують під час чищення скляного посуду).

Від правильного відбору проб залежать результати лабораторних досліджень, а тому вказану процедуру необхідно спланувати. Плануючи відбір проб, необхідно звертати увагу на завдання (мету), а також вирішити, наскільки точною має бути очікувана відповідь (що більша точність вимагається, то більшу кількість проб необхідно відібрати).

Необхідно узгодити можливість проведення досліджень з фахівцями лабораторій, куди направлятимуть відібрані проби.

Популяцію тварин, від яких необхідно відібрати проби, слід розділити на одиниці відбору проб (від однієї особини до групи – гніздо, загін, стадо).

Відбір проб здійснюється такими методами:

- рандомізації (випадковий відбір) – простий (вибір випадкових особин) або системний (вибір особин з регулярним інтервалом);

- стратометрії – сукупність тварин спочатку поділяють на групи (страти), сформовані за ознаками статі, віку, породи, утриманням, напрямом господарчої діяльності, а потім у середині кожної групи здійснюють простий або системний рандомізований відбір проб;

- кластеризації – сукупність тварин спочатку поділяють на групи (кластери), сформовані природним шляхом, через господарчу діяльність людини чи географічними особливостями (стадо, ферма, окреме господарство, район), а потім у середині кожної групи здійснюють простий або системний рандомізований відбір проб.

Кількість відібраних проб за негайного діагностування захворювання може бути обмеженою наявністю хворих (загиблих) тварин і залежати від конкретних умов. Під час моніторингових та скринінгових спостережень об'єм вибірки / кількості проб, які необхідно відібрати, щоб встановити наявність чи відсутність захворювання в цій популяції, залежить від таких параметрів:

- об'єму популяції тварин (якщо проводиться відбір проб від більшої частини тварин певної популяції, то вірогідність того, що позитивно реагуючі тварини будуть виявлені, зростає з кожною новою пробою;

- вірогідності превалентності цього захворювання, якщо воно присутнє у популяції (вірогідний рівень охоплення поголів'я конкретним захворюванням оцінюється за епізоотичними параметрами хвороби або аналогами з іншими стадами / популяціями);

- рівня достовірності, необхідного для прийняття рішень (вважають достатнім рівнем достовірності 95 % для всіх тварин, крім качок, гусей та індиків, де цей рівень має величину 49 %). Об'єм вибірки при цьому розраховують за допомогою спеціальних формул чи таблиць.

Проби від кожної тварини відбирають стерильними інструментами в окремий стерильний посуд, ідентифікуючи кожну пробу. Матеріал відбирають на межі здорової та ураженої тканини.

Для відбору патологічного / біологічного матеріалу використовують труп тварини в перші години після смерті або забивають хвору тварину, яку не лікували.

Проби відправляють у лабораторію в неконсервованому вигляді, з дотриманням температурного режиму (+4–8 °С). За неможливості доставки у лабораторію впродовж 24 год проби заморожують у термосі з льодом або консервують.

Залежно від виду інфекції у клінічно хворих тварин беруть відповідний, специфічний для цієї хвороби біоматеріал, дотримуючись заходів особистої безпеки.

Для бактеріологічного дослідження патологічний матеріал (органи або їх частини) консервують 30 % водним розчином хімічно чистого гліцерину. Воду для приготування розчину стерилізують кип'ятінням упродовж 30 хв. Для консервування матеріалу можна використовувати стерильну вазелінову олію. Матеріал заливають консервуючою рідиною у співвідношенні 1:5.

3.2.2.1. Кров

Проби цільної крові відбирають для гематології, клінічної біохімії, токсикології, безпосереднього дослідження на наявність бактерій або паразитів, для проведення ПЛР, імунологічних досліджень або для культивування бактерій чи вірусів. Залежно від потреб дослідження, цільна кров, клітини крові та / або проби плазми можуть бути отримані з цільної крові, зібраної у відповідні антикоагулянти. Під час вибору антикоагулянту для дослідження фахівець ветеринарної медицини повинен знати про методи лабораторних досліджень та можливість використання антикоагулянтів або консервантів при цьому, оскільки деякі з них можуть мати негативний вплив на дослідження. Для ефективного застосування антикоагулянтів потрібно, щоб зібрана кров ретельно змішувалася з вибраним антикоагулянтом протягом або відразу після її відбору.

Мікробні забруднення та гемоліз є суттєвими проблемами, особливо під час отримання проб крові та сироватки від загиблих тварин. Часто причиною гемолізованої сироватки та плазми є вплив високої температури або затримка часу під час відокремлення сироватки від еритроцитів, відбирання крові з використанням голки із занадто малим діаметром або неможливості видалення голки під час перенесення проби крові зі шприца.

Цільну кров слід збирати асептично, шляхом венопункції живої тварини. Залежно від виду тварини та проби використовують яремну, хвостову, плечову, головну, молочну вени.

Кров для серологічних досліджень беруть у розпал захворювання, а в деяких випадках повторно через 10–20 днів по 10 см³ від двох-трьох хворих тварин у різні пробірки.

У коней, великої рогатої худоби, верблюдів, оленів, овець і кіз кров беруть з яремної вени у верхній третині шиї в стерильні пробірки по 5–7 см³. Під час відбору кров має вільно стікати по стінках пробірки. Не допускається потрапляння крові на підлогу, ґрунт.

Кров відбирають одноразовими голками у пластикові або скляні пробірки, можна використовувати вакуумні або невакуумні системи для забору крові. Допускається відбір крові в одноразові шприци об'ємом 5–10 см³, а також взяття крові голками багаторазового використання за умови їх попередньої стерилізації кип'ятінням.

Волосяний покрив на місці проколу вистригають, шкіру дезінфікують спиртом або іншим дозволеним дезінфекційним засобом, призначеним для цієї мети.

У тварин кров беруть із вени вушної раковини або краю верхівки вуха, у птиці – з поверхні гребеня, підкрильцевої вени або серця шляхом його пункції (за наявності відповідних навичок). Шерсть, пір'я на місці взяття крові вистригають (вискубують) або виголюють, шкіру ретельно протирають ватними тампонами, змоченими спиртом, а потім ефіром. Інструменти (голки, скальпель) мають бути стерильними.

У свиней кров беруть із вени вуха або іншим способом (з хвоста, очного синуса, з передньої порожнистої вени (краще в спинному положенні)). Кінчик хвоста попередньо обмивають водою з милом і дезінфікують спиртом. Після відбору крові кінчик хвоста обробляють розчином йоду, обов'язково перев'язують лігатурою, яку знімають через 10–12 год.

У кролів невелику кількість крові можна відібрати шляхом надрізу або проколюванням вени, розташованої іззовні по тонкому краю вуха. Тварин загортають у рушник або поміщають в ящик з отвором для голови, вухо заздалегідь занурюють у теплу воду або протирають спиртом. Місцем кровопускання може служити і грудна вена, розташована на грудній клітці збоку. Після оброблення (від ліктьового суглоба до третього ребра) вену прижимають пальцем біля ліктя. Голку вводять проти течії крові. При взятті крові із серця голку вколюють у третій міжреберний проміжок зліва, на відстані 3–4 см від краю грудини.

Венопункція підкрильцевої вени, розташованої з внутрішньої поверхні крила – найпростіший метод взяття проб крові в індичок, курей і у більшості видів свійської птиці, у качок крім венопункції підкрильцевої вени крила кров легко можна взяти із підшкірної вени гомілки, біля скакального суглоба. Для більшості серологічних досліджень у птиці достатньо отримати 2 см³ крові.

У курей та індиків кров беруть також шляхом надрізу або скарифікації гребінця (сережок). У гусей і качок роблять прокол м'якуша ступні.

У гусей, качок та індиків кров беруть з внутрішньої плюсневої вени, розташованої під шкірою на медіальній поверхні плюсни, ближче до плантарного краю.

У лисиць, песців, собак кров беруть із стегнової вени.

Від норок кров беруть у скляні капіляри. Для цього норку фіксують і зрізають ножицями кіготь або м'якуш одного з пальців задньої кінцівки. До краплі, що виступила, підставляють скляний капіляр, тримаючи його горизонтально. Після заповнення кров'ю капіляр з одного боку закривають пластиліном і ставлять у спеціальний штатив з пронумерованими гніздами. Після відбору проб штатив з капілярами переносять у тепле місце (краще термостат) за $t^{\circ} 38^{\circ}\text{C}$ на 40–50 хв для зсідання крові, а потім центрифугують за 1500–3000 об./хв протягом 5–10 хв. Того самого дня ставлять реакцію.

Кров для дослідження від риби беруть із зябрової чи хвостової артерії або із серця. На місці взяття крові луску злущують скальпелем, шкіру витирають від слизу та дезінфікують 70 % спиртом. Кров набирають у пастерівську піпетку, після чого переносять на годинникове скло і швидко відбирають необхідну кількість. Кров у лабораторію доставляють у герметично закритих ємностях у термосі з льодом.

Пробірки, шприци з кров'ю нумерують (проставляють порядковий номер та номер тварини).

Щоб отримати сироватку, цільну кров збирають без антикоагулянтів і відстоюють за температури навколишнього середовища ($20\text{--}30^{\circ}\text{C}$) від декількох годин до доби. Потім згусток крові відокремлюють від стінок пробірки металеву шпигу (дротиком), яку пропалюють над полум'ям. Після чого пробірки з кров'ю вміщують у холодильник за температури $4\text{--}10^{\circ}\text{C}$. Через 18–24 годин відстояну сироватку ($2\text{--}3\text{ см}^3$) переливають у сухі стерильні пробірки (або мікропробірки епендорф) та етикетують так само, як і пробірки з кров'ю. Чиста сироватка може бути декантована або зібрана піпеткою після фізичного видалення згустків з подальшим центрифугуванням, щоб відокремити клітинні компоненти від сироватки. За відсутності центрифуги відокремити згусток можна шляхом нахилання пробірки з кров'ю приблизно на 45° доти, поки не можна буде стерильним стрижнем або піпеткою відокремити згусток від поверхні пробірки, а потім видалити згусток пінцетом. Бактеріальні забруднення та залишки еритроцитів у зразках сироватки можуть призвести до помилково позитивних реакцій під час ставлення реакції аглютинації. На серологічні дослідження негативно впливає гемоліз у зразку сироватки.

Пробірки із сироваткою закорковують і ставлять у вертикальному положенні для пересилання. Допускається надсилати до лабораторії проби крові безпосередньо у пробірках або одноразових шприцах.

Далі матеріал направляють у лабораторію в свіжому або консервованому вигляді.

Сироватку крові консервують такими методами:

- сухою борною кислотою (4 % до об'єму сироватки) до отримання насиченого розчину і утворення на дні пробірки невеликого осаду кристалів;
- заморожуванням (для дослідження на вірусні інфекції – за t° до -20°C).

Не консервована сироватка придатна для дослідження впродовж 6 днів з моменту взяття крові, якщо її зберігають за температури 4–8 °С.

Сироватка, консервована борною кислотою, придатна для дослідження впродовж 30 днів; заморожена – впродовж 3–4 днів після одноразового розморожування.

Каламутна, проросла, гемолізована сироватка дослідженню не підлягає.

Перед відправленням у лабораторію складають супровідну та опис проб (два примірники).

Першу краплю крові знімають стерильною ватою (за винятком дослідження крові на піроплазмідози, коли для мазка беруть першу краплю крові). Наступну краплю, що вільно виступила, беруть на попередньо підготовлене скло швидким і легким дотиком краплі до його поверхні. Потім скло швидко повертають догори краплею між пальцями лівої руки в горизонтальному положенні. До лівого краю краплі торкаються під кутом 45° шліфованим краєм іншого предметного (чи покривного) скла. Коли крапля рівномірно розподілилася по ребру цього скла, ним швидко проводять по поверхні предметного скла справа наліво, не доводячи до краю на 0,5–1 см. Ширина мазків має бути вужчою від предметного скла. Для кожного нового мазка беруть свіжу краплю крові.

Готові мазки крові висушують на повітрі, підсушувати їх над полум'ям чи на сонці не рекомендується. В холодну пору року мазки роблять у теплом приміщенні або на скельцях, які підігрівають.

Метод фіксації мазків залежить від мети дослідження.

Правильно виготовлені мазки крові мають бути тонкими, рівномірними і достатньої довжини. Висушені мазки і відбитки підписують простим олівцем або маркером (склографом), указуючи номер чи кличку тварини і дату виготовлення мазка.

Необхідно відбирати та розподіляти проби крові максимально спокійно, щоб уникнути пошкодження еритроцитів, що спричинює гемоліз. Кров і сироватку перевозять і зберігають у прохолодному або замороженому вигляді (для сироватки). Для деяких досліджень проби можна висушити на шматку необробленого або спеціально обробленого фільтрувального паперу, призначеного для транспортування та зберігання стабілізованої проби.

Кров стабілізують етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА).

3.2.2.2. Фекалії

Фекалії можуть бути зібрані свіжовичавленими або відібрані безпосередньо з прямої кишки / клоаки, або можуть бути зібрані, використовуючи бавовняні, дакронні або марлеві наконечники, залежно від обсягу проби, що вимагається специфічною методикою дослідження. Проби, зібрані на мазках, мають залишатися вологими, для цього їх слід помістити у

транспортний носій (стерильний розчин, культурні середовища, що містять антимікробні препарати або стабілізатори), рекомендований для проведення відповідних досліджень. Проби фекалій слід зберігати охолодженими за $t^{\circ} +4^{\circ} \text{C}$ або на льоду і досліджувати якнайшвидше після відбору, щоб мінімізувати негативні наслідки для результатів досліджень, спричинені загибеллю цільового мікроорганізму, проростанням бактерій або виведенням з яєць паразитів. Пакують проби фекалій у подвійну тару зі щільною кришкою або у щільні контейнери, які в подальшому поміщають у герметичні поліетиленові пакети, які запобігатимуть перехресному забрудненню проб та пакувальних матеріалів. Поліетиленові пакети або пробірки з гумовим корком для транспортування фекалій, відібраних з прямої кишки, непридатні, оскільки проби дуже часто містять газоутворювальні бактерії, які можуть розірвати пластикові пакети, витіснити корки та призвести до витікання проби.

Фекалії для дослідження надсилають у стерильних склянках, пробірках чи банках, щільно закритих пергаментним папером. Від трупів тварин фекалії можна надсилати у відрізок кишківника, перев'язаному з обох кінців.

Матеріал доставляють у лабораторію не пізніше 24 год з часу його відбору і з обов'язковим дотриманням температурного режиму. Матеріал не консервують.

3.2.2.3. Сеча

Відбір сечі проводять вранці до годівлі тварини або через 4–5 год після останнього сечовипускання. Відбирається середня проба сечі. Відбір сечі проводять шляхом проколювання сечового міхура, за допомогою катера або природним шляхом. Вибір методу може впливати на результат аналізу. Відбирання сечі останніми двома методами супроводжується бактеріальним забрудненням. Відібрана сеча природним шляхом може відображати зміни, які відбуваються в нирках або нижніх ділянках сечостатевих шляхів. За деяких захворювань необхідно відбирати добову кількість сечі, а для звичайних досліджень відбирають в стерильний посуд 30–200 cm^3 . Сеча в лабораторію доставляється впродовж 2–4 год після її отримання або заморожується. Для консервування сечі використовують формальдегід (1 краплю 40 % формальдегіду на 30 cm^3 сечі) або антимікробні препарати (тимол, толуол, борну кислоту тощо).

3.2.2.4. Тканини від трупів тварин

Відбір тканини від трупу тварини має проводити лише кваліфікований лікар ветеринарної медицини та патологоанатом. Патолого-анатомічний розтин проводять не тільки з метою відбору проб, але й надання інформації щодо патологічних змін в організмі. Такі спостереження є важливим доповненням до

епізоотологічних та клінічних спостережень у комплексному ветеринарному дослідженні випадків або спалахів хвороби.

Проби відповідного патологічного матеріалу відбирають для визначення або підтвердження причин захворювання, загибелі тварин (птиці, звірів, бджіл, риби) за підозри на інфекційну, інвазійну хворобу або отруєння, або забою хворої тварини, яку не лікували.

Розтин трупу необхідно провести у перші години після загибелі, тому що за трупного розкладання вторинна мікрофлора кишечника контамінує усі органи та тканини.

Залежно від підозрюваного захворювання, стану туші та об'єктів, доступних для відбирання посмертних проб, зразки відбирають від одного або декількох органів та надсилають у лабораторію свіжими (неконсервованими) або консервованими для подальших лабораторних досліджень.

Для дослідження в лабораторію направляють паренхіматозні органи та трубчасту кістку. Трупні дрібних тварин або патологічний матеріал пакують у водонепроникну тару та додають супровідну. За відбирання матеріалу для посмертного діагностування патологічний матеріал відбирають якнайшвидше: не пізніше 12 год після загибелі тварини взимку та 6 год – у теплу пору року, який консервують або відправляють свіжим. Аутилізований патматеріал для виділення збудників не придатний.

Проби крові відбирають стерильним шприцом з лівого шлуночка серця. Пункцію проводять після оброблення вибраної ділянки стерильною, зволоженою 3% розчином перекису водню серветкою та наступним видаленням антисептику стерильною, зволоженою стерильним фізрочином серветкою.

Дезінфікування вибраної ділянки для пункції можна провести припіканням тканин шпателем. Для проби з лівого шлуночка серця моноветом або стерильним шприцом відбирають 10 см³ крові, яку після відбирання переносять у стерильний флакон з подвійним середовищем та закорковують ватно-марлевым корком. Для визначення бактеріємії відібрані проби крові (10 см³) переносять у ємності для аеробного та анаеробного культивування.

Проби (шматочки) органів та / або тканин відбирають розміром не менше 3–5 см³ (обов'язково проби селезінки, регіонарних та віддалених лімфовузлів, запалених вогнищ), кожен поміщають в окрему стерильну посудину (одноразові стерильні контейнери з корками, які загвинчують, або чашки Петрі діаметром 55 мм. Можна використовувати ємності з транспортними середовищами, які дозволені для застосування з цією метою в установленому порядку. Ємності з матеріалом маркують із зазначенням органу та / або тканини.

Гній із запалених порожнин, спинно-мозкову рідину та інші рідини відсмоктують стерильним шприцом в об'ємі не менше 7–10 см³ та поміщають у стерильні одноразові пробірки або залишають у шприцах,

закоркованих стерильними гумовими корками, або у ємностях для транспортування. Проби маркують.

Матеріал від трупів з гнійно-запальною патологією доставляють в лабораторію впродовж 1 год після відбирання. Рідкий патматеріал (кров, слиз, сечу, жовч тощо можна набирати в одноразові шприци або пастерівські піпетки, які після відбирання матеріалу, уникаючи нагрівання, запаюють з обох кінців, після чого їх обгортають ватою та поміщають у пробірки.

Крім цього, різні виділення можна надсилати у вигляді мазків або мазків-відбитків, які фіксують на повітрі, загортають кожен окремо в пергамент та маркують.

Від несвіжих трупів обов'язково відбирають трубчасту кістку. Від патологічного матеріалу невстановленої свіжості для бактеріологічних досліджень направляють кістковий мозок. Від несвіжих трупів з метою виключення сибірки відбирають вухо або інший матеріал.

Свіжі трупи дрібних тварин, частини трупів великих тварин та окремі органи направляють нарочним.

Свіжим пробам приділяють особливу увагу щодо їх обробки та зберігання, уникаючи аутолізу та забруднення бактеріальними та грибовими збудниками. Свіжовідібрані проби зберігають за постійної прохолодної температури (2–8 °С) від самого взяття і до проведення дослідження. Якщо неможливо забезпечити холодним зберіганням, свіжі проби для деяких досліджень можна поміщати у спеціальні розчини, такі як етиленгліколь, що інгібують ріст вторинних мікроорганізмів. Для збереження посмертних проб найчастіше використовують формалін.

Після відбирання проб усі залишки тканин або частин туші та рідини мають бути зібрані та продезінфіковані відповідним методом чи знищені, а місце розтину трупу ретельно дезінфікують.

Для бактеріологічного дослідження в лабораторію направляють шматочки шкіри, слизових оболонок, паренхіматозних органів, трубчасту кістку, спинний та головний мозок, лімфатичні вузли, проби рідини з грудної та черевної порожнин, відрізок кишківника, ізольований лігатурами, плоди, плідні оболонки тощо. Проби кожного органа поміщають в окремий посуд та маркують. У кожному випадку необхідно відбирати матеріал, у якому можна виявити характерні зміни для конкретної хвороби. Волосся та ділянки шкіри – у разі захворювання шкіри.

Для вірусологічних досліджень направляють проби від тварин у трьох стадіях хвороби:

- від хворих тварин з вираженими клінічними ознаками із зазначенням температури тіла, частоти пульсу та дихання (кров, кістку, лімфатичні вузли та уражені органи);
- від забитих в агональному стані – кров, кістку, лімфатичні вузли та уражені органи;

- від тварин у стадії одужання (кров).

Для вірусологічного дослідження проби відбираються як можна раніше після виявлення клінічних симптомів. Вірогідність виявлення вірусу найбільша у перші 3 доби та різко знижується впродовж наступних 5 діб. Проби відбирають із дотриманням асептичних умов, кожен зразок відбирають в окремий стерильний контейнер, що загвинчують. Можна використовувати стерильні конічні центрифужні пробірки (15–50 см³), які загвинчують, а також маленькі (4 см³), в які вносять 1–2 см³ вірусного транспортного середовища. Проби доставляють в лабораторію у транспортному середовищі або в термоконтейнерах на льоду.

Для вірусологічного дослідження в лабораторію від трупів чи забитих тварин направляють патматеріал у свіжому вигляді або консервованим 30 % розчином гліцерину, приготованому на фосфатно-буферному розчині (рН 7,2–7,4).

Для вірусологічного дослідження матеріал упаковують у поліетиленовий пакет і поміщають у термос з льодом або консервують 30–50 % розчином хімічно чистого гліцерину на стерильному фізіологічному розчині. Фізіологічний розчин попередньо автоклавують за 120 °С впродовж 30 хв. Відбирають кров або її сироватку, змиви з носоглотки та інші рідини організму, стінки, вміст афт, папули (вузлики), везикули (серозні пухирці), пустули (гнійні пухирці), шматочки головного мозку, печінки, легенів, селезінки або шматочки інших органів і тканин, в яких вірус передбачуваного захворювання міститься в найбільшій кількості відповідно до тропізму вірусу.

Для бактеріологічного і вірусологічного досліджень відбирають ділянки кишківника з найхарактернішими патологічними змінами. Потім кишківник відмивають від фекальних мас і кладуть у склянки окремо від інших органів. За необхідності консервують 40 % розчином гліцерину у співвідношенні 1:10.

Для гістологічних досліджень патматеріал відбирають тільки від свіжих трупів. В лабораторію направляють шматочки уражених тканин площею 3–4 см², завтовшки не більше 1 см, які межують з незміненими ділянками тканин. Ділянку поверхні органа або тканини трупу, з якої мають відбирати пробу, очищають від забруднення, знезаражують спиртом або припікають нагрітою металеву пластину (шпателем). Матеріал відбирають стерильними інструментами та поміщають у стерильний посуд (пеніцилінові флакони, пробірки тощо).

Під час відбору патологічного матеріалу для проведення гістологічних досліджень в обов'язковому порядку слід враховувати підозру на захворювання та результати патолого-анатомічного розтину трупа тварини. Для гістологічного дослідження матеріал (органи і тканини, в яких відстежено ті чи інші патологічні зміни) відбирають зі свіжих трупів або забитих тварин. З різних ділянок органів (тканин) із патологічними змінами (на межі патологічно зміненої тканини та розміщеної поряд з нормальною) вирізають невеликі шматочки завтовшки

2×3 см. Під час вирізання шматочка враховують мікроскопічну будову органа і тканини. Так, шматочки з нирки мають складатися з коркового і мозкового шарів. У випадку загибелі дрібних тварин паренхіматозні органи відбираються цілими. Під час вирізання проб із органа однакової будови захоплюють і його капсулу.

Одразу ж після відбору матеріал переносять до фіксуєчої рідини, об'єм якої в 10–20 разів має перевищувати об'єм взятого матеріалу. Для фіксації найчастіше використовують 10 % водний нейтральний розчин формаліну. За відсутності формаліну можна використовувати 96 % етиловий спирт. У разі застосування спирту товщина шматочків тканини не має перевищувати 0,5 см. Фіксуєчу рідину змінюють через добу. Патологічний матеріал фіксують у скляному посуді, який герметично закривається.

Для *гістохімічних досліджень* патологічний матеріал фіксують у 96 % етиловому спирті, рідині Карнуа або рідині Буєна. На етикетці обов'язково вказують назву фіксуєчого розчину.

З метою запобігання промерзанню матеріалу під час пересилання у зимовий період, зафіксований у формаліні матеріал перекладають у 30-50% розчин гліцерину, приготовлений на 10 % формаліні або в 70 % спирті, або у насиченому розчині кухонної солі.

Заморожений патологічний матеріал не придатний для проведення гістологічних досліджень.

Патологічний / біологічний матеріал, який надсилають для дослідження молекулярно-генетичними методами, заборонено консервувати будь-якими речовинами.

Для *молекулярно-біологічного дослідження* направляють макробіоптат (макроаутоптат) (шматочки тканин: селезінки, лімфатичних вузлів тощо) масою 50–100 г), поміщають у контейнери з 0,85 % розчином натрію хлориду або транспортне середовище.

Зберігання та транспортування біологічного матеріалу для дослідження методом ПЛР мають здійснювати з дотриманням холодого режиму: проби крові – за температури 2–8 °С впродовж 1 доби; проби плазми та сироватки крові – за температури 2–8 °С впродовж 5 діб, за температури -70 °С – без обмежень.

3.2.2.5. Епітеліальна тканина

Проводять за захворювань, які викликають ураження епітеліальних покривів, супроводжуються утворенням виразок і абсцесів (ячур, везикулярний стоматит, віспа, бугорчатка тощо). Від живих тварин беруть проби крові та епітелій з ділянок ураження, від загиблих або забитих тварин посилають шматочки шкіри на межі здорових і уражених ділянок.

Епітеліальну тканину відбирають шляхом біопсії або зішкрібів зі шкіри, тампонів для ротової порожнини, носа, глотки та шлунково-кишкового тракту. Зрізане волосся або шерсть можуть бути використані для

клінічногодіагностування або лабораторних досліджень для виявлення поверхневих паразитів, таких як кліщі та воші, грибкових, бактеріальних та вірусних інфекцій, алергічних реакцій та неоплазії. Проби відбирають асептично та зберігають відповідно до запланованих досліджень. Епітеліальні тканини, які пов'язані з везикулярними ураженнями і обов'язково зібрані у вірусні транспортні середовища, можуть бути корисними в лабораторному діагностуванні специфічних вірусних інфекцій (ящур, чума тощо).

Проби шкіри відбирають з периферії вогнищ ураження, що не піддавалися медикаментозному лікуванню. Скоринки із залишками шерсті, а також деяку кількість вовни висмикують пінцетом із заражених ділянок (за можливості менш забруднених). Волосся вищипують, а зішкріби зі шкіри роблять скальпелем на межі ураженої і здорової тканин. У лабораторію відправляють зішкріби епідермісу з вогнища ураження і кірки з периферії вогнища, а також виділення вмістимого за його наявності. За множинності вогнищ відбір слід проводити окремо з вогнищ, розташованих на різних ділянках тіла. Матеріал поміщають у пробірки з ватними корками або паперові пакетики.

За необхідності дослідження шкіри відбирають найбільш уражені її частини розміром не менше 3×3 см. Матеріал надсилають у стерильному, герметично закупореному посуді.

Для бактеріологічного дослідження вовну беруть із різних місць не менше 5 проб масою близько 2 г кожна (краще брати пучок забрудненої вовни). Якщо вовна упакована в паки, беруть не менше 10 зразків із різних місць кожної паки, а також пил, що зібрався всередині обшивки. Проби від однієї паки об'єднують і упаковують разом. Кожну відібрану пробу поміщають у суху стерильну скляну банку і закривають стерильною кришкою, корком або пергаментом. Можна використовувати поліетиленові мішечки, які зав'язують шпагатом.

Відбирають 5 шматочків розміром 3×3 см з периферичних, не гнилих і без плісняви ділянок шкіри. Якщо шкіри зберігаються в тюках, кіпах (велика партія), для дослідження відбирають від кожного тюка не менше 3 проб із різних місць та об'єднують в одну пробу. У разі виявлення з внутрішнього боку шкіри крововиливів чи інфільтратів проби відбирають саме з таких ділянок.

Для бактеріологічного і вірусологічного досліджень відбирають ділянки кишківника з найхарактернішими патологічними змінами. Потім кишківник відмивають від фекальних мас і кладуть у склянки окремо від інших органів. За необхідності консервують 40% розчином гліцерину у співвідношенні 1:10.

3.2.2.6.Проби з ока

Проби з поверхні ока відбирають шляхом промивання або очищення очей з метою відбору клітин, а не слизових виділень або сліз. Проби з кон'юнктиви збирають, тримаючи пальцями повіку і злегка торкаючись поверхні ока бавовняним, дакроновим або марлевым тампоном, попередньо зволоженими

стерильним фізіологічним розчином або еквівалентним середовищем. Такі мазки слід зберігати у вологих фізіологічних або транспортних середовищах, спеціально рекомендованих для досліджень. Для виявлення пріонів використовують біопсію з третьої повіки овець, яка багата лімфоїдною тканиною.

Пробу можна відібрати стерильним ватним тампоном, бактеріологічною петлею або стерильною очною паличкою. Виділення беруть з внутрішньої поверхні нижньої повіки у напрямку до внутрішнього кута очної щілини. Необхідно слідкувати, щоб вії під час мигання не торкалися тампона. За відсутності видимого гною використовують тампони, зволожені стерильним ізотонічним розчином. Секрет зі слізного мішка відбирають стерильним ватним тампоном після обережного масажу. Матеріал з рогівки відбирають платиновою петлею після місцевого знеболювання. За наявності кірочок їх попередньо видаляють пінцетом, а проби відбирають стерильним зволженим (0,5 см³ фізіологічного розчину) ватним тампоном з виразок.

3.2.2.7.Проби з репродуктивних органів

Рідини і мазки з родових шляхів, піхви, матки та уретри використовують для дослідження захворювань репродуктивних органів. Проби слід зберігати вологими після відбирання шляхом розміщення їх у транспортне середовище (стерильний фізіологічний розчин або культуральне середовище). Проби сперми отримують за допомогою штучної піхви або екструзії пеніса та штучної стимуляції. Необхідно уникати забруднення проби антисептичними або детергентними розчинами, які використовують для підготовки тварини / ділянки для відбору проб.

3.2.2.8.Назальна рідина, слина та везикулярна рідина

Для відбору проб носового секрету крила носа і передню частину носових ходів обмивають водою, після чого виділення збирають стерильними тампонами з глибоких частин носа. Тампони поміщають у стерильні пробірки, що містять по 0,5 см³ стерильного фізіологічного розчину. Проби секрету з носа відбирають за допомогою тампона, розміщеного на гнучкій ручці з дроту. Тампон на декілька секунд вводять у ніздрю паралельно піднебінню. Після чого коловими рухами повільно виймають зонд, притискаючи його до нижньої внутрішньої поверхні носа. Проби з обох ніздрів відбирають одним і тим самим тампоном. Тампони мають бути в контакт з секретом до 1 хв, потім їх поміщають у пробірку з транспортним середовищем і відправляють в лабораторію без затримки за температури транспортування 4±0,5 °С. Гнійні виділення і (або) скоринки попередньо видаляють ватним тампоном, змоченим у стерильному фізіологічному розчині, у напрямку зсередини назовні. Забір матеріалу проводять коловими рухами стерильного аплікатора з ватним наконечником і

поміщають у стерильну пробірку з транспортним середовищем або в стерильну пробірку.

Секрети відбирають безпосередньо у флакон чи пробірку або за допомогою мазка. Відібрані рідини забезпечують висококонцентроване джерело патогену для діагностичного дослідження і збирають з нерозкритих пухирців за допомогою стерильної голки та шприца і негайно переносять надійно закритий флакон або пробірку. Спеціальними інструментами (пробірні чаші) для відбору проб відбирають клітинний матеріал та слиз з глотки тварини. Бавовняні джгути, які тварини жувають, використовують для відбору проб слини домашніх свиней.

3.2.2.9. Мокротиння

Мокротиння краще відбирати до годівлі тварин вранці. Перед початком відбору необхідно ретельно промити чистою водою ротову порожнину хворої тварини (у ВРХ не дозволяється змішувати мокротиння зі жуйкою). Мокротиння отримують шляхом відбору вмісту ротової порожнини після відкашлювання. Якщо не вдається відібрати таким чином, тоді вміст верхніх дихальних шляхів отримують за допомогою трахеобронхіальних зондів (або еластичних трубочок) та відсмоктують вміст. Після відбирання мокротиння поміщають у чисту суху посудину зі широким горлом або чашку Петрі. Відібраний матеріал необхідно якнайшвидше дослідити. Зберігають мокротиння за температури 3–6 °С впродовж 6–8 год.

Мокротиння у рогатої худоби збирають методом викликання кашлю, обмотавши шматком полотна ніс і рот та стискаючи носові отвори. Після кашлю знаходять на полотні невелику кількість мокротиння. Якщо змусити тварину кашляти і при цьому тримати у неї язик витягнутим з рота, нахилиючи голову донизу, можна зібрати на тарілку великі маси мокротиння. Після кашлю слиз залишається на стінці глотки, а в деяких випадках – між язиком і корінними зубами. Звідти його дістають тампоном або стерильною марлевою серветкою, які і направляють у стерильному посуді в лабораторію. Слиз можна зібрати з трахеї шляхом введення в неї стерильного тампона на дроті через трахеотубус.

3.2.2.10. Молоко

Для діагностування деяких інфекційних хворобу лабораторію направляють проби молока, яке відбирають індивідуально від кожної тварини в чистий та маркований посуд. За необхідності формують пули з проб молока згідно з відповідними методиками.

Перед взяттям проб молока у корів вим'я обмивають теплою водою, дійки обробляють 70° спиртом. З кожної долі вимені беруть останні порції молока по 10–15 см³ в окремі стерильні пробірки з гумовими корками.

В овець і кіз проби молока беруть шляхом пункції цистерни вимені. Для цього тварину фіксують у боковому положенні, вим'я біля основи дійки протирають 70° спиртом і змащують настоянкою йоду. Стерильним шприцом з голкою роблять пункцію біля основи дійки і після потрапляння голки в цистерну (про що судять за вільним рухом кінця голки) набирають у шприц молоко і переносять його в стерильну пробірку з гумовим корком.

Перед відбором середньої проби молоко ретельно перемішують. Пробу відбирають металевою трубкою діаметром 9 мм, яку вертикально занурюють до дна ємності. Верхній отвір затискають пальцем, трубку виймають з ємності, і молоко зливають в посудину, яку щільно закривають. Середня проба молока для дослідження становить 250–500 см³.

Дводобові проби молока консервують 40 % розчином формаліну з розрахунку 1–2 краплі на 100 см³ молока.

Зразки молока зберігають та доставляють до лабораторії впродовж 3–4 год з моменту взяття проб у спеціальних ємностях, що забезпечують температуру не вище 4–10 °С або в термосі з льодом.

Забороняється направляти на дослідження молоко від корів у перші 2 тижні після отелення.

3.2.2.11. Проби з абсцесів, лімфовузлів та виділення з ран

Шерсть на місці ураження вистригають, шкіряний покрив обробляють 70 % спиртом і змащують настоянкою йоду. Потім стерильним шприцом з голкою великого діаметра роблять пункцію і переносять пунктат у стерильну пробірку з гумовим корком. Гнійні виділення і скоринки слід видалити ватним тампоном, змоченим у стерильному фізіологічному розчині, у напрямку від центра до периферії. Забір матеріалу проводять коловими рухами стерильного аплікатора з ватним наконечником і поміщають у стерильну пробірку з транспортним середовищем або в стерильну пробірку, взятую в лабораторії. Всю поверхню абсцесу дезінфікують, роблять прокол шкіри, набираючи вміст у шприц. Таким самим чином відбирають вміст пустул і везикул. Гній з розкритих абсцесів, гнійників, фурункулів і виділення з ран беруть стерильним тампоном з глибини. Матеріал з виразок і ран отримують методом зішкріба на межі ураженої і здорової тканин.

Під час взяття пункції з лімфатичного вузла тварину добре фіксують, на місці пункції вистригають шерсть, шкіру протирають ватним тампоном, змоченим у спирті або розчині йоду. Лівою рукою відтягують лімфатичний вузол і утримують між великим і вказівним пальцями. Потім у глибину вузла вводять стерильну голку, надягають на неї шприц і відсмоктують лімфу. Шприц від'єднують, голку витягують, а вміст шприца витискають поршнем на предметне скло. Роблять тонкі мазки і висушують. Місце пункції дезінфікують розчином йоду.

Гній, виділення з різних порожнин, природних отворів для мікроскопічного дослідження (для виявлення в них мікроорганізмів, паразитів) надсилають у вигляді мазків.

Предметні скельця попередньо кип'ячать протягом 10–15 хвилин в 1–2 % водному розчині соди, потім добре промивають чистою водою і насухо витирають. Сухі скельця кладуть у розчин спирт-ефіру, взятих порівну, де і зберігають до використання.

Проби з гнійних ран відбирають шприцом з голкою або без неї шляхом аспірації, який закривають гумовим стерильним корком або вколюють голку у стерильний гумовий корок.

Якщо гній дуже густий, його зішкрібають та збирають у стерильний одноразовий контейнер або за допомогою стерильного зонда-тампона (бавовна, віскоза, альгінат) поміщають у суху стерильну одноразову пробірку або ємність з транспортним середовищем.

Під час відбирання проб під час операції шматочки тканин (3–5 см³) поміщають у стерильний контейнер або скляну ємність, додають 3–5 см³ небактеріостатичного фізіологічного розчину для запобігання висиханню матеріалу.

3.2.2.12. Кістки

Цілі трубчасті кістки з неушкодженими кінцями очищають від м'язів і сухожилків, надсилають у герметично заклеєному пластиковому мішку.

Від дрібних тварин можна відібрати невеликий шматочок ребра або трубчастої кістки, попередньо звільнивши їх від м'язової і хрящової тканин. Від великих тварин можна нашкребтиножем або скальпелем тканину кісткового мозку з будь-якої трубчастої кістки, лопатки, хребців, грудної кістки. Для цього потрібно оголити суглобову поверхню, зрізати хрящ і кінцем ножа або скальпеля, обертаючи їх, нашкребти і помістити у флакон необхідну кількість (5–10 г) кістково-мозкової тканини.

Кістки можна також консервувати кухонною сіллю (пересипання кісткового матеріалу сіллю та щільне обмотування (обгортання)).

3.2.2.13. Проби з мозку

Патологічний матеріал (головний мозок) відбирають від тварин з клінічними ознаками ураження центральної нервової системи. При цьому мозок для гістологічних, електронно-мікроскопічних та імунохімічних досліджень відбирають одразу після забою або загибелі тварини до моменту наступання лізису тканин або розмноження іншої супутньої мікрофлори.

Для цього слід відокремити голову від шиї по атланта-потилочному з'єднанню і добре зафіксувати. Зняти шкіру і м'язи з черепної коробки, зробивши

надрізи між очними западинами і від них убік потилиці. За допомогою пилки, сокири, ножиць і пінцета зняти черепну коробку. Відокремити основні нерви, вилучити мозок і помістити його на квету або дошку. Відібрати проби кори великих півкуль і основи спинного мозку. Для дослідження на сказ необхідно відібрати проби амонових рогів. Для цього потрібно розітнути поздовжніми розрізами кожну центральну півкулю на відстані 2 см (для собак) від середньої лінії мозку, видалити верхні частини до щілини (простору), в якому знаходяться амонові роги, що являють собою напівциліндричні тіла білого кольору. Потрібно взяти кілька шматочків амонових рогів і основи спинного мозку. Загальна вага кожної проби має бути 5–10 г.

Відокремлену від трупу голову пакують у поліетиленову плівку, поміщають у металевий ящик з льодом та транспортують у лабораторію за температури 2–5 °С.

3.2.2.14. Відбір проб за підозри на захворювання з ознаками ураження нервової системи

У разі захворювань, що супроводжуються ознаками уражень нервової системи (хвороба Тешена, Ауєскі, отит, рикетсіоз, спорадичний енцефаломієліт великої рогатої худоби, сказ тощо), беруть проби мозку, кістки, лімфовузли, кров і, за наявності уражень, інші органи. Слід надсилати також кров від перехворілих тварин для виявлення антитіл у серологічних реакціях. Для отримання переконливих результатів бажано пересилати проби крові від великої кількості перехворілих тварин (до 10 проб). Запідозри на сказ необхідно, за можливості, надсилати цілу голову, не вдаючись до відбору проб мозку. Якщо в лабораторію надсилають цілу голову, її слід загорнути в папір, додатково упакувати в пластиковий мішок, помістити у відро або бляшанку, що не протікає, і терміново доставити в лабораторію. Відбирати проби мозку можна тільки за створення гарантованої безпеки фахівців, що працюють з цим матеріалом, а потім продезінфікувати робоче місце. Проби мозку може відбирати лише фахівець, у якого немає поранень на руках, обов'язково в гумових рукавичках та який щеплений проти сказу. Персонал, який не бере участі в цій операції, має знаходитися на відстані від цього місця роботи.

3.2.2.15. Проби від медових бджіл

Для бактеріологічних, мікроскопічних, серологічних, біологічних, хімічних та інших досліджень відбирають проби живих бджіл та їхні трупи; стільники з розплодом, медом, пергою; висохлі бджолині личинки, випорожнення або зішкреби калу; мазки гемолімфи або відбитки м'язів на предметному склі; воскопергові крихти з дна вуликів; комах-паразитів та шкідників бджіл.

Залежно від виду та методу досліджень відбирають від 50 до 500 живих / трупів бджіл від різних сімей, зразки стільників розміром 10×15 см із загиблими личинками та лялечками, сміття з дна вуликів (не менше 200 г з пасіки, весною – бджолиний розплід на стільнику розміром 3×15 см, 200 г відкачаного незапечатаного меду, 50 г перги в стільнику).

Патологічний матеріал упаковують і направляють, дотримуючись таких правил: живих бджіл вміщують у склянки, які обв'язують двома шарами марлі чи тканини; проби стільників з розплідом і стільникові рамки пересилають у фанерному чи дерев'яному ящику, не загортаючи папером, а відділяючи їх один від одного і від стінок ящика дерев'яними планками; хворих живих бджіл – на закріплених стільникових рамках з кормом у кількості, достатньому на час перевезення, у фанерному чи дерев'яному ящику; мертвих бджіл і сміття з дна вуликів — у паперових пакетах. Мед – у щільно закритих склянках.

3.2.2.16.Проби від риби

Хвору або підозрілу у захворюванні інфекційними та інвазійними хворобами рибу надсилають у лабораторію живою. Для дослідження відбирають 15–20 особин з добре вираженими ознаками захворювання.

Рибу перевозять у чистих ваннах або інших ємностях, призначених для перевезення живої риби, заповнених на $\frac{3}{4}$ об'єму водою з того самого водоймища, звідки відібрана риба, або з артезіанської свердловини. Риба, надіслана в лабораторію в папері, марлі або інших пакувальних матеріалах, для дослідження не є придатною.

Влітку у разі тривалого транспортування воду з рибою поступово охолоджують до температури 12–15 °С, додаючи дрібні шматочки льоду. Для уникнення температурного шоку не можна пересаджувати рибу в холоднішу воду, ніж у водоймі (різниця на 7 °С і більше).

Якщо неможливо надіслати живу рибу, то від великих особин беруть шматочки уражених органів і тканин. Проби поміщують у стерильну скляну посудину, заливають стерильним 40 % водним розчином гліцерину, закривають герметично і доставляють у лабораторію нарочним. Кров, ексудат, вміст кишківника надсилають у запаяних стерильних пастерівських піпетках. Влітку патологічний матеріал придатний для бактеріологічного дослідження впродовж 2 годин з часу його взяття. Взимку можна заморозити проби.

Для вірусологічного дослідження живу рибу пакують у подвійний поліетиленовий пакет, заповнений водою на $\frac{1}{3}$ об'єму, та поміщають на лід. Пакет пакують у ящик і доставляють у лабораторію нарочним. Мертву рибу надсилають тільки в тому випадку, якщо вона загинула після вилову перед відправленням у лабораторію. Відібрану рибу пакують у поліетиленовий пакет, який поміщають у термос з льодом. Для вірусологічних досліджень проби внутрішніх органів (органи від 5 рибин об'єднують в одну) відбирають

асептичнота поміщають у стерильний флакон, який щільно закривають та поміщають у термос або пакет з льодом.

За неможливості негайного відсилання пакет зберігають у холодильнику за температури не вище +4 °С впродовж доби. Патологічний матеріал від хворої або підозрюваної на захворювання вірусною інфекцією риби дозволяється консервувати 50 % фосфатно-буферним розчином гліцерину (рН 7,2–7,4).

Матеріал для гістологічних досліджень беруть від хворої заснулої риби. Дрібних рибин (мальок, однолітки) після розтину черевної порожнини фіксують цілими, а від великих беруть органи або шматочки органів розміром 2×3 см, завтовшки 0,5–1 см.

Шматочки з уражених органів вирізають, захоплюючи нормальні та ураженні тканини. Незалежно від ступеня ураження відбирають проби різних органів (шкіру з м'язами, зябра, печінку, селезінку, серце, кишківник, плавальний міхур, головний мозок). Кишківник перед фіксацією розтинають або роблять на ньому декілька розрізів, щоб фіксуюча рідина проникла в його порожнину. Головний мозок після розтину черепної коробки виймають цілим. Проби поміщають у широкогорлу скляну банку і фіксують.

У кров для біохімічних досліджень додають лимонно- або щавлевокислий натрій (на 1 см³–2 см³), 1–2 % розчин гепарину (на 1 см³ – 0,01–0,04 см³) і доставляють у лабораторію в герметично закритих склянках (пробірках) з етикетками.

За підозри на отруєння риби відбирають проби води з водоймищ безпосередньо на місці загибелі риби, стічні води промислових підприємств та сільськогосподарських об'єктів, що знаходяться поблизу водозбірної площі цього водоймища.

3.2.3. Біопсія/М. Кандефер - Гола/

Біопсія – це діагностична процедура, що включає вилучення зразків клітин або тканин для обстеження з метою визначення наявності та поширення хвороби. Біопсії зазвичай проводять для того, щоб розмежувати запальні, ракові або інші стани.

Види процедур біопсії:

1) ексцизійна біопсія – видаляють всю пухлину;

2) інцизійна біопсія – відбирають кілька менших зразків;

3) тонкогільчата біопсія – цитологія – проба або рідина, яку збирають переважно голкою.

1. Ексцизійна біопсія

Це загальний підхід для масового вилучення у ветеринарії, але він залишається суперечливим. Він може поставити діагноз і, отже, і план лікування, але масу видаляють, не знаючи типу пухлини. Він дуже інвазивний.

У наші дні рекомендують менш інвазивну процедуру біопсії для ветеринарних хірургів, яка може бути більш придатною для отримання адекватного запасу тканини.

Ексцизійна біопсія найкраще підходить у випадках, коли прийнятні хірургічні поля легко досяжні лише за біопсії (наприклад, невелика шкірна маса на тулубі собаки).

а. Відбір проб

Відбирають проби під загальним наркозом. Хірургічні межі слід визначати до операції; загалом – 1 см у доброякісних масах, 3 см за агресивних пухлин. Після того як пробу буде зібрано і правильно підготовлено, гістопатолог оцінює її.

б. Підготовка та фіксація

Час між забором проб та фіксацією має бути мінімізованим. Зразок біопсії слід якомога швидше після процедури помістити у фіксатор. Зразок не має бути некротичним.

Коли оцінка тканини важлива, краніальну та куприкову межі слід маркувати (швами або чорнилом).

Менші зразки (3–5 мм) можна фіксувати в повному обсязі. Більш великі зразки слід розрізати принаймні навпіл, перед фіксацією або можна підготувати менший зріз тканини. Якщо зразок оточений товстою капсулою, її також слід вирізати (рис. 1). Фіксацію можна проводити 10 % забуференим формаліном, спиртом або заморожуванням за низької температури (-80 °C). Необхідно використовувати не менше 10 об'ємів формаліну на один об'єм тканини (рис. 2).



Рис. 1. Ексцизійна біопсія. Пухлина з правого боку має бути розрізана хоча б навпіл або нарізана дрібнішими шматочками

Фіксативне проникнення зазвичай безпосередньо пов'язане з товщиною тканини. Якщо зразки дуже великі, потрібно багато часу, щоб закріплювач проник у внутрішню частину зразка. Внаслідок цього в центрі товстих тканин може відбутися аутоліз.

с. Транспортування

UN 3373 – Біологічна речовина, категорія В. Гістопатологічні зразки мають бути транспортовані відповідно до 49 CFR, частина 173.199 або Інструкції з упакування IATA 65.

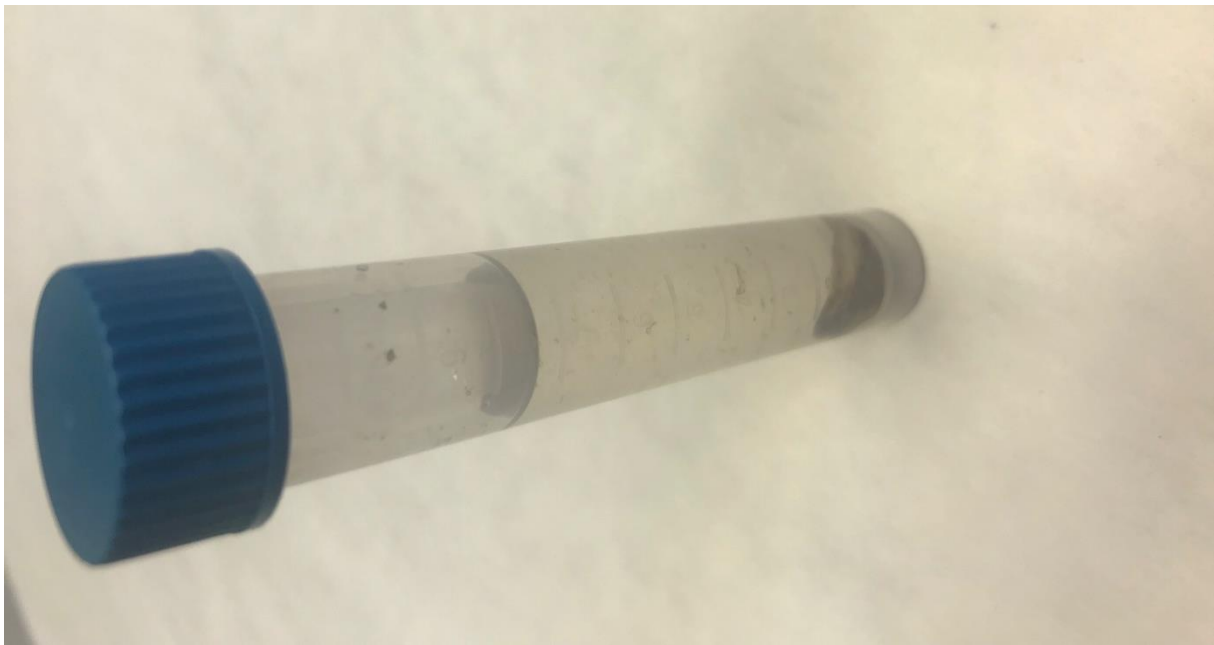


Рис. 2. Первинне пакування. Було використано достатню кількість формаліну

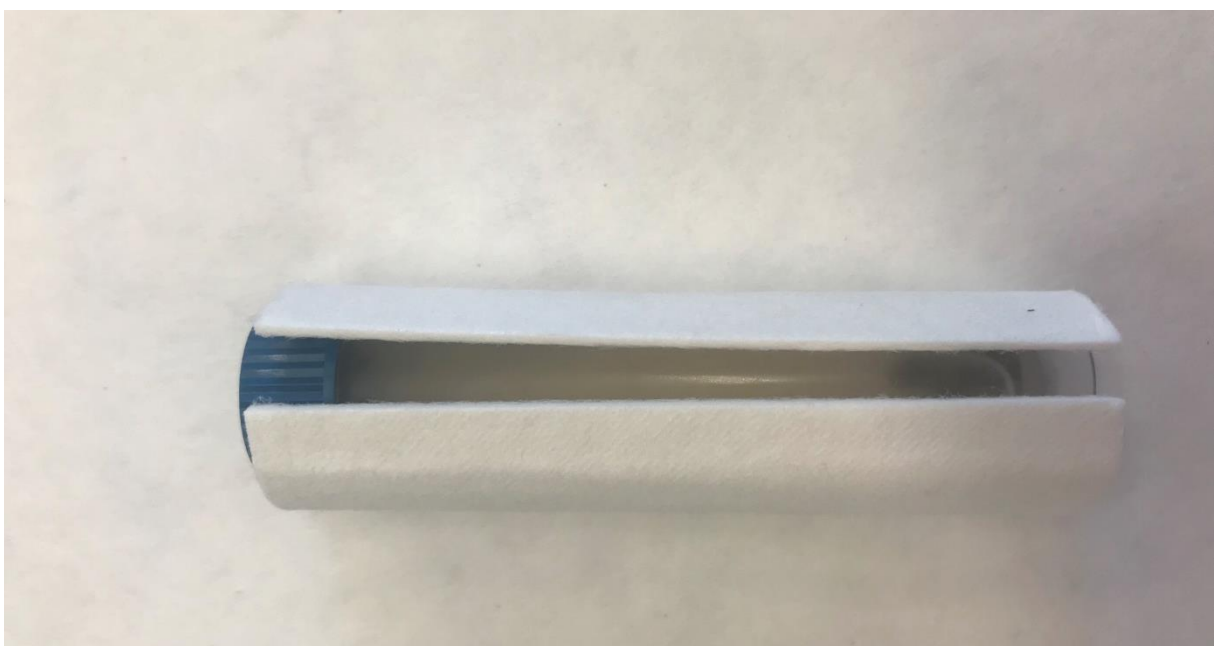


Рис. 3. Прокладка



Рис. 4. Вториннепакування з видимою прокладкою

Будь-яке пакування для біологічних речовин має містити три компоненти:

- первинну тару: тубик, флакон або іншу ємність, зазвичай виготовлену зі скла або жорсткого пластику (разом з пробкою, ковпачком або іншими елементами для закупорювання), які безпосередньо контактують із зразком (рис. 2 та 3);
- вториннепакування (разом з прокладкою та іншими матеріалами), яке повністю закупорює первинну тару (рис. 3 та 4);
- зовнішнєпакування для доставки або переміщення.

2. Інцизійна біопсія

Інцизійну біопсію проводять тоді, коли менш інвазивні методи не дають діагнозу. Клиновидна та пункційна біопсії – приклади розрізних (інцизійних) методів біопсії.

Це особливо корисно для діагностування м'яких, крихких, запалених та / або некротичних пухлин. Межу між нормальною здоровою тканиною і аномальною тканиною також може бути досліджено, що дозволяє патологоанатомові визначити ступінь інвазії.

а. Відбір проб

Відбирають проби під загальним наркозом. Інцизійна біопсія відрізняється розмірами (наприклад, 2–10 мм). Матеріал, об'єм якого менше 3 мм, може бути занадто малим для гістопатологічної оцінки, і його слід уникати. Зазвичай збирають біопсію від 4 до 8 мм. Після того як він буде зібраний і правильно підготовлений, гістопатолог оцінює його.

b. Підготовка та фіксація

Фіксатори такі самі, як і заексцизійної біопсії. Невеликі зразки можна помістити безпосередньо в гістологічну касету.

Дуже невеликі зразки (<3 мм) можуть загубитися під час доставки або обробки, через сушку зразка під час фіксації та обробки. Цей вид зразків можна розмістити на папері перед фіксацією. Надзвичайно малі зразки можна фарбувати еозином або наявними у продажу чорнилом (тобто туш).

c. Транспортування

Транспортування таке саме, як і заексцизійної біопсії.

3. Цитологія

Цитологія – це швидка, економічно ефективна, малоінвазивна процедура, яка корисна для розмежування не неопластичних від неопластичних захворювань і, у багатьох ситуаціях, для отримання остаточного діагнозу. Він має відносно низький ризик ускладнень.

Цитологію зазвичай використовують для шкірних і підшкірних мас, рідин (виверження синовіальної рідини, спинномозкової рідини, бронхоальвеолярної рідини, сеча та рідина з передміхурової залози), але внутрішні органи також можуть бути досліджені шляхом відбору проб за допомогою ультрасонографії або комп'ютерної томографії.

Методика цитологічної біопсії потребує мінімальної кількості проб тканини, але відсутність організованої тканинної архітектури перешкоджає градації пухлини. Деякі типи пухлин, особливо пухлини мезенхіми (тобто саркоми), як правило, не ексfolіюють клітини, що призводить до низькоклітинних зразків та хибнонегативних результатів. Інтерпретуйте негативні аспірати або аспірати із сумнівними результатами з обережністю, а за потреби використовуйте більш агресивні методи біопсії.

a. Відбір зразків

Аспіраційна цитологія

Тонкоголчата аспірація (ТГА) – найпоширеніша методика біопсії, яку застосовують для шкірних мас, лімфатичних вузлів та внутрішніх органів. Для відбору проби можуть використовувати різні методи. Після відбору проби слід зробити мазок.

- **Голчатий метод.** Його зазвичай використовують для делікатних, м'яких мас та лімфатичних вузлів. Під час цієї методики зразок збирають без шприца, лише голкою (розмір 20–23 г; 0,9–0,6 мм). Голку переміщують туди-сюди і спрямовують у різні зони всередині пухлини. Цей метод призводить до накопичення зразка в канюлі голки (рис. 5).



Рис. 5. Голчатий метод



Рис. 6. Метод тривалого всмоктування

- **Метод тривалого всмоктування.** Рекомендується для більш твердих або погано ексfolіативних мас. Під час цієї методики пробу збирають зі шприца (2,5–5 мл) та голки (розмір 20–23 г; 0,9–0,6 мм). Голку переміщують вперед і назад і направляють в багатьох напрямках, поки відбувається процес всмоктування, виймаючи поршень. Всмоктування припиняють перед видаленням голки з пухлини (рис. 6).

Цитологія імпресійної імпресії

Цей метод застосовують за поверхневих виразкових уражень або інтраопераційної цитології під час операції. Цей зразок може не бути репрезентативним для всієї пухлини.

Перед процедурою поверхню ураження слід очистити. Скляне предметне скло має бути акуратно накладене на масу і швидко зняте. На одному склі можна зробити кілька відбитків. Якщо зібраний матеріал густий, слід додатково зробити мазок (рис. 7).

Слід зазначити, що цей метод ідеально підходить для поверхневої частини ураження або інтраопераційної цитології. Зразок не є репрезентативним для всього ураження.

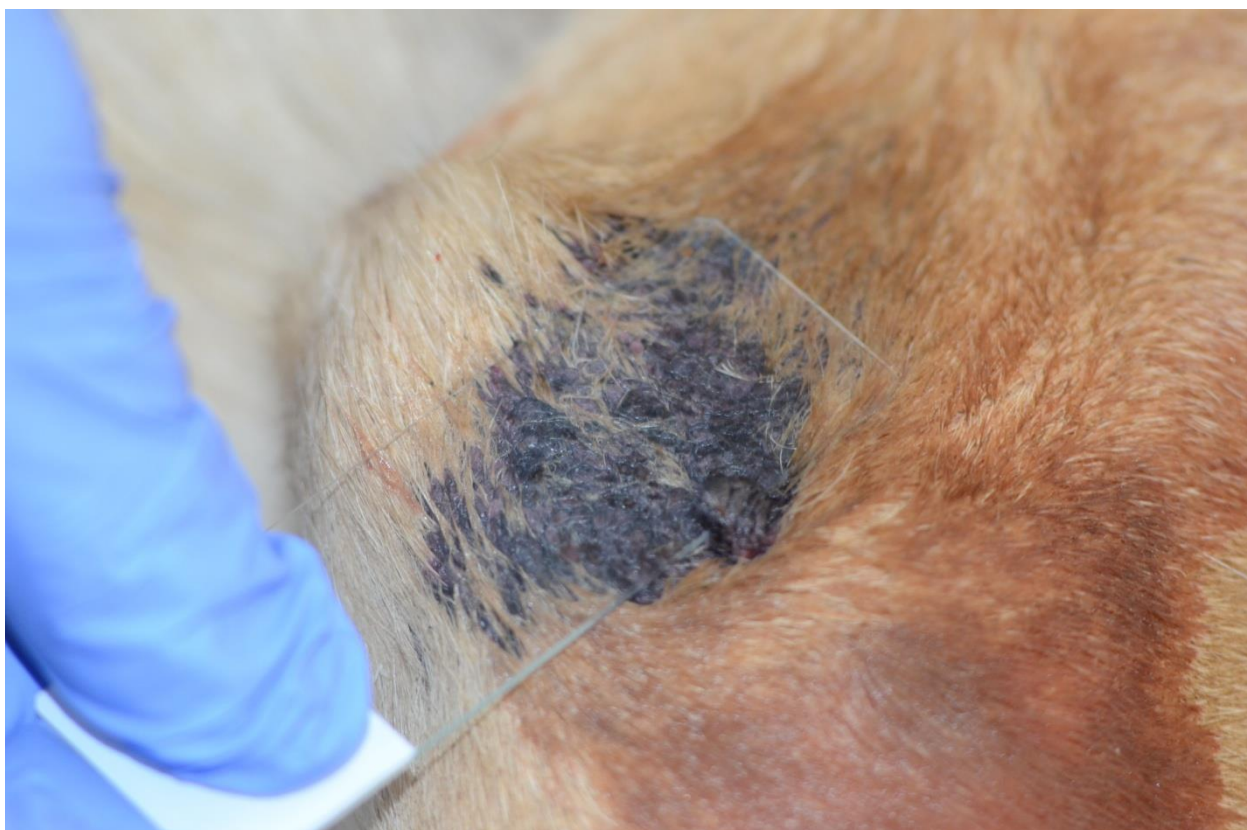


Рис. 7. Цитологія імпресійної імпресії

Цитологічний зішкріб

Цитологічний зішкріб можна розділити на два основні типи. Поверхнєве вискоблювання дає нам інформацію про епідерміс, глибоке вискоблювання – про дерму.

Ексфоліативна цитологія

Мікроскопічне дослідження клітин, що отримують з організму, наприклад рідина, сеча, спинномозкова рідина, цитологія вух або піхви.

в. Підготовка та фіксація

Мазок має бути тонким, товстий мазок часто не є репрезентативним. Існує два основні методи підготовки мазка:

1) **Техніка мазка крові.** Невелику краплю слід помістити близько до краю скла. Краплю слід торкнутися іншим склом. Друге скло слід просунути по поверхні першого скла (рис. 8).

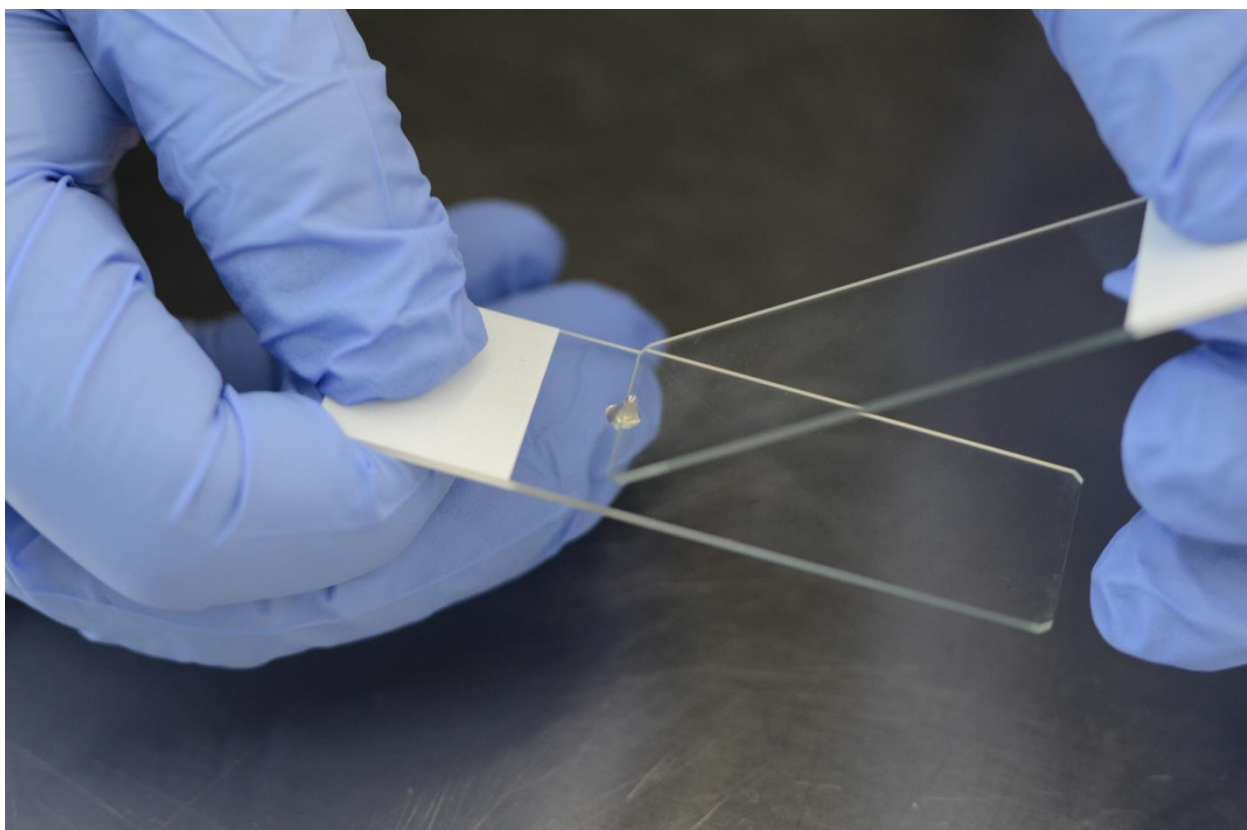


Рис. 8. Техніка мазка крові

2) **Давлений препарат.** Зібраний матеріал слід розмістити на першому склі. Друге скло слід притиснути до першого, а потім – підняти друге скло (рис. 9).

Зразок слід висушити на повітрі і зафіксувати. Фіксація може бути спиртом або фіксаційним спреєм.

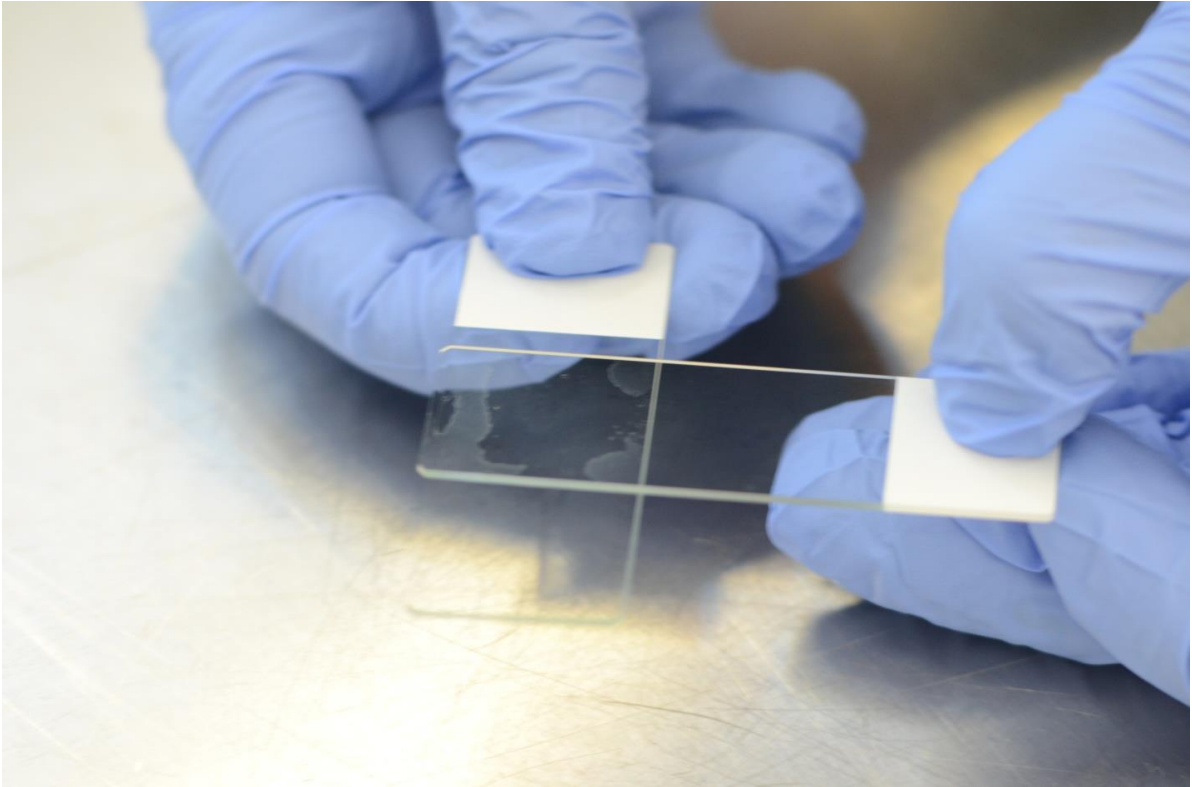


Рис. 9. Давлений препарат

Методів фарбування досить багато. Одним з найпопулярніших є варіант фарбування Diff-Quick® Romanowsky (фарбування за Романовським), який зазвичай використовують у цитологічному фарбуванні для швидкого фарбування та диференціювання різноманітних мазків.

с. Транспортування

Якщо необхідне транспортування, слід використовувати відповідний контейнер (транспортний комплект) (рис. 10).



Рис. 10. Цитологічний набір для біопсії

3.3.Агрономія

3.3.1.Ґрунт/Н. Кандиба, І. Коваленко/

Підготовка ґрунту до аналізу

Для визначення хімічного складу ґрунту і його фізичних властивостей беруть у полі зразки з місць, однорідних за характером рельєфу, рослинністю та агротехнічним станом.

Зразки ґрунту беруть буром Некрасова, Качинського чи іншими або безпосередньо з ям. На ділянці, яка має рівнинний рельєф, зразки відбирають уздовж діагоналі, на невіривняній – теж по діагоналі, але з кожного елемента рельєфу. Зразки беруть з відповідних глибин і з декількох точок, змішують і з кожного змішаного зразка беруть середню пробу масою 1 кг, переносять у мішечок з етикеткою, на якій зазначають графітним олівцем № поля, ями, глибину взяття зразка, назву господарства і підпис особи, яка брала зразок.

Якщо досліджують великі масиви земель, то зразки беруть з генетичних горизонтів – окремо з усіх виявлених генетичних типів ґрунтів на певній території.

Відбір зразків ґрунту з розрізу (на прикладі дерново-підзолистого ґрунту)

На передній стінці розрізу за допомогою мірної стрічки або дерев'яного метра розділяють профіль на генетичні горизонти, в польовому щоденнику або журналі позначають їхні індекси (НЕ, Е, І, Р) і глибину залягання. Потім зачищають стінку (згори донизу) і широким ножем позначають місця, де відбиратимуть зразки. Зразки відбирають знизу вгору, починаючи з нижнього горизонту і закінчуючи верхнім (орним шаром). Зразки виймають у вигляді монолітів

зі середини генетичного горизонту завдовжки 10, завширшки 8–10 і завтовшки 6–8 см. В орному шарі беруть два зразки – з глибини 0–10 і 10–20 см, а в підорному – один (з його середини). В ілювіальному (І) горизонті залежно від його величини беруть два або три зразки: в нижній, середній і верхній частинах. Кожний зразок вміщують у пронумерований мішечок, куди кладуть етикетку, на якій записують адресу, назву поля чи досліджу, номер розрізу, горизонт, глибину відбирання зразка, дату і прізвище виконавця. У лабораторії ґрунт подрібнюють, висушують до повітряно-сухого стану, відбирають рослинні рештки і просівають крізь сито з отворами до 1 мм.

Підготовка зразків ґрунту до лабораторного аналізу

Відібрані зразки ґрунту вміщують у паперові пакети чи полотняні мішечки і додають етикетки. На етикетці зазначають місце і глибину взяття зразка, номер зразка чи ділянки досліджу, а в кінці ставлять дату і підпис. Всі записи роблять простим (не хімічним) олівцем. Кожен зразок повинен мати дві етикетки – одну всередині, другу ззовні.

Зразки з непорушеною будовою рекомендують відбирати в циліндри або алюмінієві стакани за порядком номерів циліндрів, зазначаючи одночасно в польовому журналі номер циліндра, місце, глибину і дату взяття зразків. Після цього зразки вкладають у спеціальні ящики і без сильних поштовхів чи ударів перевозять до лабораторії.

У лабораторії зразки ґрунту висушують на повітрі в сухому провітрюваному і захищеному від доступу парів кислот, аміаку та інших газів приміщенні до повітряно-сухого стану. Для висушування ґрунт розсипають шаром 2–3 см на аркушах щільного паперу, обережно роздавлюючи великі грудки. Висушені зразки вміщують у картонні коробочки і зберігають до проведення досліджень.

Більшість аналізів ґрунту проводять у повітряно-сухих зразках. З висушеного зразка ґрунту беруть середню пробу. Для цього його ретельно перемішують, розсипають на папері у вигляді квадрата або прямокутника й ділять по діагоналях на чотири рівні частини. Дві протилежні частини висипають у картонну коробку, а дві інші змішують. Операцію повторюють доки маса середньої проби не становитиме 300–400 грамів, ґрунт, що не увійшов до середньої проби, не розтирають.

Для визначення гумусу і загального азоту середню пробу готують таким чином. Ґрунт розсипають рівним шаром на папері у вигляді прямокутника, який далі ділять вертикальними і горизонтальними лініями на невеликі квадрати розміром 3x3 або 4x4 см і з кожного квадрата беруть шпателем невелику кількість ґрунту, яку зсипають в одну пробу з таким розрахунком, щоб маса її була близько 5–10 г. З відібраної таким способом проби ретельно відбирають корінці (за допомогою пінцета і лупи). Далі ґрунт розтирають в агатовій ступці і просівають крізь сито з отворами діаметром 0,25 мм. Одержану пробу зберігають у паперовому пакеті.

Подібно відбирають середню пробу для визначення гранулометричного складу ґрунту, маса її становить 30–40 г. Цю частину ґрунту потрібно невеликими порціями розтерти у фарфоровій ступці товкачиком з гумовим наконечником, просіяти крізь сито з отворами діаметром 1 мм і зберігати у паперовому пакеті. Решту зразка ґрунту (250–350 г) підготувати таким самим способом і зберігати у склянці з притертою пробкою. З цієї частини зразка беруть наважки для інших лабораторних аналізів.

Відбір зразків для визначення властивостей ґрунту в лабораторних умовах

Відбір зразків для визначення питомої маси ґрунту

Для визначення питомої маси користуються пікнометром або мірною колбочкою місткістю 100 см³. Принцип методу полягає у визначенні об'єму наважки ґрунту за об'ємом витісненої води. Відбирають сухий ґрунт. Кількість сухого ґрунту в наважці для проведення аналізу в лабораторних умовах має становити 10 г. Кількість абсолютно сухого ґрунту в 10 г повітряно-сухого можна

визначити за допомогою гігроскопічної вологості, обчисленої у відсотках до повітряно-сухого ґрунту.

Відбір зразків для визначення об'ємної маси

Об'ємна маса ґрунту – це маса в грамах /1 см³ ґрунту з непорушеною будовою, тобто маса 1 см³ ґрунту разом з його порами. Об'ємна маса залежить від мінералогічного, гранулометричного та структурного складу ґрунту і кількості в ньому органічної речовини. Об'ємна маса завжди менша від питомої маси і коливається в межах 1–1,8.

Використовують два способи відбору зразків ґрунту:

Спосіб 1. Циліндричний метод: У ґрунт з непорушеною структурою врізати (вбити його обережними ударами) металевий циліндр діаметром 10 см і об'ємом 1 дм³. Відкопати ґрунт навколо циліндра, обережно підрізати його знизу і вийняти циліндр. Обережно обрізати ґрунт, що виступає з циліндра, рівно з його краями. Під час виконання вище описаних операцій треба слідкувати, щоб будову ґрунту не було порушено і ґрунт не висипався з циліндра. Від цього залежить правильність одержаних результатів. Якщо ґрунт частково висипався з циліндра, то треба взяти нову пробу. Циліндр треба закрити кришкою так, щоб ґрунт не висипався з нього. Після цього циліндр з ґрунтом треба зважити. Зважити порожній циліндр разом з кришкою. А з ґрунту, що досліджують, взяти зразок для визначення вологості. Знаючи вагу порожнього циліндра і вагу його з ґрунтом, розраховують вагу взятого об'єму ґрунту.

Спосіб 2. Метод парафінування: З ґрунту непорушеної структури вирізають у вигляді кулі чи іншої форми розміром 5x5 см і зважують на технічних чи електронних вагах. Готують розплавлений парафін зат_о на 2–3° вище точки плавлення. Шматок ґрунту то одним, то іншим боком занурюють у парафін з метою створення парафінової плівки на поверхні ґрунту. Після утворення 5–10 шарів парафіну, ґрунт із парафіною плівкою охолоджують і зважують. За різницею між вагою ґрунту з парафіном (n) та вагою ґрунту до парафінування (m) визначають вагу парафіну (n-m). Для знаходження об'єму, зайнятого парафіном (W_n), треба вагу парафіну розділити на питому вагу (P), що дорівнює 0,89.

Відбір зразків для визначення вмісту вологи в ґрунті

Визначення польової і гігроскопічної вологи

Польова вологість характеризує кількість води в ґрунті під час взяття проб. Визначаючи її, дізнаємося про загальний запас вологи в ґрунті і про динаміку її в період вегетації рослин.

Гігроскопічна вологість для рослин недоступна і є мертвим запасом водив ґрунті. Кількість гігроскопічної вологи в кожному ґрунті залежить від вмісту гумусу, гранулометричного складу і наявності гігроскопічних солей.

Що більше гумусу і мінеральних колоїдів у ґрунті, ти більше в ньому і гігроскопічної вологи.

Для визначення польової вологості взяти в бюкси 10–20 г ґрунту і 3–5 г повітряно-сухого ґрунту (для визначення гігроскопічної), закрити їх кришками і згідно з методикою проведення аналізу визначити вологу.

Відбір зразків для визначення вологості ґрунту

Для визначення повної та капілярної вологостей ґрунту треба брати зразки ґрунту з непорушеною будовою. Але в лабораторії іноді визначають вологості ґрунту в зразках, які мають порушену будову, тобто розтерті та просіяні крізь сито з отворами 1 мм.

Відбір зразків для визначення капілярної вологості ґрунту

В сітку вкладають кружок фільтрувального паперу, змочують його дистильованою водою, надівають сітку на циліндр і зважують на технічних терезах з точністю до 0,01 г. Надалі, зняти сітку, циліндр вставити в буровий патрон і взяти пробу ґрунту на заданій глибині буром Некрасова або Качинського. Після взяття проби вийняти циліндр з бурового патрона, закрити кришками і перенести до лабораторії.

Відбір зразків для визначення повної вологості ґрунту

Відбір проб ґрунту проводять таким самим способом, як і для відбору зразків для визначення капілярної вологості ґрунту.

Відбір проб ґрунту для біологічної індикації після дії гербіцидів

На досліджуваному полі відбирають зразки шляхом випадкової вибірки, яка прийнята для звичайних ґрунтово-агрохімічних обстежень. Краї полів, підвищення, місця можливих зупинок обприскувача та інші місця, де можуть накопичуватися гербіциди, слід відбирати для аналізу окремо.

Зразки ґрунту для проведення біологічної індикації відбирають методом «конверта». За звичайного обробітку ґрунту зразки відбирають пошарово: 0–10, 10–20, 20–30 см. За використання нульової технології зразок беруть шаром 10–15 см.

Загальний зразок (для пошарового відбирання кожен шар окремо) має бути не менше ніж 5 дм³ (=5 л). Контрольний зразок ґрунту (5 дм³) відбирають на необроблюваних ділянках.

Відбір проб та підготовка ґрунту для гранулометричного аналізу

Пробу ґрунту з досліджуваної ділянки масою від 0,5 до 2,5 кг висушують до повітряно-сухого стану і розсипають на листку паперу у вигляді квадрата. Потім ґрунтовий зразок за допомогою скляної палички розділяють уздовж діагоналі на чотири частини. Одну частину повністю видаляють, зважують і пропускають через сита з отворами 10, 7, 5, 3, 2, 1 мм. Просівання усіх частин відібраної проби ґрунту приблизною вагою у 100 г виконують поступово, малими порціями, окремо через кожне сито. Залишки агрегатних частинок кожної фракції на ситі

переносять у попередньо зважену фарфорову чашку (або на відтарирований лист паперу) та зважують на технічних терезах. За результатом отриманих даних розраховують відсотковий вміст кожної фракції відносно маси взятої проби ґрунту.

Підготовка ґрунту до гранулометричного аналізу (за Н.А. Качинським)

Основна підготовка ґрунту до аналізу полягає у попередньому руйнуванні ґрунтових агрегатів. Для цього його розтирають у фарфоровій ступці товкачиком з гумовим наконечником і просівають крізь сито з діаметром отворів 1 мм. Скелетну частину, яка залишилася після просіювання на ситі, відмивають від глинистих часток, висушують, зважують і розраховують у відсотках від загальної маси сухого ґрунту. Далі приступають до хімічної підготовки згідно з методикою Н.А. Качинського. Вона залежить від наявності в ґрунті карбонатів кальцію та магнію.

Підготовка безкарбонатного ґрунту

Наважку ґрунту 10 або 20 г висипають у фарфорову чашку (що легший гранулометричний склад ґрунту, то більшу наважку треба брати) і порціями доливають туди з мірної колби на 200 мл 0,05 н соляну кислоту, помішуючи скляною паличкою з гумовим наконечником, даючи можливість ґрунту осісти на дно; після цього суспензію фільтрують крізь простий змочений дистильованою водою фільтр середньої щільності в колбу, відкалібровану до об'єму 300 мл. Останню порцію кислоти разом з ґрунтом переносять на фільтр і промивають дистильованою водою до риски 300 мл, не допускаючи появи каламуті. Якщо в колбі з'явилася каламуть, яка свідчить про проходження колоїдів крізь фільтр, промивання припиняють. Промивних вод разом з фільтратом має бути рівно 300 мл. Фільтрат ретельно перемішують і використовують для визначення втрат від обробки ґрунту соляною кислотою і суми ввібраних основ. Величина втрат від обробки соляною кислотою має самостійне значення. Вона характеризує наявність у ґрунті легкорозчинних солей і карбонатів.

Піпеткою відбирають 50 мл фільтрату і переносять його у заздалегідь зважену фарфорову чашку, ставлять на водяну баню, випаровують, висушують у сушильній шафі 2 години, охолоджують в ексікаторі і зважують на аналітичних терезах. Розрахунки проводять за формулою.

Підготовка карбонатного ґрунту

Наважку 10 г ґрунту обробляють у фарфоровій чашці 0,2 н HCl, доливаючи щоразу приблизно 50 мл кислоти. Оброблений першою порцією кислоти ґрунт розмішують скляною паличкою 5-6 разів протягом години. Після цього рідину по паличці зливають на фільтр середньої щільності в мірну колбу об'ємом 500 мл і стежать, щоб весь ґрунт залишився в чашці. До нього додають нову порцію кислоти. Розчинення карбонатів повторюють до припинення утворення бульбашок CO₂. Після доливання останньої порції кислоти чашку з ґрунтом

залишають на ніч для остаточного розчинення карбонатів, а потім промивають його 0,05 н HCl до відсутності реакції на кальцій.

Проба на кальцій. Набирають з-під лійки близько 3 мл фільтрату і нейтралізують його 10 %-м розчином аміаку, додаючи останній до виразного запаху, підкислюють кількома краплями 10 %-ної оцтової кислоти, додають у пробірку 2 мл насиченого розчину щавлевокислого амонію і нагрівають до кип'ятіння. Якщо у фільтраті є кальцій, то випадає осад CaC_2O_4 .

За наявності кальцію ґрунт продовжують обробляти соляною кислотою. Якщо кальцій відсутній, дають повністю стекти соляній кислоті з фільтра. У фільтраті визначають кількість розчинених у кислоті речовин. Для цього вимірюють його об'єм, або доводять до 500 чи 1000 мл, добре перемішують. Відбирають піпеткою 25 мл і випарюють у заздалегідь зваженій чашці.

Ґрунт з фільтра змивають водою в конічну колбу місткістю 500 мл, додають поступово 0,1 н NaOH до слаболужної реакції. Суспензію кип'ятять як і під час підготовки безкарбонатного ґрунту.

Підготовка ґрунту до гранулометричного аналізу методом розтирання з розчином пірофосфату натрію

З повітряно-сухого зразка ґрунту, просіяного крізь сито з отворами 1 мм, беруть наважку 10 г, зважену з точністю до 0,01 г і поміщають у фарфорову чашку діаметром 10–12 см. Наливають у маленький стаканчик певний об'єм 4 %-го розчину пірофосфату натрію. Для незасолених і незагіпсованих ґрунтів легкого гранулометричного складу беруть мл для важкосуглинкових, глинистих і карбонатних – 10 мл, а для засолених та загіпсованих ґрунтів – 20 мл.

Наважку ґрунту змочують краплями розчину пірофосфату натрію до тістоподібного стану і обережно, без натискання розтирають 10 хвилин товкачиком з гумовим наконечником. Після розтирання виливають в чашку залишок розчину пірофосфату, додають дистильовану воду і, розмішуючи тим самим товкачиком із гумовим наконечником. Після розтирання виливають в чашку залишок розчину пірофосфату, додають дистильовану воду і, розмішуючи тим самим товкачиком, доводять суміш до стану суспензії. Реакція насичення вбирного комплексу ґрунту натрієм відбувається за рівнянням.

3.3.2. Насіння

3.3.2.1. Відбір зразків насіння та рослинного матеріалу для аналізу

/Н. Кандиба, І. Коваленко/

Партією насіння називають певну кількість однорідного насіння однієї культури, сорту, репродукції, сортової чистоти, фізичних якостей, року врожаю та одного походження, занумерованих та засвідчених відповідними документами. Розмір партії залежить від крупності насіння (від 250 ц (зернові) до 2 ц (тютюн)).

Для аналізу фізичних та посівних якостей насіння будь-якої насінневої партії необхідно взяти з неї середній зразок – це відносно невеликий за кількістю насіння зразок, який має характеризувати всі особливості великої насінневої партії.

Точність під час узяття середнього зразка може бути досягнута тільки тоді, коли його беруть не з одного місця, а складають з великої кількості дрібних проб – виїмок, узятих з різних місць насінної партії. Цим пояснюється складність методики взяття середнього зразка і виділення навішувань.

На точність відбору середнього зразка впливає таке: взяття зразка від занадто великої кількості насіння, недостатній розмір середнього зразка і порушення правил його відбору (невелика кількість місць, з яких узяті виїмки).

Середні зразки для визначення якості насіння відбирають від підготовлених партій насіння, тобто очищених, відсортованих, просушених (у разі підвищеної вологості), зважених, пронумерованих і таких, що мають етикетки встановленої форми.

Складання початкового зразка розпочинають з узяття виїмок.

Перед узяттям виїмок насінневу партію ретельно оглядають, звертаючи увагу на колір насіння, їх блиск, запах, засміченість, вологість і однорідність, перевіряють усі документи на це насіння.

Якщо партія насіння має вагу більше встановленої для цієї культури контрольної одиниці, то її спочатку розбивають на частини (контрольні одиниці), а потім встановлюють кількість виїмок від кожної з них для складання початкового зразка.

Одночасно з попереднім оглядом насіння перевіряють умови їх зберігання (порядок складування, відхід за ними, стан сховища). Усі виявлені як результат огляду особливості записують в акт відбору зразків. Після цього приступають до відбору виїмок. Основне завдання під час узяття виїмок зводиться до того, щоб правильно позначити місця їх відбору. Необхідно дотримуватися такого порядку: брати виїмки з трьох шарів – верхнього, середнього і нижнього.

Після оглядання кожної проби окремо на однорідність насіння їх з'єднують разом і отримують вихідний зразок. У випадку різкої відмінності між пробами таку партію залежно від кількості насіння розділяють на дві більше контрольні одиниці і від кожної з них складають вихідний зразок.

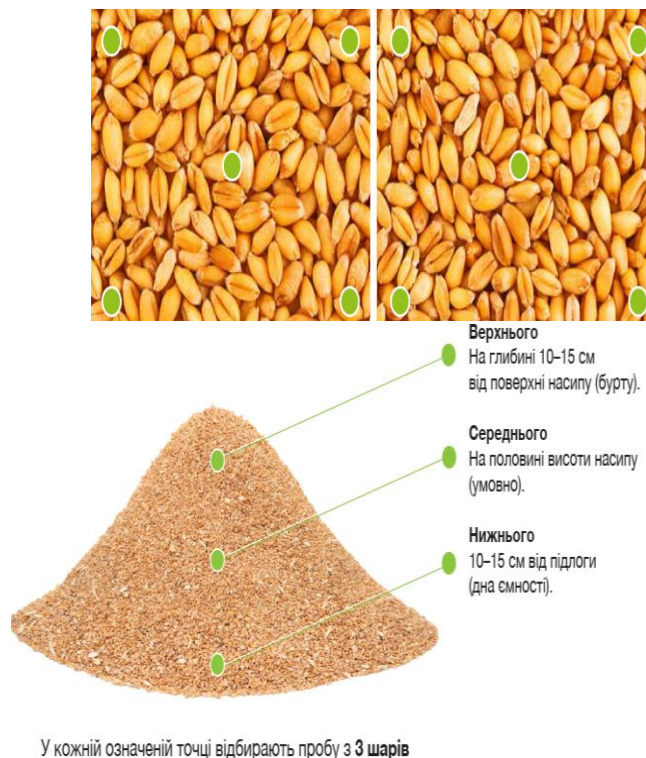
Із отриманого вихідного зразка способом хрестоподібного поділу відбирають два середніх зразка: один для визначення вологості і пошкодження амбарними шкідниками (його містять у скляний посуд, який щільно закривають і заливають сургучем, воском чи парафіном), другий – для визначення фізичних та посівних якостей насіння.

Відбір точкових проб із насипу

Від кожного відсіку чи бурта відбирають точкові проби у вигляді конверта у п'яти місцях за величини партії до 20 т або 20 м² поверхні. У випадку коли

поверхня насіння за площею та масою більша за попередньо встановлену, її умовно поділяють на секції, приблизно по 20 м² кожна, й відбирають від кожної у п'яти місцях.

Більше, ніж 20 м²



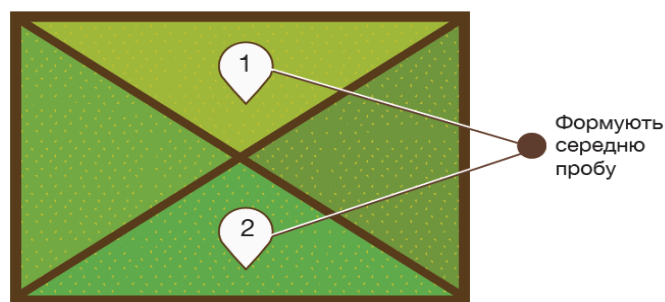
Відбір точкових проб із мішків

Маса середньої проби має становити до 2 кг.

Кількість мішків / контейнерів, шт	Кількість проб, шт
До 5	Від кожної місткості, але не менше 5
Від 6 до 30	Від 5 місткостей або одна від кожної третьої, але не менше 5
Від 30 до 400	Від 10 місткостей або одна від кожної п'ятої, але не менше 10
Понад 400	Від 80 місткостей або одна від кожної сьомої, але не менше 80

Формування середньої проби

Насіння висипають на роздільну дошку і рівномірно розгортають у вигляді квадрата. За допомогою дерев'яних пластинок (лінійки) розділяють на чотири частини. Дві протилежні частини об'єднують та вказують зазначену інформацію на брендovanому пакеті, дві інші відкидають (зберігають у господарстві). Виділення середньої проби також можливе за використання зернового дільника (ДП-5, ДП-10 або інших модифікацій).



Відбір зразків рослинного матеріалу

Для відбору зразків рослинного матеріалу слід ретельно оглянути поле з метою визначити наявність відхилень від нормально розвинутих рослин.

З одного поля в десяти різних місцях слід відібрати рослини (кількість точкових проб може змінюватися залежно від розмірів поля та наявних відхилень) – всього від 20 до 100 шт. залежно від культури і від фази розвитку:

Рослина	Стадія розвитку	Частина рослини	Кількість рослин для аналізу
1	2	3	4
Кукурудза	У фазі проростання (менше 30 см)	Все, що над ґрунтом	20–30
	До викидання волоті	Верхній, повністю розвинений лист	15–25
	Від стадії викидання волоті до стадії, коли пестичні стовпчики стають коричневими	Весь лист біля качана	15–25
	Відбір, після того, як кукурудзяні рильця стають коричневими – не рекомендується		
Соя та інші бобові	Фаза проростання (менше 30 см)	Все, що над ґрунтом	20–30
	Початкова стадія цвітіння	2 або 3 повністю розвинених листки зверху рослини	20–30
	Відбір після початку заповнення стручків – не рекомендується		
Пшениця, жито, овес, ячмінь	Фаза проростання (менше 30 см)	Все, що над ґрунтом	50–100
	Вихід в трубку	Самі верхні зрілі листки або флаговий листок	20–30
	Відбір після виходу в трубку – не рекомендується		

1	2	3	4
Соняшник	Фаза проростання	Все, що над ґрунтом	15–20
	Вегетативні стадії до стадії повного цвітіння	Самі молоді та повністю дозрілі листя	25–30
Картопля Аналіз на нітратний азот	Фаза проростання	Все, що над ґрунтом	20–25
	Вегетативні стадії до стадії повного цвітіння	Самі молоді та повністю дозрілі листя	25–30
	Поява бульб	Черешок	25–30

Щоб забезпечити рослинам оптимальні умови під час транспортування, необхідно у прикореневому шарі лишити не менше ніж 100 г ґрунту. Якщо рослини великі за розміром – слід відокремити уражені й не уражені органи (корені, стебла, листя, квітки і плоди). Відібраний матеріал необхідно упакувати в пакети / коробки, що захистять рослини під час транспортування.

Відбір рослинного матеріалу для встановлення типовості

Встановлення типовості рослинного матеріалу соняшнику і кукурудзи проводять протягом фаз (фаза сходів – фізіологічна стиглість).

Відбір зразків рекомендовано проводити в гумових рукавичках, які треба протирати етиловим спиртом перед кожним відбором. Спиртом обробляють також інструменти в разі їх застосування під час відбору (ножиці, ніж).

Уздовж діагоналі поля з різних рослин відбирати 60 листків або інші частини рослин. Кожну частину рослини слід окремо покласти в чистий поліетиленовий пакет. Рослинний матеріал кожного досліджуваного зразка (60 частин рослин) слід покласти в брендований пакет і повністю заповнити етикетку.

Фізико-механічні властивості насіння і відбір зразків для їх визначення

Відбір зразків для визначення маси 1000 насінин у сільськогосподарських культур

Показник маси 1000 насінин характеризує їх ваговитість, тобто зв'язаний з крупністю та щільністю їх внутрішньої структури, і отже, визначає запас накопичених у насінні поживних речовин. Важке насіння, як правило, більш повноцінне воно забезпечує більшу повноту сходів і кращий ріст рослин. Показник маси 1000 насінин потрібний для визначення вагової норми висіву.

Визначення маси 1000 насінин за кондиційною вологістю проводять паралельно з аналізом на їх чистоту. Із фракції чистого насіння відрахувати без відбору дві проби по 500 насінин зважують з точністю до 0,01 г і якщо розбіжності між результатами зважень не більше 3 %, обчислюють масу 1000 насінин як середнє арифметичне з двох проб. Якщо розбіжності між результатами зважувальних більше 3 %, то проводять третє визначення, а масу 1000 насінин встановлюють за двома пробами, які мають найменші розбіжності. Іноді визначають і абсолютну масу насіння, під якою розуміють масу 1000 насінин у абсолютно сухому стані. Цей показник розраховують за формулою.

Відбір зразків для визначення натури зерна

Натура зерна – це маса певного об'єму зерна, частіше 1 л, вираженого у грамах. Вона залежить від форми та розмірів насіння: видовжене зерночастіше має меншу натуру, ніж коротке. Із збільшенням вологості його натура знижується. Добре виповнене насіння характеризується високою натурою; щупле, погано виповнене насіння має низьку натуру. Визначення натури проводять на особливих терезах – пурка. Маса зерна у літровій пурці виражає його натуру (табл. 1).

Таблиця 1

Натура зерна (г на 1л) деяких зернових культур

Культура	Висока	Середня	Низька
Пшениця	>785	725-785	<725
Жито	>730	685-730	<685
Ячмінь	>605	545-605	<545
Овес	>480	420-480	<420

Відбір зразків для визначення чистоти насіння

Для визначення чистоти насіння виділяють із середнього зразка засобом вийомок або з допомогою поділу дві наважки масою: кукурудзи, гороху, фасолі та інших крупнонасіньових культур – 200 г пшениці, рису, ячменю, вівса, гречки – 50 г, проса – 20 г, льону – 10 г, конюшини, люцерни – 5 г. Кожну наважку, просіяну через решето з відповідними отворами для виділення дрібного та крупного насіння, містять на розбірну дошку чи паперовий аркуш і шпателем старанно розбирають, виділяючи дві основні фракції:

- а) насіння основної культури;
- б) відхід.

До насіння основної культури відносять: добре розвинуте насіння, незалежно від їх забарвлення, недостатньо виповнені, виключно щуплі; беззародка чи з частковим його пошкодженням; з відбитим на 1/3 чи менше ендоспермом чи сім'ядолями; голі чи з тріснутою оболонкою; наклюнуті, у яких кінець пробив оболонку, але ще не видвинувся з насіння.

До отходу відносять: дрібне, щупле, проросле, гниле і пошкоджене шкідниками насіння основної культури, якщо втрачено більше 1/3 насіння; насіння бур'янів, насіння інших культурних рослин, мертво сміття.

Відбір проб для визначення схожості насіння та енергії проростання

Схожість насіння означає кількість насіння у зразку, яке нормально проросло, виражене у відсотках від загальної кількості насіння у зразку. Енергія проростання насіння характеризує одночасність появи нормальних сходжень протягом часу, встановленого для кожної культури. Чо більше енергія проростання насіння, то швидше і одночасно з'являються паростки після посіву.

Під час відбору проб для пророщування використовуйте насіння основної культури, отримані шляхом визначення їх чистоти, для яких підраховують чотири послідовні проби по 100 насінин в кожній. У крупнонасінневих посівах кількість насіння у зразку зменшується до 50. Насіння пророщують у чашках Петрі, поміщених у термостати за певної температури.

Для визначення якості відвантаження насіння його потрібно відбиратитаким чином, щоб відібрані зразки були репрезентативними для всієї кількості насіння. Випробування якості насіння проводять на частині репрезентативного зразка. Тому технічно обґрунтована методологія відбору проб є дуже важливою, щоб результати випробувань насіння були достовірними. Відбір проб насіння та тестування є частиною процесу закупівлі насіння, але його також можуть використовувати персонал, який відповідний за забезпечення безпеки та місцева влада для перевірки якості насіння перед доставкою фермерам або для перевірки якості насіння, якщо насіння зберігалось протягом декількох місяців.

Завданнями відбору проб є отримання зразка, відповідного за розміром для тестування, та отримання вибірки, яка є репрезентативною для партії, що випробовується. Весь відбір проб слід робити швидко з обмеженим впливом повітря в приміщенні, щоб мінімізувати зміни вологості насіння, якщо це потрібно перевірити. Робочі зразки являють собою підвибірки представленого зразка і частину насіння, на якому проводять дослідження. Фахівцям з насіння нагадують, що будь-яке переміщення і стабілізація насіння може легко призвести до появи пустого більш світлого насіння на поверхні, саме тому змішування необхідно проводити безпосередньо перед взяттям зразків для забезпечення точного представлення всього посівного матеріалу.

Первинні зразки – це невеликі порції насіння, взятих навмання з посівного матеріалу. Всі первинні зразки, взяті з однієї партії насіння, потім об'єднують і змішують, щоб утворити складений зразок. Складені зразки зводять до меншої підпроби, яку називають представленою вибіркою. Представлені зразки – це порції насіння, які передають в лабораторію для випробування. Робочі зразки є підзразками поданого зразка і є тією частиною насіння, на якій проводять тест.

Використовують такі інтенсивності вибірки:

Тара	Зразки
1-4 контейнери	3 первинних зразки з кожного контейнера
5-8 контейнерів	2 первинних зразки з кожного контейнера
9-15 контейнерів	1 первинний зразок з кожного контейнера
16-30 контейнерів	15 первинних зразків з кожної партії взятих з випадкового контейнера таким чином, щоб було не більше, ніж по 1 зразку з контейнера
31-59 контейнерів	20 первинних зразків з кожної партії взятих з випадкового контейнера таким чином, щоб було не більше, ніж по 1 зразку з контейнера

Первинні зразки

Метод отримання первинних зразків має відповідати стандартам ISTA (2015). Для досягнення дешевого, але ефективного відбору проб Альберта рекомендує використовувати зонд / паличку для відбору проб або відбирати проби вручну. Первинні зразки, взяті вручну, слід брати із середини контейнера, якщо береться один зразок, а якщо зверху і знизу, то потрібно брати 2 проби, проба зверху, середини та знизу береться, якщо потрібно взяти 3 проби, щоб забезпечити репрезентативний складений зразок.

Складений зразок

Первинні проби поєднують та розмішують для того, щоб сформувати складений зразок. Для зменшення складеного зразка до необхідного розміру зразка має бути використано випадковий метод.

Представлений зразок потрібно транспортувати в непошкодженому, герметично закритому контейнері, в якому є якомога менше повітря. Пластикові пакети типу Ziploc не рекомендовано, вони прийнятні лише для дуже коротких термінів зберігання <1 год.

Скляні пробірки, скляні банки з гумовою кришкою або фольговані мішки зі запаяними швами рекомендують використовувати як контейнери, які найчастіше герметично закриваються за кімнатної температури, при цьому фольговані мішки зі запаяними швами є найбільш надійним і економічно ефективним варіантом.

Необхідно докласти всіх зусиль, щоб розпочати тести на схожість протягом 2 тижнів після отримання представленого зразка. Проміжне зберігання має бути в холодильнику. Тести на вологість необхідно починати протягом 24 годин після отримання представленого зразка; однак зразки мають бути доведені до кімнатної температури до відкриття контейнерів.

3.3.2.2. Відбір проб та визначення параметрів якості насіння/Н. Шабан/

У багатьох сільськогосподарських лабораторіях світу застосовують стандартні процедури оцінювання якості та сортування насіння, які переважно базуються на оцінюванні різних фізичних, морфологічних та фізіологічних властивостей насіння. На сьогоднішній день є гостра потреба у розробці більш точних, швидких та безпечних методів оцінювання якості насіння. Машинне бачення або комп'ютеризована система аналізу зображень вважається дуже зручним методом досліджень, пов'язаних з насінням, оскільки він не містить помилок людини, більш швидкий і забезпечує ретельний аналіз насіння та проростання саджанців. Зниження вартості і підвищення можливостей комп'ютерного обладнання для обробки зображень та його інтеграція з керованими системами стану навколишнього середовища є іншими перевагами, пов'язаними з цією методикою.

Додатковою перевагою цього методу є те, що зображення, показники життєздатності та інша інформація, що стосується конкретної партії / типу насіння, зберігаються і база даних може бути розроблена для подальшого використання. Оцінювання кожної окремої насінини у великій пробі насіння допомагає розробити безпечні та більш ефективні методи сортування насінневих підзразків з різними можливостями проростання. Дані, отримані за допомогою цієї методики, можуть додатково обробляти статистично та відображати графічно, і може бути створено базу даних для інтеграції даних аналізу зображень з таксономічними та біоморфологічними особливостями видів рослин. Цей підхід є дуже корисним для нинішніх та майбутніх досліджень якості насіння.

Визначення терміну «насіння»

Справжнє насіння визначають як запилений насінневий початок, який дещо виріс всередині материнської рослини. Ембріон розвинений із зиготи та насінневої оболонки з покривів зрілої яйцеклітини, яка має ембріональну рослину, зберігається матеріал та захисне зовнішнє покриття. Утворення насіння є частиною процесу розмноження, характерного для всіх фанерогамів (насінних рослин) сперматофітівта рослин голонасінних та покритонасінних.

Термін «насіння» також має загальне значення – все, що можна посіяти, наприклад «насіннева» картопля, «насіння» кукурудзи або соняшникове «насіння». Що стосується «насіння» соняшнику та кукурудзи, то те, що посіяно, – це насіння у шкаралупі або лушпинні, тоді як картопля – це бульба.

Багато структур, які зазвичай називають «насінням» – це насправді сухі плоди. Рослини, на яких родять ягоди, називають ягідними. Насіння соняшнику іноді продають, поки вони у шкаралупі, яку необхідно розколоти, щоб дістати насіння. Структуру насіння можна вивчити в таких поширених видах, як горох, нут, соняшник або мигдаль. Різні групи рослин мають інші модифікації, так звані кісточкові плоди (наприклад, персик) мають затверділий фруктовий шар (ендокарп), злитий із фактичним насінням та оточуючим його. Горіхи – це однонасінні плоди з твердою шкаралупою деяких рослин з нерозкритим насінням, наприклад, жолудь або фундук. Всі вони побудовані за одним планом, хоча можуть бути відмінності у формі чи розмірі насіння, відносній частці різних частин. Існують сотні варіацій розміру, форми, кольору та поверхні насіння. Насіння варіюється за розмірами від крихітних пилових частинок, як у деяких орхідей, до великих подвійних кокосів. Поверхня насіння може бути гладкою, зморшкуватою, смугастою, ребристою, борознистою, сітчастою, трубчастою, альвеолярною, волосистою або мати візерунки, як відбитки пальців.

У насінні життєва діяльність тимчасово припиняється для того, щоб рослина змогла успішно пройти через несприятливі та шкідливі кліматичні умови. З наближенням сприятливих умов насіння поновлює активне життя і переростає в повноцінну рослину. У вигляді насіння рослина може переноситися на великі відстані.

Біорізноманіття структури зрілого насіння покритонасінних рослин та значення насіннево-покривних шарів

Диплоїдний ембріон оточений двома покривними шарами: триплоїдним (у більшості видів) ендоспермом (живильна тканина; переважно живі клітини) та диплоїдною тестею (насінневий покрив; материнська тканина; переважно мертві клітини). У кількох видів ендосперм повністю знищується під час розвитку насіння, а поживні речовини переносяться на сім'ядолі. Зрілому насінню (а) гороху (*Pisum sativum*) (без ендосперму) та (b) *Arabidopsis thaliana* (одноклітинний шар ендосперму) характерні ембріони з зберігаючими сім'ядолями. Мікропілярний ендосперм (кілька клітинних шарів), як відомо, є обмеженням проростання насіння роду Пасльонових (c, d). FA2 та LA – насінні типи. Частина (c) модифікована від Watkins & Cantliffe (1983) та передрукована з дозволу Американського товариства рослинних біологів. Частина (a), (b) та (d) модифікуються на «Місце насінневої біології» (<http://www.seedbiology.de>).

Структура насіння

Якість насіння

Якість насіння є дуже важливим для здорових саджанців, достатньої витримки рослин у полі і в кінцевому рахунку для хорошого врожаю. Основними якостями насіння є генетична чистота, фізична чистота, схожість, сила та статус вільних від хвороб. У комерційному насінневому ланцюжку ця якість підтримується, дотримуючись стандартних процедур випробування насіння, за допомогою яких ми вимірюємо життєздатність та всі фізичні та фізіологічні чинники, що регулюють продуктивність насіння.

Тестування насіння головним чином проводять для оцінювання партії насіння, і це говорить нам про його потенціал появи насіння. Але ці процедури тестування мають свої обмеження, як і більшість із них трудомісткі, забирають багато часу, а іноді результати не відтворюються в реальних польових умовах. Слід зосередити увагу на застосуванні нових методик тестування насіння, а також приділити увагу на міжнародному рівні для розробки відповідних методів, таких як аналіз зображення насіння та інших рослинних органів, біохімічних та молекулярних маркерів.

Аналіз форми насіння

Морфологічна варіація в характері насіння містить відмінності у розмірі та формі насіння. Форма насіння є важливою ознакою в ідентифікації та класифікації рослин. Крім того, він має агрономічне значення, оскільки відображає генетичні та екологічні компоненти, впливає на врожайність, якість та ринкову ціну. Використання цифрових технологій разом із розробкою методів кількісного визначення та моделювання дозволяє краще описувати форму насіння. Системи обробки зображень використовують за

автоматичного визначення розміру та форми насіння, стаючи базовим інструментом під час вивчення різноманітності. Форма насіння визначається різноманітними показниками (округлість та J індекс). Порівняння насінневих зображень з геометричною фігурою (коло, кардіоїд, еліпс, еліпсоїд тощо) забезпечує точне кількісне визначення форми. Методи кількісного визначення форми на основі цих моделей корисні для точного опису, що дозволяє порівнювати насіння між генотипами або за фазами розвитку, а також встановлювати рівень варіацій у різних наборах насіння.

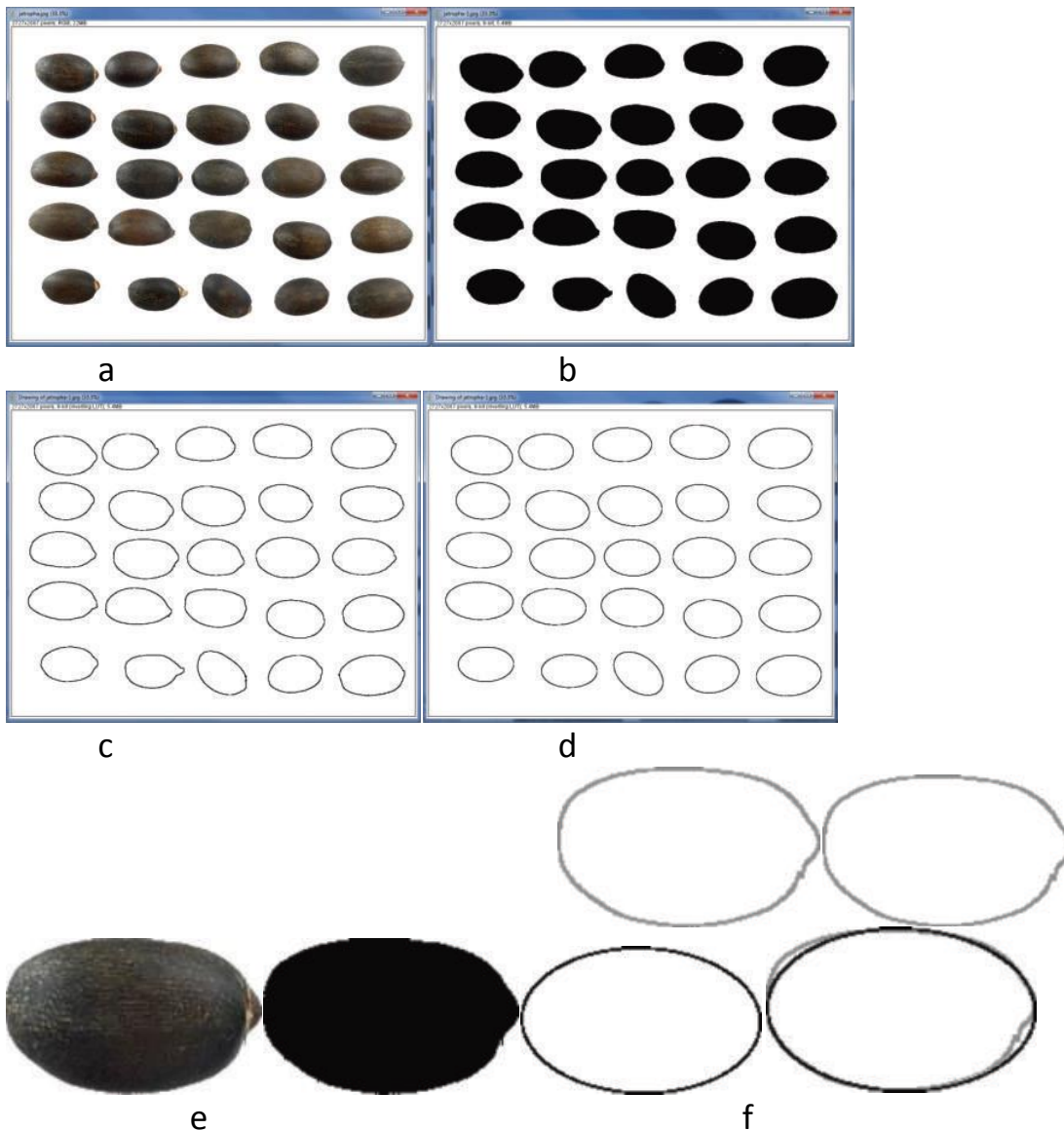


Рис. 1. Цифрова обробка зображень насіння

- (a) Зображення, що відповідають 25 насінням.
- (b) Двійкові зображення (чорно-білі) насіння, отримані за малюнком.
- (c) Силуети зображень насіння.
- (d) Еліпси, пристосовані до кожного зображення насіння (примірні еліпси задаються програмою Image J).
- (e) Насіння з його зображенням після сегментації та силуети зображення (вгорі) та відрегульованого еліпса (f)

Форма насіння трактується різними методами, що містять кілька ознак та різноманітних показників. Технічно дані для аналізу форми можуть бути отримані двома способами: ручним та обчислювальним. Найпростіший спосіб – виміряти довжину і ширину насіння за допомогою штангенциркуля.

Приклад насіння з його обмежувальним прямокутником (вгорі) та насіння з підходящим еліпсом, що показує в обох випадках великі та менші осі.

Форму насіння можна визначити за співвідношенням довжини / ширини. Хоча не дає точного опису форми насіння, це найпростіший показник для оцінювання та часто використовується багатьма авторами. Індекс ексцентричності (ІЕ):

$$IE = \frac{L}{W}$$

Співвідношення сторін підігнутого еліпса частинки визначають як

$$AR = \frac{\text{більша вісь}}{\text{Менша вісь}}$$

Індекс плоскості (ІП) ґрунтується на співвідношенні між рівняннями частинок уздовж трьох основних осей. Його розроблено і використовують для характеристики форми насіння.

$$IP = \frac{L+W}{2H}$$

де L , W і H – довжина, ширина та висота насіння відповідно. Він коливався від значення 1 для сфер до значень, більших ніж 2 для веретеноподібного насіння. Форму відносять до довжини, ширини і висоти насіння, але й інші дескриптори форми можуть бути більш точними. Наступні дескриптори фігур є корисними.

Індекс округлості [18–20] або форм-чинник є наступним:

$$I = \frac{4\pi \cdot \text{Ч площа}}{\text{периметр}^2}$$

Цей індекс (I) є мірою подібності плоскої фігури до кола. Він коливається від 0 до 1, де значення 1 для кіл, і це корисна величина як перше наближення до форми насіння.

Більш детальну інформацію можна знайти в «Оновлених методах аналізу насіння» Emilio Cervantes, José Javier Martín, and Ezzeddine Saadaoui. Hindawi Publishing Corporation Scientifica Volume 2016, ID стамми 5691825, 10 стр. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5691825>.

Форма насіння – одна з особливостей, що розглядають для опису насіння та аналізу внутрішньої та міжвидової мінливості. Наявність програмного забезпечення для цифрового аналізу зображень допомагає розробити декілька показників, що дозволяють моделювати форму насіння відповідно до віртуальних кривих (кардіоїд, еліпс, коло, яйцеподібний та ін.) Це дозволяє кількісно визначити форму насіння, яку можна використовувати в порівняльній систематиці, генетиці, фізіології та біохімії. На форму насіння впливають генетичні та екологічні чинники. Це пов'язано з таксономічним статусом і може бути пов'язане також з фізіологією проростання та врожаю насінневих продуктів

(крохмалю, жирних олій, білка тощо). Морфологічний опис структур рослин є необхідною умовою для розуміння взаємозв'язків між структурою та функцією в еволюції і може сприяти визначенню ситуацій розвитку, пов'язаних з геномним складом та діяльністю. Зміни форми можуть бути або результатом програм розвитку в «регулярному» середовищі, або реакцією на зміни (стрес) в екологічних умовах. Моделювання форми насіння за допомогою геометричних фігур – це просте наближення, яке може допомогти зрозуміти та кількісно оцінити морфологічні зміни насіння, зміни в ході засвоєння та зміни мутантів, а також відмінності між спорідненими генотипами. Аналіз форми насіння має несподівані застосування в ботаніці та агробіології.

Тестування насіння

Тестування насіння надає важливу інформацію для визначення якості відвантаження насіння щодо таких параметрів, як схожість, фізична чистота та вміст вологи. Таким чином, відомо, що воно відповідає технічним умовам замовлення і що якісне насіння надається уразливим фермерам. Тестування насіння слід проводити в національній насінневій лабораторії або в акредитованій ISTA лабораторії.

Якісне заявлене насіння (QDS)

Насіння для екстреного використання має відповідати стандартам якості, щоб забезпечити якісним насінням уразливих фермерів. Розроблена ФАО схема якості насіння передбачає стандарти якості насіння, які використовуються як мінімальні стандарти для насіння, придбаного в заходах з нормалізації обстановки пов'язаної з насінням.

Псування насіння

Температура та відносна вологість середовища зберігання – два найважливіші чинники, на які слід звернути увагу для зберігання насіння. Вміст вологи в насінні та конкретна культура також є важливими чинниками для зберігання насіння. Що нижча температура і відносна вологість, то довше насіння можна безпечно зберігати. Тому в екстрених режимах насіння не слід зберігати протягом тривалих періодів у тропічних умовах, щоб уникнути проблем із погіршенням насіння через високу температуру та відносну вологість.

Зберігання насіння

Ефективне зберігання насіння вимагає: насіння потрібно підсушувати до встановленого вмісту вологи, чисту добре провітрювану зону зберігання, за необхідності обробку насіння для запобігання нападу комах та періодичну перевірку насіння, що зберігається. Насіння не слід зберігати тривалий час за високої температури та відносної вологості.

Визначення чистоти насіння

Завданням аналізу чистоти є визначення відсоткового складу чистого насіння проти насіння інших видів та сміття (інертних частинок), що складають зразок.

З представленого зразка необхідно взяти робочу пробу, зважити і записати її вагу в грамах до трьох знаків після коми. Для видів, які не перелічені тут, слід використовувати робочий зразок, який за оцінками містить не менше 2500 насінин.

Потім робочий зразок відокремлюють вручну, ситом або вентилятором на два компоненти: чисте насіння випробуваного виду та насіння інших видів або сміття. Для чіткого визначення чистого насіння, іншого насіння та інертної речовини. Потім два компоненти необхідно зважити і записати в грамах до трьох знаків після коми.

Суму ваги двох складових фракції двох компонентів треба порівнювати з початковою вагою чистого робочого зразка для визначення збільшення чи втрати. Якщо виявлено невідповідність більше 5 % від вихідної ваги зразка, випробування слід відмінити і потрібно провести повторне випробування.

Про відсоток чистого насіння слід повідомити і обчислити за такою формулою:

$$\text{Чисте насіння \%} = \frac{\text{вага фракції чистого насіння}}{\text{тозагальна вага робочого зразка}} \times 100$$

Відсоток чистого насіння заокруглюють і записують до одного знака після коми.

Визначення схожості та енергії проростання насіння

Метою тесту на схожість є визначення потенціалу проростання насіння. У будь-якому місці відсоткове проростання – це розрахунок життєздатності насіння, випробувана у визначених умовах та протягом визначеного періоду часу. Кожен тест має складатися з чотирьох сотень насінин, які беруть з робочого зразка і потім випадковим чином ділять на чотири зразка по 100 насінин.

Подібність та проростання насіння – важливий показник їх посівних якостей. Насіння з хорошою схожістю та високою енергією проростання під час звичайних методів ведення сільського господарства завжди дають повноцінні саджанці. Проростання насіння має велике промислове значення: воно визначає їх придатність до посіву, норми їх посіву.

Під проростанням насіння мається на увазі кількість нормально пророщених насіння у зразку, взятому на аналіз, виражене у відсотках. Проростання насіння визначається за їх оптимальних умов, встановлених стандартом для кожної культури.

Насіння, які не відповідають вимогам стандарту подібності, не можна використовувати для посадки. Під час посіву насіння з низьким рівнем

проростання знижується врожайність; таке насіння краще використовувати для харчових та технічних цілей.

Одночасно зі схожістю визначають енергію проростання. Під енергійністю, що характеризує проростання насіння, мається на увазі кількість нормально пророщеного насіння за визначений для кожної культури проміжок часу, вираженої у відсотках.

Розрахунок вагової норми висіву насіння

Правильна густина рослин є важливим чинниками максимального врожаю зернових культур. Для отримання цільової щільності необхідно не тільки мати якісне посівне насіння, але й мати можливість точно розрахувати норми висіву. Дивно, що незначна різниця у розмірі насіння або проростання вносить зміни до норми висіву, необхідної для досягнення цільової концентрації рослин. Розмір, якість та проростання насіння різняться між сортами від року до року, від поля до поля, і їх слід ретельно перевіряти.

Якість посіву насіння

Великий розмір посівного матеріалу робить його вразливим до механічних пошкоджень жаткою під час збирання та під час подальшої обробки. Ця шкода не завжди є візуально очевидною. Пошкодження можна зменшити за рахунок уповільнення швидкості барабана жатки, відкривши увігнуту поверхню, зменшивши кількості шнеків. В ідеалі слід використовувати роторну жатку і стрічковий двигун або елеватор.

Насіння, яке буде використано для посіву, слід обробляти з особливою ретельністю. В ідеалі насіння, яке використовуватимуть у посівному році, слід виробляти як спеціальну насінневу культуру, а не просто випадковим чином збирати з усього поля. Якщо це неможливо, насіння слід зберігати з найкращої частини врожаю, де відсутні бур'яни та хвороби, а врожай дозріває рівномірно. Зерно, яке буде використано для насіння, слід збирати у першу чергу, щоб уникнути забруднення бур'янами та хворобами інших культур або з інших частин поля. Зберігати насіння потрібно за мінімальної обробки, окремо від основного насіння. Пошкоджене насіння призведе до поганої розсади. Якщо корінь пошкоджений, розсада проросте, з'явиться, а тоді просто загине. Це тому, що корінь слабкий і не може нормально рости. У разі пошкодження пагона розсада проросте і може з'явитися.

У пошкоджених саджанцях гороху та кінських бобів, де сім'ядолі залишаються нижче рівня землі, пагон з'являється пізніше, виглядає деформованим та може бути жовтим або блідо-зеленим.

Аномальні саджанці, які з'являються, не мають енергійності, це робить їх вразливими до суворості поля. Такі чинники, як температура, хвороби, комахи, глибина висіву та поява кірки на ґрунті дуже впливають на проростання слабких

саджанців. Ті, що з'являються, навряд чи довго проживуть і майже не зроблять свого внеску в кінцевий урожай.

Незадовільне створення товарних культур часто може бути пов'язане з посівом неякісного насіння.

Якість зерна бобових завжди слід перевіряти перед посівом. Необхідно провести візуальну перевірку партії насіння на наявність розтріскування насінневої оболонки або інших пошкоджень від комах та хвороб, а також провести тест на сходження, щоб визначити кількість нормальних життєздатних або непошкоджених насінин.

Тестування на наявність захворювань, що передаються через насіння, можуть проводити спеціалізовані лабораторії для низки захворювань, таких як вірус мозаїки огірка у вузьколистих люпинів, бактеріальна клітина в горосі і аскохитозу нуті. Люпин *Albus* слід перевірити шляхом УФ-скринінгу на предмет можливого забруднення гірким (високоалкалоїдним) насінням.

Випробування на проростання

Все насіння зернобобових культур, яке буде використано для посіву, має бути протестоване на проростання. В ідеалі слід використовувати лише насіння бобових з проростанням понад 80 %. Випробування на проростання можна провести в лабораторії або вдома.

Коли робити тест

Найкращий час для взяття проб – це під час чи одразу після очищення насіння. Це забезпечує ідеальний спосіб отримання хорошого репрезентативного зразка. Однак, якщо ви думаєте, що партія насіння, швидше за все, знизилася проростання, слід провести тестування перед чищенням насіння. Це мінімізує витрати і збереже час для отримання заміни насіння. Коли ви робите тест перед чи після очищення насіння, температура лотка для проростання або температура землі, швидше за все, буде вище, ніж під час посіву. Це не має значення, оскільки метою є визначення кількості нормальних саджанців, і на це температура не впливає.

Відбір проб

Запорукою хорошого тесту на схожість є отримання репрезентативного зразка. Тест потрібно проводити для кожної 20-ти тонної партії насіння. Вибірка має бути випадковою і включати численні підвибірки, щоб отримати найкращі результати. Невелику кількість (1 склянку) насіння потрібно регулярно брати під час переміщення насіння (з очищувача насіння, сховища або вантажівки) або з багатьох різних мішків. Із силосної ями не беруть проби, оскільки отримати репрезентативний зразок небезпечно і важко. Коли субпроби зібрано, ретельно перемішайте і візьміть зразок насіння вагою 1 кілограм.

Тести на схожість

Налаштування тесту

Зручний спосіб – використовувати плоский піднос розміром 30 см і завглибшки 5 см. Внизу покладіть один аркуш паперу, щоб закрити дренажні отвори і зафіксуйте чистим піском, грантовою сумішшю або вільно дреноючим ґрунтом. Якщо у вас немає лотка, випробування можна провести в будь-якій самозливній ємності або в прохолодній частині саду. Лабораторні випробування на проростання зазвичай проводять за температури 20 °С, тому якщо випробування проводять у приміщенні, то його слід проводити за цієї температури. Відлічіть 100 насінин (включаючи пошкоджені) і посійте 10 рядів по 10 насінин – ряди полегшують підрахунок саджанців. Насіння слід висівати на звичайну глибину висіву 2–3 см. Покладіть насіння на пісок або ґрунт і засуньте їх штирем або олівцем і покрийте невеликою кількістю піску. Більше насіння, такі як кормові боби, можна успішно випробувати в одних і тих самих лотках, і їх потрібно сіяти якомога глибше. Акуратно поливайте! Ґрунт тримайте вологим (а не мокрим). Надмірний полив призведе до росту грибів на насінні, спричиняючи можливу гніль насіння, що вплине на нормальне проростання. Якщо у вас немає лотка, посійте 100 насінин рядами в саду на нормальній глибині, ретельно підраховуючи кількість посіяного. Не забувайте про вологу.

Підрахунок розсади

слід рахувати через 7–10 днів, коли більша частина розсади виросла. Не чекайте, поки з'являться останні паростки – вони пошкоджені, слабкі. Слід враховувати лише нормальні саджанці. Не рахуйте сильно хворі, знебарвлені або спотворені ростки або, у випадку з люпином, тих, на яких відсутня сім'ядоля. Пам'ятайте, ви хочете знати загальну кількість нормальних, енергійних, здорових саджанців. Якщо ви нарахуєте 83 нормальних ростки, то ваш відсоток проростання становить 83 %.

Розрахунок норм висіву

Норма висіву може бути розрахована, використовуючи цільову щільність, відсоток проростання, масу насіння та відсоток закладки (див. рівняння нижче).

$$\text{НОРМА ВИСІВУ} = \frac{\text{Цільова щільність рослин} \frac{pl}{m^2} \times 100 \text{ вага насіння (грам)} \times 10}{\text{Відсоток проростання} \times \text{відсоток укорінення}}$$

Крок 1– цільова щільність рослин.

Яка оптимальна щільність рослин? Вона буде залежати від того, яке бобове насіння висаджують, регіону, кількості опадів та часу посіву (вчасно чи пізніше, ніж хотілося б).

Наприклад:

- польовий горох;
- 425 мм річних опадів;
- Цільова щільність рослин для цього прикладу становить 40 рослин/м².

Крок 2– визначення ваги 100 насінин. Це робиться шляхом підрахунку заданої кількості насіння (не менше 200) та зважування його. Кількість насінин на кілограм або розмір насіння також можна отримати за запитом шляхом лабораторного тесту на схожість. Що більше насіння підраховали, то точніше відповідь. Завжди підраховуйте кожну окрему партію насіння, не думайте, що вони однакові, якщо вони з різних полів, сортів чи років. У цьому прикладі 100 насінин важили 21 грам. Якщо у вас є насіння на кілограм з лабораторного тесту, це можна легко перетворити на вагу 100 насінин таким чином:

$$\text{Вага 100 насінин} = 1000 \times 100 \text{ насінин на кг}$$

Крок 3 – коригування відсотка проростання та укорінення. Припустімо, що лише 80 % нормальних пророщеного насіння укоріниться в польових умовах – температура, вологість, тип ґрунту, глибина посіву, комахи та хвороби вплинуть на виживання. Відсоток посіву може бути відрегульований відповідно до вашої впевненості в процесі посіву та умовах проростання. Реальна оцінка укорінення – 80 %.

У прикладі проростання насіння гороху – 93 %, цільова щільність – 40 рослин на м², а вага 100 насінин – 21 грам. Під час обчислення норми висіву використовуйте десятковий еквівалент відсотка укорінення (0,80 для 80 %).

Норма висіву	Приклад	Насіння
Крок 1 Цільова щільність (рослин/м ²)	= 40 рослин/м ²	TD
Крок 2 вага 200 насінин, вага 100 насінин (грами)	= 42 = 42 ÷ 2 = 21 грами	÷ 2 100sw
Крок 3 проростання (%)	= 93 %	G
Норма висіву (kg/ha)	= 113 kg/ha	SR

Визначення придатності насіння

Життєздатність насіння – це здатність зародка проростати, і на нього впливає низка різних умов. Різноманітність чинників може впливати на життєздатність насіння, наприклад, здатність рослини виробляти життєздатне насіння, пошкодження хижаками та збудниками хвороб та такі умови навколишнього середовища, як повені чи спека. Вік насіння також впливає на його здоров'я та здатність до проростання. Насіння – це живі зародки, і з часом клітини гинуть і їх неможливо замінити. На те скільки часу насіння залишається життєздатним, може впливати як генетика, так і навколишнє середовище. Деяке

насіння може зберігати життєздатність в оптимальних умовах протягом багатьох років, а інше лише протягом сезону.

Життєздатність проростання насіння – це відсоткове значення кількості живого насіння після зберігання і такого, що може перерости в рослини, які зможуть розмножуватися за відповідних умов.

Життєздатність насіння можна перевірити багатьма простими способами. Тест на проростання насіння, мабуть, найпростіший: насіння дають необхідні ресурси (повітря, воду, тепло і світло), щоб прорости і вирощують розсаду. Просто помістіть насіння в ґрунт або в горщик з ґрунтом і подивіться, скільки виросте. Однак недоліком використання ґрунту, горщиків та зовнішніх ресурсів є коливання навколишнього середовища, які можуть поставити під сумнів справжню життєздатність насіння.

Дві основні причини неспроможності насіння прорости у відповідних умовах – це те, що воно або вже мертве, або спляче. Мертве насіння можна ідентифікувати, оскільки воно зазвичай розм'якшується та загниває під час випробування внаслідок атаки бактерій та грибів. Насіння, які залишаються твердими або поглинають воду, але залишаються міцними і в хорошому стані під час проби на проростання, ймовірно, спить. Спокій насіння поширений серед деяких сільськогосподарських культур безпосередньо після збору врожаю та у багатьох диких видів, що відносять до хлібних злакових рослин.

Важливо знати, що насіння, яке зберігається в генетичному банку, виросте для отримання рослин. Тому воно повинне мати високу життєздатність на початку та під час зберігання. Життєздатність насіння на початку зберігання також визначатиме термін зберігання.

Життєздатність потрібно буде визначати на початку зберігання та через певні періоди під час зберігання, щоб передбачити правильний час регенерації зростання. Тест життєздатності займає від декількох днів до тижнів і навіть місяців, щоб дати точний результат. Якщо це можливо, то результати мають бути доступні перед пакуванням та розміщенням насіння в генетичному банку, щоб насіння низької якості можна було ідентифікувати та регенерувати перед зберіганням. Якщо життєздатність не може бути визначена перед зберіганням, насіння слід помістити на довготривале зберігання для того, щоб забезпечити їх зберігання під час очікування результатів випробування.

Найбільш точним тестом життєздатності є тест на проростання, і він буде описаний тут. Тест на проростання проводять у контрольованих умовах, щоб з'ясувати, скільки насіння проросте і дасть нормальну розсаду, яка могла б перерости у нормально репродуктивно дозрілі рослини. Консультативний комітет IBPGR з питань зберігання насіння рекомендує, щоб для початкового випробування на схожість видів були допустимі мінімум два зразки з використанням 200 насінин (100 насінин на зразок), за умови, що схожість перевищує 90 %. Якщо ні, то ще 200 насінин слід перевірити, за тим самим принципом, і загальний результат життєздатності насіння взяти за середнє

значення для двох тестів. Для перевірки життєздатності доступні інші біохімічні тести. Вони мають перевагу в тому, що вони швидші, але не настільки точні і потребують значних навичок і практики в їх реалізації та інтерпретації. Їх не рекомендує Консультативний комітет IBPGR з питань зберігання насіння для загального використання як тести на життєздатність насіння.

Методика проведення

Різні методи визначення життєздатності насіння служать для забезпечення насіння субстратом, який забезпечує доступність води, щоб насіння вбирало її в себе і проростало.

Усе насіння має специфічні вимоги до світла та температури, але загальне правило полягає в тому, що більшість насіння проростає, коли температура буде від 20 до 30 °C, у субстраті має бути присутня достатня кількість води, а на насіння потрапляє світло.

Насіння для тесту слід відбирати випадковим чином з усієї партії насіння. Міжнародні стандарти тестування насіння пропонують використовувати 200 насінин у тесті на схожість. Якщо цю кількість насіння важко досягти, можна використовувати 100 або навіть 50 насінин. Розподіліть загальну кількість наявного насіння на дві частини, так у вас вийде два зразки для вашого тесту на схожість. Якщо у вас є велика кількість насіння (салат, капуста, помідори тощо), то розподіл на 4 частини по 100 насінин дадуть дуже достовірні результати.

Перевірка життєздатності насіння шляхом проведення тесту на проростання насіння є важливим способом визначити якість вашого насіння, визначити ефективність ваших методів зберігання насіння та допомогти вам посадити належну кількість насіння. Проводячи ці прості випробування на життєздатність насіння, ви можете підвищити ефективність збереження насіння та допомогти фермерам у збереженні та садінні важливого генетичного різноманіття. Розглянемо середній відсоток життєздатності приєднання. Якщо він перевищує 90 %, прийміть тест як дійсний і використовуйте його значення як справжню життєздатність. Якщо результат становить 90 % або нижче, повторіть тест, використовуючи ще 200 насінин, дотримуючись тих самих процедур. Обчисліть середній відсоток життєздатності за результатами двох тестів і використовуйте його як загальний результат тесту.

Енергія проростання насіння

Енергію проростання насіння визначають як «загальну суму тих властивостей насіння, які визначають рівень активності та продуктивності насіння або партії насіння під час проростання та появи розсади». В будь-якій партії насіння втрати енергійності насіння пов'язані зі зниженням здатності насіння виконувати всі фізіологічні функції. Цей процес, який називається фізіологічним старінням (або погіршенням), починається перед збиранням, триває під час збирання, переробки та зберігання. Він прогресивно знижує

продуктивні можливості, наприклад, зміни цілісності клітинної мембрани, активності ферментів та синтезу білка. Ці біохімічні зміни можуть відбутися дуже швидко (кілька днів) або повільніше (кілька років), залежно від генетичних, виробничих та екологічних чинників, які ще не повністю вивчені. Кінцевою точкою цього погіршення є кінцевому результаті загибель насіння (тобто повна втрата можливості проростання). Однак насіння втрачає життєздатність, перш ніж воно втрачає здатність до проростання. Ось чому партії насіння, які мають схожі високі показники проростання, можуть відрізнятися за своїм фізіологічним віком і дуже відрізнятися життєздатністю насіння, а отже, і здатністю перерости у рослини. Ці відмінності енергійності існують у сільськогосподарських, садових та лісокультурних видах насіння (ISTA, 2009).

Вплив зберігання на життєздатність та енергійність

Найвищий урожай насіння в сільському господарстві досягається за нормального живлення та екологічних умов. Умови зберігання впливають на якість насіння та на урожайність насіння після вирощування. Потенціал зберігання партій насіння пов'язаний із стадією їх псування (енергійність) за надходження для зберігання. Якщо в навколишньому середовищі наявна будь-яка форма стресових чинників (наприклад, зміна температури або відносна вологість повітря за неконтрольованого зберігання), партії насіння з високою енергійністю будуть краще протистояти таким екологічним навантаженням і якість знижуватимуться повільніше, ніж партії з меншою енергійністю насіння. Навіть у контрольованих умовах зберігання (тобто низька температура та низький вміст вологи в насінні) продуктивність після зберігання залежить від статусу енергійності партії насіння (IATA, 2009). Використання герметично закритих ємностей, сушарок та низьких температур покращує зберігання, оскільки під час сухого зберігання регулюються декілька фізіологічних та біохімічних процесів і продуктів. Прискорене старіння насіння, через вплив кількаденної високої температури та вологості, визнають точним показником життєздатності та зберігання насіння. Деякі згубні наслідки старіння пов'язані з пошкодженнями, що виникають на рівні мембрани, нуклеїнових кислот та білка.

Стандартизація відповідних умов кондиціонування, пакування та зберігання може забезпечити задовільну посівну якість насіння цибулі. На швидкість погіршення насіння впливають різні екологічні та біологічні чинники. Високі температури під час зберігання, як і високий вміст вологи в насінні спричиняють його погіршення. Відносний вплив вмісту вологи та температури насіння на довголіття відрізняється залежно від видів, а також структурного та біохімічного складу насіння. Повну схему втрати життєздатності базується на основі вологості насіння та температури зберігання. Різкі коливання, а також висока вологість і температура в субтропічних умовах Індії посилюють втрату здатності до проростання насіння цибулі.

Генетична ерозія матеріалу вважається актуальною проблемою на міжнародному рівні (FAO, 1997). З цієї причини рекомендується постійний моніторинг основних чинників, що викликають генетичну ерозію у колекціях *ex situ*, щоб мінімізувати втрату генетичного різноманіття. До таких чинників належать низька якість вихідного матеріалу, пересушування насіння перед зберіганням, підвищення температури або вмісту вологи в насінні під час консервації, відсутність регенерації, втрати зародкової плазми під час розмноження, фізіологічні зміни насіння під час зберігання та втрата можливості проростання, спричиненої відсутністю моніторингу життєздатності (FAO, 1997). Загалом, поєднання $3 \pm 7\%$ вмісту вологи та температури зберігання нижче $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ дозволить довгостроково зберігати насіння (FAO / IPGRI, 1994). Але навіть для того насіння, що зберігається в контрольованих умовах, життєздатність може знизитися внаслідок процесу псування.

Тестування енергійності насіння

Стандартний тест на проростання – це показник якості насіння, який можна використовувати для прогнозування появи поля, якщо умови ґрунту майже ідеальні. Однак умови, в яких виявляється насіння під час експертизи, часто суперечать умовам на місцях. Проростання на полі залежить від життєздатності насіння. Життєздатність насіння або енергійність насіння – це сукупність характеристик, що визначають активність та поведінку комерційно прийнятного проростання партій насіння в різних умовах навколишнього середовища. Крім вищезазначеного, довговічність насіння визначають енергією насіння без несприятливих наслідків (ISTA, 2009). Для отримання більш точної інформації про якість партії насіння використовують різні випробування енергійності. Випробування життєздатності насіння за допомогою різних тестів на енергійність дуже важливе, оскільки тести на енергійність дають результати, які часто краще співвідносяться з результатами проростання поля за несприятливих умов, ніж результати, отримані під час застосування стандартного лабораторного тесту на схожість.

Тести на енергійність можна згрупувати у три групи:

1) Фізичні випробування визначають такі характеристики насіння, як розмір і маса. Ці випробування недорогі, швидкі, можуть бути застосовані до великої кількості зразків і позитивно співвідносяться з енергійністю насіння. Основна особливість розвитку насіння – накопичення поживних матеріалів, що також є в прямій залежності від енергійності, тобто розміром і масою насіння.

2) Фізіологічні випробування з використанням параметрів проростання та росту. Існує два типи цих тестів. Перший тип, коли проростання проводиться за сприятливих умов (стандартне лабораторне проростання та тест на інтенсивність росту). Другий тип, коли насіння піддається несприятливим умовам навколишнього середовища (холодна проба, тест на прискорене старіння та тест Хільтнера).

3) Біохімічні випробування розглядають як непрямі методи оцінки цінності насіння. Це тест на тетразоліум, кондуктометричні вимірювання, активність ферментів та дихання.

Комітетом з оцінювання енергійності насіння ISTA було використано два критерії для оцінювання ефективності методів випробування насінневої енергії для різних сільськогосподарських культур: відтворюваність методу енергійності та взаємозв'язок між результатами випробувань енергійності та появою розсади у ґрунті. Не існує загально визнаного тесту на енергійність для всіх видів насіння. Визначення наступних тестів на енергійність буде корисним для отримання додаткової інформації про якість насіння.

Випробування росту

Принципи: арка тесту зростання, базується на принципі, що енергійне насіння росте швидше, ніж насіння з поганою енергійністю навіть у сприятливих умовах. Енергійне насіння швидко проростає, метаболізується і укорінюється в полі. Отже, будь-який метод, що застосовують для визначення швидкості росту саджанця, вказує на рівень енергійності насіння.

Апаратура та обладнання: необхідне те ж саме обладнання та матеріали, які використовують під час випробування на проростання. Крім того, необхідні ваги верхнього завантаження та духовка шафа.

Процедура

(а) Перший підрахунок. Тест проводять разом із звичайним тестом на схожість. Підраховують кількість нормальних саджанців, пророщених в перший день відліку, як зазначено в тесті на схожість для кожного виду. Кількість нормальних саджанців дає уявлення про рівень енергійності насіння в sample. Що більша кількість нормальних саджанців, то більша енергія насіння.

(б) Швидкість росту розсади та маса сухої речовини. Дугу розсади вирощують або в лабораторії, теплиці або на полі. В лабораторії слід проводити дослідження між паперовими рушниками. Десять насінин висаджують у центр вологих паперових рушників таким чином, щоб мікропіле були орієнтовані на дно, щоб уникнути скручування коренів. Паперові рушники залишають у пророщувачі, що підтримується за температури, рекомендованої для посіву. Через певний проміжок часу (5–10 днів) рушники прибирають та вибирають п'ять саджанців дуги, вимірюють їх довжину і розраховують середню довжину саджанця. Партії насіння, що дають більш високі саджанці, вважаються більш енергійними, ніж партії, що дають більш низьку розсаду. Для визначення сухої ваги розсаду виймають і сушать у повітряній печі за температури 100 °C протягом 24 годин. Суха маса розсади дає додаткову інформацію для оцінювання енергійності насіння.

(с) Швидкість проростання. Сто насінин кожного з чотирьох зразків висаджують у рекомендований субстрат для проростання. Субстрат утримується за рекомендованої температури для врожаю. Кількість розсади, що з'являється щодня, рахується від дня посадки насіння в середовище до моменту проростання. Після цього індекс проростання (G.I.) обчислюють за допомогою таких формул:

$$\text{Індекс проростання G.I.} = \frac{n}{d},$$

де n = кількість саджанців, які проростають за день 'd'

d = день після посадки.

Насінневу партію, що має більший показник проростання, вважають більш енергійною.

(d) Індекс енергійності насіння. (S, v.l.): Його обчислюють шляхом визначення відсотка проростання та довжини розсади однієї партії насіння. П'ятдесят насінин кожного з чотирьох зразків дуги проростають у паперових рушниках, як це було визначено для конкретного виду урожаю в тесті на проростання. Оцінюючи кількість нормальних саджанців на час остаточного підрахунку, вимірюють довжину розсади 5 випадково вибраних саджанців. Індекс енергійності насіння розраховують шляхом множення проростання (%) та довжини розсади (0101). Партія насіння, що показує більш високий показник енергійності насіння, вважають більш енергійною.

Принцип випробування Хільтнера (тест на цегляний гравій)

Тест був розроблений Гільтнером у Німеччині в 1917 році. Насіння злакових культур, уражених хворобою фузаріуму, змогли прорости в звичайному тесті, але не змогли прорости з цегляного гравію розміром 2–3 мм. Порівняно з цим, здорове насіння змогло прорости з цегляного гравію. Принцип полягає в тому, що слабкі саджанці не здатні генерувати достатню силу для подолання тиску цегляного гравію, тому цей метод може бути використаний для диференціації рівня енергійності в зернах злакових.

Прилади та обладнання: ящик для пророщування, алюмінієвий піддон, пісок, цегляний гравій розміром 2–3 мм, пророщувач, проба насіння.

Порядок роботи. Пісок просипають через сито, зволожують і засипають у коробку для проростання, залишаючи близько 3 см порожнього місця зверху. Сто насінин поміщають у кожен ящик відтиск, зробленим пісочним маркером. Після цього 2–2,5 см пористого цегляного гравію розкладають на насіння. Коробку зберігають у пророщувачіза відповідної температури. Після закінчення періоду, необхідного для проростання, ящик виймають і розсаду, що проросла через шар гравію, підраховують. Відсоток появи розсади використовують для порівняння енергійності насіння різних партій. Тест слід повторити 3–4 рази, щоб отримати достовірну цінність.

Принцип холодного тестування

Цей тест був розроблений у США для оцінювання сили насіння кукурудзи. У США, коли кукурудза висаджується пізньою весною, ґрунт вологий і холодний. Слабке насіння не проростає і не укорінюється. Тому для моделювання фактичних польових умов, засвідчених на момент висадки кукурудзи, був розроблений холодний тест. Тест має на меті розрізнити слабкі та сильні партії насіння, піддаючи їх дії низької температури перед проростанням за оптимальної температури. Тест критикували за використання польового ґрунту, який сильно відрізняється залежно від місця.

Прилади та обладнання: алюмінієвий піддон, польовий ґрунт, піщаний маркер, пророщувач, проба насіння.

Порядок роботи. Після подрібнення та правильного просіювання ґрунту з поля в лоток завглибшки 2 см. П'ятдесят насінин поміщають на пісок і накривають ще 2 см ґрунту. Ґрунт ущільнюють і додають достатню кількість води, щоб зробити ґрунт приблизно 70 % вологості. Температура води має бути 10 °С. Після поливу лотки накривають поліетиленовими пакетами і поміщають у холодильник на тиждень з підтримкою температури 10 °С. Через один тиждень лотки виймають і поміщають у пророщувача температури 25 °С. Саджанці, які з'явилися через 4 дні, підраховують. Відсоток проростання обчислюють шляхом підрахунку кількості нормальних саджанців, як у тесті на проростання. Що більший відсоток проростання, то більша енергійність.

Тест на прискорене старіння

Принципи. Тест на прискорене старіння розроблено в Лабораторії насінневих технологій Державного університету Міссісіпі, США для визначення потенціалу зберігання партій насіння. Процес старіння прискорюється, піддаючи насіння високій температурі та відносній вологості в камері перед стандартним проростанням. Очікується, що насінневі партії, що демонструють високу схожість під час прискореного старіння, підтримують високу життєздатність і за зберігання в навколишньому середовищі. Таким чином. випробування на старіння вказує на ефективність партії насіння під час зберігання в навколишньому середовищі. Випробування, проведені в Пантнагарі з насінням сої сорту Брегг, показали позитивний зв'язок між 3-денним тестом на прискорене старіння (температура 42–45 °С, 95–100 % в.в.) та життєздатністю через 6 місяців після зберігання в навколишньому середовищі. Але тест піддається росту грибів на насінні за високої температури та вологості.

Прилади та обладнання: камера прискореного старіння, обладнання для тесту на проростання, проби насіння, щільна банка, муслінова тканина, дротяна сітка тощо

Процедура. Сто насінин кожного з чотирьох зразків зав'язують мусліною тканиною. Зв'язане насіння поміщають у банку на дротяній сітці. Нижня частина банки наповнена водою. Не повинно бути прямого контакту між водою та

насінням. Баночку накривають кришкою і закривають парафіновим воском, щоб вона була герметичною. Потім банку поміщають у камеру прискореного старіння, що витримують за температури 45 ± 2 °C протягом 3–5 днів. Після цього періоду банку забирають, а насіння охолоджують в осушувачі. Потім насіння тестують у звичайному тесті на схожість, характерному для різних культур. Відсоток проростання показує енергійність насіння. Що більший відсоток проростання, то більша енергійність насіння.

Майбутня роль енергійності насіння

Тестування енергійності насіння є важливою складовою якості насіння і необхідні задовільні рівні якої є необхідними до традиційних критеріїв якості вологи, чистоти, проростання та здоров'я насіння для отримання оптимальної стійкості рослин та хорошого виробництва сільськогосподарських культур. У міру того, як сільськогосподарські та технології садівництва стають все більш досконалішими, потреба в насінні високої енергійності зростатиме і стандарти тестування, аналогічні стандартам проростання, будуть необхідні. Технологія випробування енергійності насіння до цього часу не була вдосконалена, настільки, що не існує єдиного загальновизнаного методу випробування на енергійність насіння. Дослідження необхідні для подальшого вдосконалення існуючих методів випробування енергійності насіння та розробки нових методів, які більше пристосовані до польових умов / умов зберігання.

Глава 4. АНАЛІЗИ ТА ЇХ ПРОВЕДЕННЯ

Мета цього розділу – стисло надати деякі загальні концепції та практичні інструменти, які є важливими для виконання лабораторного аналізу в будь-яких прикладних дослідженнях. Цей розділ охоплює матеріали, що викладають основи проведення досліджень з використанням належної лабораторної практики. Він містить основні визначення, вимоги та вказівки щодо налаштування лабораторії, вимоги до валідації методів, загальний опис методів, випробування.

4.1. Поняття аналізу (прикладні дослідження)

/З. Кучукашвілі, Н. Інасарідзе/

Аналіз та звіти. Визначає та описує основні необхідні елементи управління аналітичними випробуваннями та науковими дослідженнями, планування, виконання, звітування, моніторинг та етику в лабораторії.

4.1.1. Вступ

Загальновідомо, що всі знання та теорія в науці походять від практичних спостережень та експериментів: це однаково справедливо для таких різноманітних дисциплін, як мікроскопія та молекулярна генетика. Дослідження в галузі прикладних наук, агропродовольчої науки та технологій, чи то агропромислова та харчова промисловість, державні агенції з безпеки харчових продуктів або університети, часто вимагають визначення складу та характеристик сировини, продуктів харчування та кормів. Тенденції та вимоги споживачів, національні та міжнародні норми та реалії харчової промисловості кидають виклик агропродовольчим науковцям та аналітичним випробувальним лабораторіям, коли вони працюють з метою контролю складу продуктів харчування та забезпечення якості та безпеки постачання їжі.

Характер зразка та конкретна причина аналізу зазвичай визначають вибір аналітичних методів. Швидкість, точність, надійність, специфічність та чутливість часто є ключовими чинниками під час вибору. Перевірка методу для конкретної аналізованої матриці тестування необхідна для забезпечення корисності методу. Методи аналізу, розроблені та схвалені кількома некомерційними науковими організаціями, дозволяють стандартизоване порівняння результатів між різними лабораторіями та оцінювання менш стандартних процедур. Такі офіційні методи мають вирішальне значення під час аналізу сировини, продуктів харчування та кормів для забезпечення їх відповідності законодавчим вимогам, встановленим державними установами. Нормативні акти та міжнародні стандарти, що мають найбільше відношення до аналізу сировини, продуктів харчування та кормів, тут згадуються, але більш детально висвітлюються в інших главах.

4.1.2. Загальні лабораторні та процедурні вимоги

Основні вимоги

Будь-яка лабораторна робота, яка передбачає роботу з живими організмами, тваринами або мікроорганізмами, має бути ретельно продумана. Закон про охорону праці вимагає, щоб лабораторії та наукові установи забезпечували безпечне робоче середовище без ризику для здоров'я. Там, де це доречно, має бути передбачене навчання та наявність інформації щодо безпечної роботи. Персонал лабораторії має дотримуватися розумної обережності, щоб убезпечити себе та інших людей, і не нехтувати будь-яким захисним обладнанням. Безпечна робота означає дотримання кодексу безпечної практики, що підтримує законодавство, поряд із моральним зобов'язанням уникати шкоди собі та іншим. Етичні та людські аспекти, які слід враховувати перед виконанням будь-яких робіт, охоплюють: можливу шкоду фауні та флорі; безпека інших у групі; наслідки вашої роботи для інших, напр. землевласники або інші користувачі. Без етичних рамок люди можуть виносити лише суб'єктивні ціннісні судження, базуючись виключно на особистих думках та позиції, а не на об'єктивному аналізі, про що детальніше йдеться в інших розділах.

Організація лабораторії

Лабораторія повинна мати у своєму розпорядженні потужності, обладнання, кваліфікований персонал, системи та служби підтримки, необхідні для управління та виконання своєї лабораторної діяльності. Для всіх прикладних досліджень та лабораторій агропродовольчих випробувань слід дотримуватися відповідних вимог щодо норм безпеки та рекомендацій виробників щодо безпеки, і вони мають відповідати настановам, викладеним у стандартах GLP та ISO/IEC 17025. Основа цих стандартів, що стосується як ризиків, так і можливостей, створює основу для підвищення ефективності системи управління лабораторією, досягнення кращих результатів та запобігання негативним наслідкам. Лабораторія відповідає за те, які ризики та можливості потрібно вирішити. Дуже важливо, щоб у лабораторії не існувало конфліктів інтересів або їх вирішення не впливало негативно на подальшу діяльність лабораторії. Лабораторія має документувати вимоги до компетентності для кожної функції, що впливає на результати лабораторної діяльності, зокрема вимоги до освіти, кваліфікації, підготовки, технічних знань, навичок та досвіду.

Устаткування та навколишні умови мають бути придатними для лабораторної діяльності і не впливати на достовірність результатів. За необхідності, для виконання звичайних та спеціалізованих процедур має бути передбачено окремий лабораторний простір. Фізичне розділення за допомогою використання різних приміщень є найефективнішим та найкращим способом забезпечення окремих робочих зон, але інші методи можуть бути використані як

захист від забруднення, за умови, що їх ефективність є аналогічною. Наприклад, випадкове забруднення ДНК може відбуватися пилом та аерозолями. Як наслідок, організація робочої зони в лабораторії логічно ґрунтується на систематичному стримуванні методологічних етапів, що беруть участь у отриманні результатів та принципі «прямого потоку» для обробки зразків. Персонал має носити різні лабораторні халати в різних робочих зонах, а також носити одноразові рукавички. Рукавички та лабораторні халати слід міняти з відповідною частотою. Реактиви та розчини слід зберігати за кімнатної температури, якщо не вказано інше. На достовірність результатів можуть негативно вплинути мікробне забруднення, пил, електромагнітні порушення, випромінювання, вологість, електроживлення, температура, звук і вібрація, і всі ці параметри мають контролювати, моніторити і реєструвати.

Як правило, лабораторія має обладнання, що містить: вимірювальні прилади, які мають бути відкалібровані, програмне забезпечення, еталони вимірювань, довідкові матеріали, довідкові дані, реагенти, витратні матеріали або допоміжні прилади, які необхідні для правильного виконання лабораторних робіт і який може вплинути на результати. Кожна частина обладнання повинна мати типову інструкцію (SOP) для роботи, калібрування та планового обслуговування. Апаратура та обладнання мають обслуговувати відповідно до інструкцій виробника.

Персонал має використовувати відповідні методи та процедури для всієї лабораторної діяльності та, де це доречно, для оцінювання невизначеності вимірювань, а також статистичних методів аналізу даних. Результати вимірювань мають бути простежуваними та продемонстрованими за допомогою Міжнародної системи одиниць (SI). Усі методи, процедури та супровідна документація, такі як інструкції, стандарти, посібники та довідкові дані, що стосуються лабораторної діяльності, мають постійно оновлювати та бути доступними для персоналу. Лабораторія має перевірити нестандартні, розроблені в лабораторії, власні методи. Експлуатаційні характеристики перевірених методів можуть містити: діапазон вимірювання, точність, невизначеність результатів вимірювання, межу виявлення, межу кількісного визначення, вибірковість методу, лінійність, повторюваність або відтворюваність, стійкість проти зовнішніх впливів або перехресну чутливість до перешкод з матриці вибірки або тестового об'єкта. Цю інформацію детальніше висвітлено в інших розділах.

Протоколи та стандартні операційні процедури

Лабораторії повинні мати стандартні операційні процедури (SOP), що є письмовою процедурою, яка описує, як виконувати певні поточні лабораторні тести, які зазвичай не детально описані в планах дослідження або керівних принципах випробувань. Протоколи дослідження визначають «що» та «коли» це буде зроблено під час тестування; СОП визначають «як» виконувати визначені

протоколом дії. СОП мають бути достатньо детальними, щоб вказівки для вивчення персоналу були зрозумілі для проведення звичайних лабораторних робіт. Якщо для дослідження застосовуватимуть винятки із СОП, то ці винятки мають бути описані в протоколі. У протоколі мають бути перелічені СОП, що використовують у конкретному дослідженні. Якщо освітня діяльність або дослідження ще не є «стандартною» або передбачається одноразово, прийнято долучати детальний опис «інструкцій» щодо цієї діяльності в протокол дослідження або в лабораторний зошит. Однак, якщо така діяльність стає рутинною, слід підготувати СОП. Першою СОП, яку слід написати, є СОП для написання СОП. Ця СОП має містити вказівки щодо змісту кожної СОП, систему нумерації СОП та систему перегляду, перевірки й прийняття СОП. Копії СОП мають бути легко доступні для персоналу лабораторії. Стандартні операційні процедури – це живі документи, однак вони вимагають догляду та обслуговування. Постійне оновлення посібників із СОП залишається основним зусиллям для лабораторій.

Належна лабораторна техніка завжди мала належне маркування реагентів та розчинів. Вони охоплювали чотири відомості: «Ідентичність», «Титр або концентрація», «Вимоги до зберігання», «Термін придатності». Для таких матеріалів, де термін придатності невідомий, прийнято вказувати на етикетці термін придатності «НІЯКИЙ» або «Н/З» (не застосовується). У цьому випадку достатньо призначити терміни придатності на основі посилань на літературу та / або лабораторний досвід.

Загальна процедура прикладних та агропродовольчих досліджень / тестувань охоплює такі етапи:

- відбір проб;
- отримання репрезентативну вибірку;
- гомогенізування лабораторного зразка;
- зменшення лабораторного зразка до тестового;
- підготовка та подрібнення зразка;
- екстракція аналіту;
- перевірка, інтерпретація та повідомлення результатів.

Виконання аналізу є унікальним для кожного компонента або характеристики, що аналізують, і може бути унікальним для певного виду сировини, продуктів харчування та кормів. Вибір методу багато в чому залежить від мети вимірювання. Наприклад, методи, що використовують для швидкого вимірювання в режимі онлайн, можуть бути менш точними, ніж офіційні. Методи, що називають довідковими, остаточними, офіційними чи первинними, найбільш застосовні у належно обладнаній та забезпеченій персоналом аналітичній лабораторії. За аналізу зразків всі результати залежать від отримання репрезентативного зразка та перетворення зразка у форму, яку можна проаналізувати. Відбір проб є початковою точкою для ідентифікації

зразків. Аналітичні лабораторії мають стежити за вхідними зразками та мати можливість зберігати аналітичні дані аналізів.

Щоб приймати рішення та діяти на основі результатів аналізу, який визначав склад або характеристики сировини, продуктів харчування та кормів, необхідно прийняти відповідні.

Протокол випробування

Загалом, протокол випробування має містити принаймні таку інформацію:

- 1) всю інформацію, необхідну для ідентифікації лабораторної проби;
- 2) будь-яку конкретну інформацію, що стосується лабораторної проби (наприклад, недостатній розмір, погіршений стан);
- 3) посилання на міжнародні стандарти;
- 4) заяву про дату та тип використовуваної процедури (процедур) відбору проб (наприклад, посилання на план відбору проб та метод відбору проб, що використовують лабораторія або інший орган, якщо вони мають значення для обґрунтованості чи застосування результатів);
- 5) дату отримання;
- 6) умови зберігання;
- 7) дату початку / закінчення аналізу, якщо це можливо;
- 8) особа, відповідальна за аналіз;
- 9) розмір лабораторного зразка та випробуваного зразка;
- 10) результати відповідно до вимог конкретного методу та одиниць вимірювання, які використовують для звітування про результати та калібрувальні прилади та використовуваного методу розрахунку;
- 11) будь-які конкретні спостереження, зроблені під час тестування;
- 12) будь-які відхилення, доповнення або виключення зі специфікації випробування;
- 13) інформація про одиниці;
- 14) невизначеність вимірювань та рівень довіри надають користувачеві результати за запитом.

Лабораторія несе відповідальність за всю інформацію, надану у звіті, крім випадків, коли інформацію надає замовник. Дані, надані замовником, мають бути чітко ідентифіковані. Окрім цього, у звіті зазначають застереження, коли інформацію надає замовник і може вплинути на достовірність результатів. Якщо лабораторія не відповідає за етап відбору проб (наприклад, зразок надано замовником), вона має вказати у звіті, що результати стосуються зразка, який отримали.

Будь-яка лабораторія, яка проводить неклінічні лабораторні дослідження, має забезпечити спеціальний простір для зберігання вихідних даних, документації, протоколів, зразків, а також проміжних та підсумкових звітів про закінчені дослідження. Умови зберігання (наприклад, температура, вологість) в архівах мають залежати від природи документів, зразків та проб, які зберігаються.

Окрім перевірки зразків, лабораторія виконує певні заходи, включаючи, але не обмежуючись цим, наступне: розробка, модифікація, перевірка, валідація методів та участь у перевірці кваліфікації.

4.2. Методи валідації/Т. Якімова, Д. Курчі/

Вступ

Аналітична валідація, забезпечення якості та контроль якості – це терміни, які сьогодні широко використовують випробувальні лабораторії.

Відповідно до ISO, аналітична валідація як перший рівень забезпечення якості в лабораторії – це підтвердження шляхом надання об'єктивних доказів того, що вимоги щодо конкретного цільового використання чи застосування були дотримані.

Забезпечення якості (CA) – це управління якістю, орієнтоване на забезпечення впевненості, що вимоги якості будуть дотримані.

Контроль якості (CC) – це частина управління якістю, орієнтована на задоволення вимог якості.

Лабораторії мають використовувати аналітичні методи, що відповідають тестам, які вони проводять.

Навіть якщо в лабораторії застосовують стандартизовані методи, лабораторія має переконатися, що ступінь валідації конкретного аналітичного методу відповідає необхідній меті та що лабораторія здатна відповідати будь-якому набору даних про ефективність.

Випробувальні лабораторії розробляють програму контролю якості для надання достовірності та відповідності результатам вимірювань, отриманих в лабораторії.

Визначення

Валідація– підтвердження шляхом вивчення та надання об'єктивних доказів того, що виконуються конкретні вимоги до певної мети чи конкретної програми та існує баланс між витратами, ризиками та технічними можливостями.

Кількість (характеристика) – атрибут явища, предмета чи речовини, який визначають за якістю та кількістю.

Значення кількості– значення, схоже на визначення конкретної кількості.

Вимірювання– сукупність операцій, спрямованих на визначення величини чи кількості.

Результат кількості (результат аналізу) X_i – значення кількості, отримане шляхом вимірювання.

Середньоарифметичне значення \bar{X}_i – сума результатів кількості (сума результатів аналізу), яка пов'язана з кількістю значень.

Відхилення x_i – різниця між окремими значеннями величини та середнім значенням однакових окремих значень.

Стандартне відхилення D – числове значення в одиницях значень, які досліджуються, які вимірюють тенденцію розсіювання даних.

Точність методу – допустима різниця між результатами тесту, отриманими за однакових умов дослідження. Вимірювання точності виражається повторюваністю та відтворюваністю.

Повторюваність – допустима різниця між результатами випробування, отриманими на одному і тому самому аналізованому предметі, на одному і тому самому пристрої, тим самим оператором випробування.

Відтворюваність – допустима різниця між результатами випробувань, які отримані від двох і більше лабораторій.

Правильність – допустима різниця між результатами випробування та прийнятними референтними значеннями

Точність (систематична помилка) – різниця між середнім значенням результатів, отриманих як результат випробування, та прийнятим контрольним значенням (референтний матеріал).

Референтний матеріал– матеріал або речовина з одним або декількома властивостями, достатньо чітко визначеними для калібрування пристрою, для аналітичного методу або для призначення матеріальних значень.

Інтервал аналізу – межі діапазону значень, які певною мірою враховують значення вимірюваної величини.

Довідкові документи

- **SM SR EN ISO/CEI 17025:2006.** Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.
- **ISO 5725-3: 2014 (1-6).** Точність (достовірність та точність) методів та результатів вимірювань.
- **Рішення Уряду від 06.04.2009 № 265,** яке узгоджує рішення Комісії ЄС від 14 серпня 2002 р. № 2002/657 «Про імплементацію Директиви Ради 96/23/ЄС щодо ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів».
- **Рішення Уряду від 22.06.2010 № 520** щодо узгодження деяких положень Регламенту Комісії (ЄС) від 19 грудня 2006 р. № 1881/2006. Встановлення максимальних рівнів для деяких забруднень в харчових продуктах.
- **Керівництво з використання EURACHEM.** Придатність до призначення аналітичних методів. Лабораторний посібник з перевірки методів та пов'язаних з ними тем, друге видання, 2014.
- **Рішення Уряду від 01.10.2010 № 941** щодо узгодження Регламенту Комісії ЄС від 28 березня 2007 р. № 333/2007 про встановлення методів відбору проб та аналізу для офіційного контролю вмісту свинцю, кадмію, ртуті, неорганічного олова, 3-MCPD та бензо (а) пірену в харчових продуктах.

- **EA 4/02 M:2013.** Оцінка невизначеності вимірювання при калібруванні.
- **EA 4/14:2013.** Підбір та використання довідкових матеріалів.
- **EA 4/16:2013.** Керівництво щодо вираження невизначеності в кількісному тестуванні.
- **EA-4/18:2003.** Керівництво щодо рівня та частоти участі у тестуванні кваліфікації;
- **ILAC-P9/06:2014.** Політика ILAC щодо участі в діяльності з тестування кваліфікації.

Валідація та / або перевірка методів випробувань

Лабораторії можуть використовувати як стандартизовані (національні та міжнародні), так і нестандартні методи, видані відповідними технічними організаціями та науковими виданнями, навіть ті, що містять достатню і стислу інформацію про процедуру проведення випробувань і які обов'язково валідовані для демонстрації надійності та придатності або для демонстрації, як лабораторії вдається досягти зазначених показників.

Лабораторія має підтвердити, що вона може правильно застосовувати ці методи за допомогою випробувань з визначення часу відновлення ефективності, тестів на повторюваність та відтворюваність, контрольних діаграм, оцінювання невизначеності вимірювань.

Відхилення від стандартизованих методів мають бути визначені та обґрунтовані валідацією.

Перевірка методів випробувань проводиться відповідно до річного плану перевірки.

Встановлення обсягу валідації

Обсяг валідації та / або перевірки має враховувати:

- релевантність параметрів, оцінених для передбачуваного використання;
- відповідність параметрів, оцінених для задоволення потреб клієнта (наприклад, межа виявлення з максимально допустимою концентрацією);
- характер змін, що виникають під час вдосконалення методу;
- характер відмінностей під час порівняння різних методів, різного обладнання тощо.

Валідація має бути балансом між витратами, ризиками та технічними можливостями.

Валідація має бути настільки всебічною, наскільки це необхідно для задоволення потреб, що стосуються цієї програми чи сфери застосування.

Методи, що використовуються для визначення ефективності, мають бути одними з нижчеперерахованих або їхніми комбінаціями:

- калібрування з використанням референтних стандартів або матеріалів;

- порівняння результатів, отриманих іншими методами;
- міжлабораторні порівняння;
- систематичне оцінювання чинників, що впливають на результат;
- оцінювання невизначеності результатів.

Валідація методів випробувань – це «схвалення» аналізу / матриці для певного використання для комбінації.

Перевірка охоплює три важливі сегменти:

- специфічне використання (аналітична вимога, яку слід виконати);
- об'єктивні докази (параметри продуктивності методу обчислюють статистичною обробкою даних із запланованого досвіду);
- підтвердження (чи підходить для мети методу).

Технічні умови для перевірки методу

Для того щоб бути впевненими, що дані, надані як результат перевірки, є правильними, необхідно виконати такі вимоги:

- особа, відповідальна за валідацію перевірки, має бути компетентною;
- умови навколишнього середовища мають відповідати вимогам специфікацій методу (наприклад, специфікації, що даються виробником обладнання, реактивів, спеціалізованої літератури);
- вимірювальне обладнання має бути в справному робочому стані, має бути відкалібровано перед валідацією, інтервал між двома калібруваннями встановлюється відповідно до вимог ILAC G-24, після кожного калібрування лабораторія має відновити порушені параметри (наприклад, невизначеність вимірювання);
- використовувані реагенти мають бути придатними для роботи з обладнанням, яке використовуватимуть, і повинні мати термін служби;
- довідкові матеріали, що використовуються в процесі перевірки, мають відповідати методу, який має бути затверджений (наприклад, матриця і рівень концентрації) і повинні мати невичерпний термін служби.

Засоби визначення параметрів продуктивності охоплюють:

- еталонні стандарти;
- сертифіковані довідкові матеріали;
- порожні зразки (матриці, які не містять аналіту, що цікавить);
- зразки з доданим аналітом або збагачені зразки;
- зразки з вмістом аналіту;
- статистика.

Визначення параметрів продуктивності аналітичних методів

1. Селективність / специфічність – здатність методу розрізняти аналізовану речовину, що вимірюється, та інші споріднені речовини (ізомери,

метаболіти, продукти деструкції, складові матриці тощо) або здатність методу відокремлювати сигнал, що цікавить, від інтерференції.

Специфіка – це ідеальний стан вибірковості.

Примітка. Важливо визначити найбільш ймовірні втручання та перевірити їх дію. Інтерференція може виникати тоді, коли метод відчутно реагує на інші наявні види, або іноді, коли сигнал аналізу збільшується або зменшується іншими видами.

$$SE = \frac{PC}{PC + NF} \times 100 \%$$

SE – вибірковість

PC – кількість послідовних результатів

NF – кількість суперечливих результатів

$$SP = \frac{NC}{PF + NC} \times 100 \%$$

SP – специфічність

NC – кількість суперечливих результатів

PF – кількість помилково послідовних результатів

2. Повторюваність (r) – ступінь узгодженості між результатами послідовних вимірювань однієї і тієї самої вимірюваної речовини, проведених в одних і тих самих умовах вимірювання (та сама процедура вимірювання, той самий аналітик, той самий вимірювальний прилад, що використовується за тих самих умов, те саме місце, протягом короткого періоду).

Дата	Обчислювані значення		
	a ₁	a ₂	a _{med}
14.07	0,408	0,385	0,3975
14.07	0,385	0,386	0,3855
Стандартне відхилення: S _r = 0,0084			
Стандартне відхилення:			
$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (a_i - \bar{a})^2}{n-1}} \quad r = S_r \cdot 2,77$			

3. Відтворюваність – ступінь узгодженості між результатами вимірювань однієї і тієї самої вимірюваної величини, проведених у різних умовах вимірювання (аналітик, вимірювальний прилад, що використовується в різних умовах, різних місцях, різних реагентах протягом більш тривалого періоду).

Примітка. Для отримання репрезентативної оцінки стандартного відхилення повторюваності та відтворюваності рекомендується виконати від 6 до 15 паралельних зразків.

4. Діапазон / лінійність

Діапазон методу визначає діапазон значень, до яких метод може бути застосований. Для визначення чи підходить меті необхідно оцінити діапазон та підтвердити, що він відповідає діапазону концентрації аналітичних вимог.

Для визначення діапазону спостерігається реакція / концентрація. На нижній межі діапазону концентрацій діапазон пов'язаний з межею виявлення (LOD), за якої важко бути впевненим, що будь-який сигнал, що з'являється, йде від аналіту, а не з фону, а межа кількісного визначення (LOQ), що є найнижчою концентрацією, яку можна визначити з прийнятною невизначеністю. Верхній кінець діапазону визначається концентраціями, за яких спостерігаються значні аномалії чутливості.

Між цими межами є область, в якій відповідь виявляється прямо пропорційною зміні концентрації (лінійний домен).

5. Межа виявлення (LOD) – це найменша концентрація сполуки, яку можна виявити та ідентифікувати за допомогою відповідного обладнання та методології.

LOD дорівнює: втричі більше від стандартного відхилення середнього значення порожніх визначень ($n > 20$).

Дослідження LOD застосовують перед повторним інтегральним методом, долучаючи будь-яку корекцію рядка через базову або порожню лінію:

$$LOD = 3s + \text{відповідь на порожню чи базову лінію,}$$

де s – стандартне відхилення.

6. Межа кількісного визначення (LOQ) – це найнижчий вміст аналіту, який можна проаналізувати з обґрунтованою статистичною визначеністю. Якщо і точність, і правильність є постійними для діапазону концентрацій навколо межі виявлення, то межа кількісного визначення (LOQ) чисельно дорівнює шестидесятикратному стандартному відхиленню середнього значення порожніх визначень ($n > 20$).

7. Ліміт рішення – це межа, до якої можна зробити висновок з мінімальною ймовірністю помилки, що зразок є невідповідним.

8. Стабільність / стійкість – це чутливість аналітичного методу до зміни умов експерименту, яка може бути виражена як перелік матеріалів, речовин, що підлягають аналізу, умов зберігання, навколишнього середовища та / або умов

підготовки проб, на основі яких його застосовували без змін або із зазначенням незначних змін.

Тест на стійкість – це сукупність експериментів, які дозволяють аналітику ідентифікувати експериментальні параметри, які суттєво впливають на ефективність методу. Варіації цих параметрів призводять до зміни продуктивності методу.

Важливо знати, які параметри мають вирішальне значення для продуктивності методу. Це параметри, які необхідно контролювати в звичайному застосуванні методу. Для критичних параметрів встановлюють межі контролю, щоб забезпечити бажану продуктивність методу в майбутньому.

Типовими ключовими параметрами, на які націлені у разі тесту на стійкість, є концентрація та кількість реагентів; pH; час екстракції; температура екстракції; швидкість потоку в системах хроматографії; вік хроматографічного стовпчика.

9. Відновлення – це фактичний відсоток концентрації відновленої речовини під час аналітичної процедури. Його визначають або за допомогою сертифікованого референтного матеріалу, або шляхом укріплення зразка відомою кількістю з'єднання.

$$R\% = C_d / C_{ad} \times 100 \%,$$

де C_d – визначена концентрація;

C_{ad} – додана концентрація

10. Точність – наближення до згоди між середнім значенням, отриманим для великої серії результатів випробувань, і прийнятим контрольним значенням.

11. Невизначеність вимірювання – це параметр, пов'язаний з результатом вимірювання, який характеризує розсіяння значень, які можна було б обґрунтовано віднести до вимірювання.

Стандартна невизначеність (u) – невизначеність результату вимірювання, виражена стандартним відхиленням.

Комбінована стандартна невизначеність (uc) – стандартна невизначеність результату вимірювання, коли цей результат отриманий із значень різних величин, рівних позитивному квадратному кореню суми доданків, відповідними доданками є дисперсія або коваріація цих величин, зважена відповідно до того, як результат вимірювання змінюється залежно від змін цих величин.

Розширена невизначеність (U) – величина, що визначає інтервал результату вимірювання, який, як очікується, охоплює інтервал, в якому висока частка розподілу значень може бути обґрунтовано віднесена до вимірюваної величини. Розширена невизначеність обчислюється виходячи із комбінованої стандартної невизначеності та коефіцієнта розширення.

Коефіцієнт розширення (k) – числовий коефіцієнт, який використовують як множник комбінованої стандартної невизначеності для отримання розширеної невизначеності.

Стандартна невизначеність (u_c) незалежного результату тесту, що характеризує випадкові помилки вимірювань, обчислюють за формулою:

$$u_{Ai} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2},$$

де x_i – результат другого тесту,

\bar{x} – середнє значення кількості тестів.

Об'єднану стандартну невизначеність (u_c) розраховують за формулою:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^m u_i^2} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2},$$

де u_i – вираховані невизначеності типу A і B,

m – кількість невизначеностей.

Отримання розширеної невизначеності U – останній крок складається з множення об'єднаної стандартної невизначеності на обраний коефіцієнт розширення. Розширена невизначеність необхідна для забезпечення інтервалу, за якого можна вважати, що додано велику частину дисперсії значень, що може віднести до вимірюваної величини:

$$U = k \cdot u_c$$

Представлення результатів

Розширена невизначеність визначає інтервал, протягом якого передбачається, що вимірювальна величина підпадає під певний рівень впевненості. U отримується шляхом множення $u_c(y)$, об'єднаної стандартною невизначеністю, на коефіцієнт покриття k . Вибір коефіцієнта k ґрунтується на бажаному рівні впевненості. Для 95 % рівня впевненості k дорівнює 2.

За відсутності інших вимог результат випробування y має бути зазначений разом із розширеною невизначеністю U, обчислений з використанням коефіцієнта розширення $k = 2$ (який має рівень впевненості близько 95 %). Рекомендується таке представлення:

$$y = x \pm U \text{ (UNITS)}$$

Вибір параметрів продуктивності

Критерії валідації диференціюються відповідно до рівня дії, яку застосовують для кожної групи залишків.

Щодо забруднювачів існує низка посібників та конкретних законодавчих специфікацій щодо валідації чи вимог до експлуатаційних характеристик, таких як Розпорядження 333/2007 для важких металів (Pb, Cd, Hg, неорганічний Sn),

Розпорядження 401/2006 про мікотоксин, Розпорядження 1883/2006 для діоксинів, діоксиноподібних ПХД, Розпорядження 396/2005 – процедури встановлення керівництва з технічної валідації.

Щодо залишків ветеринарних лікарських засобів застосовується рішення Комісії 657/2002.

Щодо мікробіологічних критеріїв, застосовується Постанова Уряду від 16.03.2009№ 221.

Параметри ефективності, як правило, мають враховувати тип використовуюваного аналітичного методу (скринінг / підтвердження, якісний / кількісний). Аналітик, відповідальний за валідацію методу, готує Звіт про валідацію, що встановлює аналітичні вимоги та параметри продуктивності, які експериментуватимуть. Дані, отримані як результат експериментів для встановлення параметрів продуктивності методу, інтерпретуються для визначення, чи підходить метод для передбачуваного використання з урахуванням лімітів продуктивності, встановлених робочими стандартами, рівнянням Горвіца або положеннями Розпорядження щодо ефективності методів тестування та інтерпретації результатів.

Перегляд звіту про перевірку методів проводиться, коли відбуваються значні зміни (зміна обладнання, заміна відповідального аналітика, розширення сфери застосування методу тощо).

Перегляд звіту про валідацію методів проводиться, коли відбуваються значні зміни (зміна обладнання, заміна відповідального аналітика, розширення сфери застосування методу тощо).

4.2.1. Використання кваліфікаційних досліджень та інших міжлабораторних порівнянь у процесі акредитації

Кваліфікаційні дослідження / міжлабораторні порівняння – це один із найнадійніших та ефективних механізмів доведення кваліфікації лабораторії / інспекційного органу (де проводяться тестування, які безпосередньо впливають та визначають результат перевірки, доступні та обґрунтовані або коли цього вимагає закон чи органи влади).

Участь у схемах КД надає інформацію про ефективність системи вимірювань / активності (обладнання, метод, персонал тощо) та показує аспекти системи управління (аналіз запитів, прийняття та підготовка зразків, обробка даних, звітування про результати тощо), що представляє адекватність управління ризиками та виявляє потреби в навчанні персоналу лабораторії / інспекційного органу.

4.2.2. Вибір і використання референтних матеріалів

Референтні матеріали є важливим інструментом для досягнення ряду аспектів якості вимірювань і використовуються для перевірки методів, калібрування, оцінювання невизначеності вимірювань, навчання, а також для внутрішнього та зовнішнього контролю якості.

Типи референтних матеріалів

РМ використовують для підтримки вимірювань, пов'язаних з хімічним складом, біологічними, клінічними, фізичними, інженерними властивостями та іншими особливостями, такими як смак і запах. Вони можуть характеризуватися «ідентичністю» (наприклад, хімічною будовою, типом волокна, мікробіологічними видами тощо) або «значеннями властивостей» (наприклад, кількістю речовини зазначеного хімічного утворення, твердістю тощо). Деякі з найпоширеніших видів референтних матеріалів:

1. Чисті речовини, що характеризуються хімічною чистотою та / або слідами домішок.

2. Стандартні розчини та газові суміші, які часто готуються гравіметричним методом із чистих речовин та використовуються для калібрування.

3. Матричні референтні матеріали, що характеризуються за складом основних, другорядних або мікроелементів хімічних компонентів. Ці матеріали можна приготувати з матриць, що містять цікаві компоненти, або за допомогою синтетичних сумішей.

4. Фізико-хімічні довідкові матеріали, що характеризуються такими властивостями, як температура плавлення, в'язкість та оптична щільність.

5. Референтні предмети або артефакти, що характеризуються такими функціональними властивостями, як смак, запах, октанове число, температура спалаху та твердість. До цього типу належать також мікроскопічні види, що характеризуються властивостями, які різняться від типу волокна до мікробіологічних видів.

Класифікація референтних матеріалів

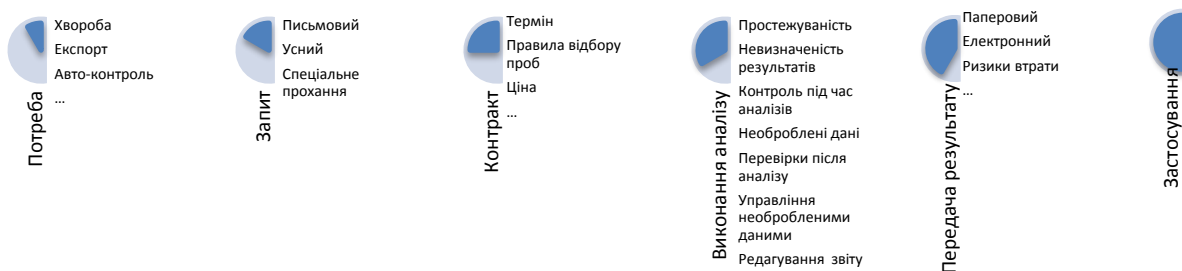
Два класи референтних матеріалів визнані ISO, «сертифіковані довідкові матеріали» (CRM) та «референтні матеріали» (RM).

За визначенням, CRM мають бути простежуваними до точної реалізації одиниці, в якій виражаються значення властивостей. Кожне значення властивостей має супроводжуватися невизначеністю за заявленого рівня впевненості.

RM – це матеріали, значення властивостей яких є досить однорідними та добре встановленими, щоб їх можна було використати під час калібрування вимірювального приладу, оцінювання методу вимірювання або визначенні матеріальних значень.

4.3. Результати аналізу/Р. Жерар/

Вступ



4.3.1. Простежуваність

Простежуваність означає управління документами, написаними вручну або / та в електронному вигляді, що готуються під час аналізу.

Мета простежуваності – дозволити контролювати різні фази аналізу, перевіряти, чи правильно виконують всі ці фази, і дозволяти валідацію апостеріорних результатів аналізу. Відстежуваність має дозволяти стежити за цілісністю аналізу, включаючи помилки, що виникають внаслідок деяких операцій (помилки розрахунку, збої в роботі обладнання тощо).

Існують різні засоби, що дозволяють здійснити відстеження:

Простежуваність на папері: Збір документів, виготовлених на різних етапах (картки, пов'язані з відбором проб, такими як зберігання / зменшення запасів перед аналізом, підготовка зразків, підготовка реагентів, витратних матеріалів, обладнання тощо). Ці документи фізично потрапляють у досьє під час аналізу.

Такі документи слід подавати, щоб дозволити:

- Легке читання: документи мають бути читабельними. Стирання, якщо вони немінучі, також мають бути читабельними, наприклад: стирання прийнятне *erasure* – стирання неприпустиме **█**.

Слід виключити засоби написання текстів, які можна стерти.

Переваги: Доступність вчасного застосування, оскільки для цього не потрібне спеціальне програмне забезпечення.

Недоліки: Об'ємне зберігання, може псуватися, менш екологічне.

Цифрова простежуваність: Цифрова простежуваність може приймати різні форми, такі як файли з текстами, таблиці Excel, відео- та звукові файли. Сьогодні місце використання інформаційних систем, таких як ноутбуки, планшети, дозволяє вставляти інформацію під час аналізу.

Переваги: Різні засоби відповідно до бажаного типу збереження.

Недоліки: Читання файлів стає менш простим через еволюцію програмного забезпечення. Втрата даних через «перезапис» даних (стираємо і переписуємо).

4.3.2. Невизначеність результатів

Кожне вимірювання результату затьмарюється однією «помилкою», яка є сумою систематичних та випадкових неточностей. Ці невизначеності має визначати та розраховувати лабораторія.

Приклад невизначеностей, що трапляються під час аналізу:

- однорідність зразків;
- реагенти;
- обладнання;
- персонал;
- тощо.

Переваги: «Межі» аналізу відомі.

Недоліки: Розрахунок часу та вартості невизначеностей, плутанина для певних клієнтів, якщо такі невизначеності містяться у звіті про аналіз.

NB: Розрахунок невизначеностей – довга робота, яку провела лабораторна команда. Тут неможливо перерахувати всі дії, необхідні для цього процесу, але слід пам'ятати мінімум знань, необхідних для запуску розрахунку.

Математика та конкретніша статистика

- Знання Excel.
- Дослідження та реалізація плану розрахунку, взятого з наукової літератури та / або національних та міжнародних норм, спеціально пов'язаних із робочою сферою (наприклад: хімія, метрологія тощо).
- У певних випадках використання конкретних інформаційних засобів.

4.3.3. Контроль під час аналізу

Аналізи, які ми проводимо, мають важливий вплив на клієнта, який їх замовив. Результат аналізу може підтвердити або спростувати серйозне захворювання, коли лікування може бути важким (рак, діабет тощо) для людини, а інші результати можуть вплинути на виробничий настрій, може впасти підозра на серйозне забруднення (важкі метали, радіонукліди тощо). З усіх цих причин під час аналізу слід застосовувати якомога жорсткіший контроль: внутрішній контроль та зовнішній контроль, якщо вони існують.

Внутрішній контроль матиме різні аспекти, такі як зразки, добровільно забруднені та додані на початку аналізу або під час різних фаз, діапазони відбору проб для хімічного аналізу. Аналізи проводять по два паралельно, щоб згладити

проблеми однорідності зразків, які не може контролювати технік у випадках складних матриць (м'язи, живі органи, нирки тощо).

Переваги: Результати серії аналізів «гарантовані» внутрішнім контролем. Надмірні витрати зменшуються за рахунок великих серій проб.

Недоліки: Зростання витрат у випадку невеликої кількості. Час, необхідний для аналізу, збільшується.

Зовнішній контроль застосовують до зразків, де забруднення даються із відповідною невизначеністю. Ці сертифіковані довідкові матеріали продають з визначеними результатами забруднення, сам результат подають із деякою кількістю невизначеності.

Переваги: Результати гарантовані та підтверджені використанням сертифікованих довідкових матеріалів.

Недоліки: Іноді вартість довідкових матеріалів висока.

4.3.4. Необроблені дані

Дані представляють всі дані, отримані під час аналізу перед їх обробкою. Ці дані можуть бути записані вручну, можуть мати форму карток, можуть бути записані в робочу книжку, яку заповнюють під час аналізу, представлені у вигляді графіків або цифрових документів. Ці дані будуть оброблені (розраховані, інтерпретовані тощо), щоб дозволити публікацію результатів аналізу.

Зразки необроблених даних:

- кількість зразків, відібраних для аналізу;
- виготовлення стандартних розчинів (у разі хімічного аналізу);
- графіки, виготовлені обладнанням або операторами;
- тощо.

Ці дані мають залишатися читабельними; розрахунки та обробка цих даних мають бути поясненими та простежуваними.

Переваги: Неопрацьовані дані мають давати можливість перевірити аналіз або навіть переробити його теоретично за допомогою цих даних.

Недоліки: Зберігання об'ємне, крихке. Потрібне управління архівами.

4.3.5. Контроль після аналізу

Перш ніж редагувати звіт про аналіз, контроль має проводити компетентна особа, яка критично бачить результат. Цей контроль має гарантувати, що аналіз проводився у належних умовах. Цей контроль має дозволити отримати інший погляд на аналіз та можливі створення та відстеження е-картки.

Ці засоби контролю стосуються головним чином такого:

- розрахунки та ризики помилок, пов'язаних з об'єднаннями;
- картки невідповідності, причини невідповідностей та їх усунення;

- повторна транскрипція величин, надана обладнанням;
- проведення планування технічного обслуговування та метрологічного контролю.

Переваги: Первинні дані мають дозволяти перевірити аналіз або навіть повторити його теоретично, використовуючи їх.

Недоліки: Зберігання об'ємне, крихке.

4.3.6. Редагування звіту про аналіз

Звіт про аналіз має бути підготовлений після проведення всіх перевірок. Однак знову ж таки слід вживати всіх заходів обережності, щоб уникнути помилок. Можна уявити, який вплив може мати неправильний результат на канцерологію, діабетологію тощо.

Звіт про аналіз має відповідати національним законодавчим вимогам щодо очевидності, юридичної інформації, а також вимогам національних органів з акредитації.

Процедури перевірки мають бути написані та застосовуватися для мінімізації ризику помилок транскрипції.

Переваги: «Безпечні» результати для замовника.

Недоліки: Більший час доставки результату.

4.4. Отримані результати та їх узгодженість. Якість аналітичних результатів

Загальні аспекти забезпечення якості висвітлюють в ISO/IEC 17025. Метою будь-якої регульованої лабораторії є надання надійних та достовірних даних, що відповідають призначенню. Аналітики використовують перевірені методи, тести на придатність системи та перевірки контролю якості в процесі, щоб переконатися, що отримані дані є надійними, а також існують конкретні вказівки та процедури для забезпечення відповідності. Коли методи перевірено та продемонстровано, що вони придатні для однієї матриці, ці методи не слід застосовувати до подібних або інших матриць до встановлення відповідності цілі в цих додаткових матрицях. Результати з усіх порцій випробувань мають бути узгодженими. Якщо принаймні одна частина тесту дає позитивний результат, а принаймні одна – негативний результат, аналіз слід повторити.

Якість– реалізація конкретних вимог (які охоплюють стандарти, встановлені системою контролю якості на додання до прийнятих внутрішніх вимог).

Аналітична якість– узгодженість отриманих результатів з прийнятими припущеннями. Якість інформації можна розділити на компоненти: якість результатів, якість процесу, якість інструментів та якість роботи та організації.

Контроль якості– складна система дій для отримання вимірювань (результатів визначення) з необхідним рівнем якості.

Програма контролю якості містить:

- забезпечення належного рівня кваліфікації персоналу;
- забезпечення належного калібрування приладів та лабораторного обладнання;
- належну лабораторну практику (GLP);
- стандартних процедур.

Лабораторія має контролювати свою ефективність, порівнюючи результати інших лабораторій, де це можливо та доречно. Цей моніторинг мають планувати та переглядати, враховуючи наступне: участь у перевірці кваліфікації, участь у міжлабораторних порівняннях, крім перевірки кваліфікації.

4.5. Обговорення з клієнтом/Р. Жерар/

Типи клієнтів

Можна виокремити три категорії стосунків з клієнтом. Ці категорії є результатом способу сприйняття постачальником(надавачем послуг) своїх клієнтів та поводження з ними.

Клієнт – король: Вважається неправильним, якщо не задовольняються абсолютно всі вимоги клієнта. Причини такого ставлення постачальника (надавача послуг) можуть бути різними (внутрішні догми, фінансові тощо). Лабораторія, що діє таким чином, робить подвійну помилку: по-перше, вона не дозволяє клієнтові уточнити, чого саме він прагне, і отже, невідомо, чи роблять саме те, що бажає клієнт, і тому робота може бути або занадто виснажливою, або недостатньою. Друга помилка: постачальник стає «рабом» свого клієнта, він робить все можливе, щоб задовольнити клієнта, тому надалі цей клієнт вимагатиме нижчої ціни і нарешті залишить постачальника для пошуку когось «менш дорогого».

Клієнт – партнер: З цим клієнтом постачальник побудував відносини довіри, дозволяючи йому уточнити свій попит, свої чіткі потреби на короткий та середній термін, щоб бути впевненим, що попит відповідає процедурі, яка є необхідною та достатньою для клієнта. Ціна відповідає попиту та наданій послугі, узгоджується обома частинами (постачальником та клієнтом). Завдяки правильно проведеним переговорам обидві сторони задоволені результатом

Клієнт – в'язень: хто не відчув цього, спілкуючись з деякими постачальниками по Інтернету чи телефоном? На початку розмови ціна низька, і вона зростає, коли клієнт погоджується. Якщо він запитує якихось пояснень, відповіді чітко не даються, сформульовані вимоги залишаються без відповіді.

Якщо клієнт просить про додаткові послуги, він має заплатити високу ціну. Послуги, запропоновані постачальником, надаються без попередньої домовленості клієнта та виставляються за високою ціною. Врешті-решт, клієнт поїде до іншої лабораторії, навіть, якщо ціни там трохи дорожчі.

Для ефективного спілкування запит клієнта має бути таким.

Чітко: Що йому потрібно? За який термін? На яке число? Чи збігається його запит із методами, що застосовуються в лабораторії? Чи будуть результати відповідати чинним нормативним чи регламентованим вимогам? Чіткість має визначатися у співпраці з лабораторією. Фінансову частину розглядатимуть тими самим чіткими методами.

Записано: Відстежуваність вимог має зберігати лабораторія. Ці дані можуть бути передані за необхідності.

«Проблеми», які можуть виникнути щодо довіри результатам, виданим під час аналізу, мають бути роз'яснені клієнту, а також їхній вплив на результат. Таке спілкування з клієнтом має відбуватися одразу без зволікань.

Результат та його висновок: Результати мають бути чіткими, без можливості виникнення помилки в їх розумінні. З іншого боку, аналіз результату має проводити фахівець, який не є членом лабораторії або, принаймні, аналітичного блоку, щоб уникнути «упередженості».

4.6. Етика в лабораторії/Н. Арчвадзе, Е. Черкешія/

4.6.1. Загальні твердження

Дотримання етичних принципів у лабораторії має на меті забезпечити врахування та керування співробітниками лабораторії різноманітними потенційними ризиками та етичними конфліктами під час розробки та проведення заходів з повагою до людей, на основі доброзичливості та справедливості.

Перш ніж виконувати будь-яку діяльність у лабораторії, персонал лабораторії має ознайомитися з конкретними правилами своєї лабораторії / дослідницького підрозділу / установи та чинними державними / національними / міжнародними нормами.

Зазвичай етичні кодекси, серед усього іншого, підтримують «політику недискримінації», яка передбачає відсутність дискримінації осіб, що беруть будь-яку участь у лабораторній діяльності, за расою, кольору шкіри, статі, етнічної приналежності, національного походження, релігії, сімейного стану, вагітності, інвалідності, гендерної ідентичності, сексуальної орієнтації, генетичної інформації тощо.

Етичні правила та принципи, яких слід дотримуватися, залежать від специфіки роботи / дослідження, проведеного в лабораторії, хоча належна лабораторна практика означає, що лабораторія повідомляє лише вибірккові результати, які відповідають усім критеріям відповідності та належним чином кваліфікують всі результати, які не відповідають жодному з цих критеріїв. У зв'язку з цим лабораторіям пропонується розробити етичну політику та додати її до керівництва із забезпечення якості лабораторії. Лабораторні аналітики

мають пройти навчання з етики. Також слід розробити та широко застосовувати на практиці програму виявлення та стримування шахрайства (наприклад, методи перевірки та валідації даних).

Лабораторне шахрайство, як правило, пов'язане із розумінням шкоди, визначається як «навмисна фальсифікація під час звітності про результати аналітичних досліджень та забезпечення якості, що призвели до невдачі методу та контрактних вимог, але їх видають такими, що відповідають вимогам» (2006). Найбільш уразливими згідно з EPA OIG (2006) є: цензура інформації на основі обмежень звітності; маніпулювання даними; недотримання СОП / довідкових методів; фальсифікація існуючих даних; неправильне калібрування; перезапис файлів: ліміт максимального навантаження; непідходяща підготовка; неналежний процес збору зразків; неповне ведення діловодства; неправильно маркований зразок; відсутність демонстрації компетентності; відсутність вимог до збирача даних; дані звітності для зразків, які не аналізували (суха лабораторія); цілісність зразка невідома; вибіркоче використання даних контролю якості; аналіз послідовності; додавання зразків після підготовки проб; подорожі в часі (викривлення).

Похибка під час вимірювання має враховувати видалення / додавання, маніпулювання або безпосередню підробку даних. Причини цієї похибки, як правило, діляться на три категорії: уникання «поганого» вигляду для вищого керівництва; уникнення фінансових стягнень або просто догодити клієнту. Щоб уникнути цього, слід пам'ятати, що наслідки шахрайства можуть бути набагато гіршими, ніж «розрахована» «вигода», і що «втрачену репутацію» неможливо просто відновити.

З огляду на вищезазначене, обов'язки працівників лабораторії мають охоплювати: дотримання етичної політики та практики, що демонструються у щоденній поведінці; пошук адекватної оцінки, коли правильний курс дій незрозумілий або невизначений; залишатися в курсі ситуацій, які можуть призвести до неналежних, незаконних дій чи прямого порушення етичної практики; повідомлення про будь-які порушення етичної політики та практики.

Різні лабораторні опитування та відгуки співробітників щодо етики надихнули такі коментарі щодо етичної поведінки в лабораторії (цитовані з «Захист і етика в лабораторії» Джо ЕннБойд, Забезпечення якості, хімія та хімічна інженерія, Південно-Західний науково-дослідний інститут, 6220, Кулебра, Сан-Антоніо, Техас 78016, США):

- Переконайтеся, що рішення, які ви приймаєте, є рішеннями, які дозволять вам спати вночі та почувати себе добре.
- Пам'ятайте про репутацію організації, яку ви представляєте, і їх бізнес безпосередньо залежить від вас та задоволення клієнтів.

Одним з найважливіших питань лабораторної роботи є **захист** даних, що, за суттю, забезпечується документальними підтвердженнями від першого до

останнього кроку процесу. Документація має бути достатньо повною та детальною, щоб зовнішні аналітики та лабораторії могли повторно аналізувати дані, якщо це необхідно, та отримувати відтворювані дані, дотримуючись оригінальних процесів та тих самих задокументованих кроків. Процес аналітичного тестування та документація має гарантувати, що навіть тести, які виконуються неправильно, документуються і є докази належних коригуючих дій. Усі ці зусилля необхідні для надання клієнту юридично захищених даних та забезпечення впевненості в тому, що лабораторія виконала роботу якісно.

4.6.2. Етика під час роботи з тваринами

Численні види тварин використовують для наукових досліджень під час випробування ліків і навчання в галузі біомедичних наук та сільського господарства, а також у ветеринарних лабораторіях для розуміння основних біологічних процесів й поліпшення якості життя людини та тварин.

Розуміючи вагу проблем, було створено численні протоколи та рекомендації. Одним із прикладів є публікація Ради міжнародних організацій медичної науки або CIOMS під назвою «Міжнародні керівні принципи біомедичних досліджень, що стосуються тварин» (1985).

Етичні настанови сприяли точності результатів та багатьом розробкам у різних аспектах лабораторної науки про тварин, таких як:

- розробка різних моделей тварин для захворювань людини;
- розвиток генної інженерії для виробництва трансгенних тварин для боротьби з різними захворюваннями людини, за яких жодну модель тварин ніколи не використовували успішно.
- кращий догляд та управління тваринами, зменшення ступеня страждань тварин, вдосконалення методів, що використовують в експериментах на тваринах.
- пошук альтернатив для заміни або зменшення кількості тварин, що використовують (комп'ютерне моделювання, математичне застосування та біологічні системи *in vitro* виявилися успішними до певної міри, але вони не можуть бути узагальненими).

Відповідно до керівних принципів, розроблених Американською психологічною асоціацією (APA), дослідники, які працюють з тваринами, які не стосуються людини, мають вести свою діяльність відповідно до чинного федерального, штатного та місцевого законодавства і нормативних актів, інституційної політики, а також з міжнародними конвенціями (Розділ 8.09 Етичних принципів психологів та Кодексу поведінки (APA, 2010)).

Етичні принципи та керівні принципи використання тварин підкреслюють цінність життя тварин та встановлюють найкращі практики використання моделей тварин. Питання, які слід розглянути, є використання мінімальної кількості тварин за досягнення точності дослідження; належне використання

диких тварин, щоб не порушувати закони чи політику щодо збереження дикої природи; визначення тварин як живих істот, які містять керівні принципи щодо транспортування тварин, середовища в приміщенні для тварин, догляду за тваринами, управління ними, техніки та записів в експериментах на тваринах.

Література

1. American Psychological Association. (2010). Ethical principles of psychologists and code of conduct (2002, Amended June 1, 2010). Retrieved September 19, 2011. URL : <http://www.apa.org/ethics/code/index.aspx>.
2. American Veterinary Medical Association (2007) AVMA Guidelines on Euthanasia. Retrieved April 8, 2010. URL : http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf.
3. Animal Welfare Act 7 U.S.C. § 2131 et seq. Retrieved April 8, 2010. URL : http://awic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=3&tax_level=3&tax_subject=182&topic_id=1118&level3_id=6735.
4. National Institutes of Health Office of Laboratory Animal Welfare (2002). Public Health Service policy on the humane care and use of laboratory animals. Bethesda, MD: NIH. Retrieved September 27, 2011. URL : <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>.
5. National Research Council (2006). *Guidelines for the humane transportation of research animals*. Washington, DC: The National Academies Press.
6. U. S. Department of Agriculture (1989) Animal welfare; Final Rules. *Federal Register*, 54(168), (Aug 31, 1989), 36112-36163.
7. U. S. Department of Agriculture (1990) Guinea pigs, hamsters, and rabbits; Final Rule. *Federal Register*, 55(136), (July 16, 1990), 28879-28884.
8. U. S. Department of Agriculture (1991) Animal welfare; Standards; Part 3, Final Rule. *Federal Register*, 55(32), (Feb 15, 1991), 6426-6505.
9. Dess, N. K. & Foltin, R. W. (2004). The ethics cascade. In C. K. Akins, S. Panicker, & C. L. Cunningham (Eds.). *Laboratory animals in research and teaching: Ethics, care, and methods*. (pp 31-39). Washington, DC: APA.
10. National Research Council (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. (8th Edition). Washington, DC: The National Academies Press.

4.6.3. Етика під час роботи з людьми

Дослідження, що проводять на людях, слід відрізнити від медичної практики та інших форм охорони здоров'я, які покликані безпосередньо сприяти здоров'ю людей чи громад.

Дослідження за участю людей містять:

- дослідження фізіологічного, біохімічного або патологічного процесу або реакції на конкретне втручання у здорових суб'єктів чи пацієнтів;

- контрольовані випробування діагностичних, профілактичних або терапевтичних заходів у більших груп людей, призначені для демонстрації конкретної узагальнюючої реакції на ці заходи на тлі індивідуальних біологічних змін;

- дослідження, призначені для визначення закономірностей конкретних профілактичних чи терапевтичних заходів для окремих людей та громад;

- дослідження щодо поведінки / реакцій, пов'язаних зі здоров'ям людини, в різних обставинах та середовищах.

Пацієнти, медичні працівники, дослідники, фармацевтичні компанії та інші покладаються на результати лабораторних досліджень, що впливають на здоров'я і добробут людини та громади. Отже, вони мають забезпечити, щоб дослідження були науково обґрунтованими, спиралися на адекватну базу попередніх знань і, ймовірно, несли цінну інформацію. Дослідження, в яких беруть участь люди, можуть застосовувати або спостереження, або фізичне, хімічне чи психологічне втручання; воно також може створювати записи / використовувати наявні дані, що містять біомедичну або іншу інформацію про осіб, котрі можуть або не можуть бути ідентифіковані із записів чи інформації. Використання таких записів та захист конфіденційності даних, отриманих з цих записів, обговорюють у Міжнародних настановах з етичного огляду епідеміологічних досліджень (CIOMS, 1991) та Міжнародних етичних вказівках для досліджень, пов'язаних із охороною здоров'я (CIOMS, 2016).

Дослідження, які пов'язані з людьми, мають проводити тасувано контролювати лише кваліфіковані та досвідчені особи, відповідно до протоколу, який чітко визначає: мету дослідження; причини залучення суб'єктів-людей; характер та ступінь відомих ризиків для суб'єктів; джерела набору суб'єктів; а також запропоновані засоби для забезпечення належної поінформованості та добровільності згоди суб'єктів.

Нові вакцини та лікарські препарати, перш ніж бути затвердженими для загального використання, мають бути протестовані на людях у клінічних випробуваннях; такі випробування становлять значну частину всіх досліджень, що стосуються людей.

Дослідження за участю людей (зокрема ідентифіковані людські тканини або дані) можуть бути етично виправданими лише у тому випадку, якщо їх проводять відповідно до трьох основних етичних принципів, а саме: повагою до людей, добродійністю та справедливістю.

- Повага до людей охоплює принаймні два основні етичні міркування, а саме: а) повагу до свободи та б) захист осіб з обмеженою свободою.

- Добродійність стосується етичного зобов'язання максимізувати вигоду та мінімізувати шкоду.

- Справедливість стосується етичного обов'язку поводитися з кожною людиною відповідно до того, що є морально правильним і належним, надавати кожній людині належне їй.

Керівні принципи спрямовані на застосування цих принципів до лабораторних досліджень / досліджень із залученням людей. Відповідно до керівних принципів, співробітники лабораторій та спонсори досліджень мають забезпечити відповідність пропонованих досліджень за участю людей загальноновизнаним етичним принципам та ґрунтуватися на належних знаннях з відповідної наукової літератури. Ці міркування мають бути відображені в протоколі дослідження. Протокол має бути науково та етично оцінений одним або кількома відповідними органами, незалежними від оглядових органів дослідницької групи в країні спонсорської організації (Міжнародні етичні рекомендації з досліджень, пов'язаних зі здоров'ям, CIOMS, 2016, Керівні принципи 1 та 23).

Для всіх досліджень за участю людей перед поданням клопотання про участь у дослідженні слід надати спеціальну інформацію мовою / іншої формі спілкування, яку людина може зрозуміти, та отримати добровільну інформовану згоду потенційного суб'єкта. Якщо особа не здатна дати інформовану згоду, дослідження потребує дозволу законно уповноваженого представника відповідно до керівних принципів та чинного законодавства. Відмова від інформованої згоди слід розглядати як незвичайну та виняткову ситуацію, і у всіх випадках її має схвалити комісія з етичного контролю (CIOMS, 2016, Рекомендації 9,10). Настанови визначають обов'язки дослідників лабораторії, оцінку потенційних вигод та ризиків, зокрема мінімізацію ризиків у випадках, коли є етичне та наукове обґрунтування для проведення досліджень з особами, не здатними дати інформовану згоду (CIOMS, 2016, Керівні принципи 4,16) та відшкодування втраченого заробітку, витрат на відрядження та інших витрат, понесених під час участі у дослідженні, включаючи також безкоштовні медичні послуги. Під час проведення всіх досліджень із залученням людей дослідник має забезпечити рівномірний розподіл обтяжень та вигод, обґрунтовану збалансованість та мінімізацію ризиків (CIOMS, 2016, Рекомендації 3,4, 13).

Існують спеціальні питання для дослідження з-поміж населення та громад з обмеженими ресурсами, досліджень за участю дітей, жінок (зокрема вагітних та годуючих груддю), вразливих осіб, що обговорюються в керівних принципах (CIOMS, 2016, Рекомендації 18, 19). Перш ніж проводити дослідження серед населення з обмеженими ресурсами, дослідник має переконатися, що всі процедури відповідають потребам охорони здоров'я та пріоритетам населення або громади, в якій його мають проводити (CIOMS, 2016, Керівництво 2). Для участі дітей потрібен дозвіл батьків чи законного представника, а також згода та обґрунтування того, що дослідження може бути не однаково добре проведене серед дорослих. Спеціальне обґрунтування потрібно також щодо залучення вразливих осіб, і, якщо їх обрано, то засоби захисту їх прав та добробуту мають суворо застосовуватися (CIOMS, 2016, Рекомендації 15,17).

Як правило, досліджувані в контрольній групі випробувань діагностичного, терапевтичного або профілактичного втручання мають отримувати встановлене

ефективне втручання. За деяких обставин може бути етично прийнятним використання альтернативного препарату для порівняння, такого як плацебо або «відсутність лікування» (Настанова 5: Вибір контролю в клінічних випробуваннях).

Плацебо можна використовувати:

1. коли не встановлено ефективного втручання;
2. втручання піддаватиме суб'єктів тимчасовому дискомфорту або затримці полегшення симптомів;
3. коли використання встановленого ефективного втручання як альтернативного препарату не дасть науково надійних результатів, а використання плацебо не додасть жодного ризику серйозної шкоди для суб'єктів.

Слід встановити безпечні гарантії конфіденційності цих суб'єктів дослідження. Суб'єктам слід повідомляти про обмеження, закони захисту конфіденційності та можливих наслідків порушення конфіденційності. Дослідники мають забезпечити, щоб суб'єкти дослідження, які зазнали травм внаслідок їх участі, мали право на безкоштовне медичне лікування та фінансову / іншу допомогу, щоб компенсувати їм будь-які наслідки погіршення стану, інвалідності чи фізичних недоліків (CIOMS, 2016, Рекомендації 12,14).

Дослідження, що містять біологічні матеріали людини (тканини, органи, кров, ДНК, РНК, білки тощо), можуть бути зібрані / збережені для певних (дослідницьких, медичних чи діагностичних) цілей, а також використані в майбутньому. У настановах термін «біобанк» використовують для збору збережених біологічних матеріалів та пов'язаних даних.

Особа, чиї біологічні матеріали та відповідні дані використовують у дослідженнях, є учасником дослідження, і застосовують ті самі етичні вказівки. Оскільки точний характер майбутніх досліджень, як правило, невідомий, і неможливо отримати конкретну інформовану згоду під час збору матеріалів, широка інформована згода є прийнятною альтернативою конкретній інформованій згоді.

Настанови регулюють правила зберігання, використання та остаточну частку біологічних матеріалів, а також з якими іншими джерелами персональної інформації можуть бути пов'язані результати аналізів (CIOMS, 2016, Рекомендації 11).

Багато країн не мають можливості оцінювати / забезпечувати наукову якість / етичну прийнятність досліджень, що стосуються людей, які проводять під їхньою юрисдикцією. У рамках спільних досліджень, що фінансуються зовні, спонсори та дослідники мають етичний обов'язок забезпечити, щоб науково-дослідні проекти, за які вони відповідають, ефективно сприяли національному або місцевому потенціалу у розробці та проведенні біомедичних досліджень, а також забезпечували науково-етичний огляд та моніторинг таких досліджень.

Література

1. Міжнародні етичні вказівки щодо досліджень, пов'язаних із охороною здоров'я, за участю людей. Рада з міжнародних організацій медичних наук (CIOMS) у співпраці зі Світовою організацією охорони здоров'я (BOOЗ). CIOMS, 2016.

4.6.4. Лабораторна безпека та лабораторна етика

Виконання та контроль за нормами та законами техніки безпеки в науково-діагностичних лабораторіях є відповідальністю всіх працівників і невід'ємною частиною планування, підготовки та здійснення будь-якої лабораторної діяльності. Цей контроль складається, але не обмежується ними, політикою, настановами, вимогами до навчання, стандартними операційними процедурами, засобами індивідуального захисту та лабораторними аудитами. Усі співробітники лабораторії та студенти, які відвідують тренінги в лабораторії, є обов'язковими для ознайомлення з процедурами безпеки та обмеженнями, визначеними в детальних лабораторних посібниках з безпеки (GLSM) щодо безпечного поводження з небезпечними матеріалами та іншими загальними лабораторними небезпеками. GLSM описує мінімальний рівень безпечної практики, який очікується від усіх осіб, які беруть участь у лабораторній діяльності.

У 1990 році OSHA видала стандарт «Професійний вплив небезпечних хімічних речовин у лабораторіях» (29 CFR 1910.1450). Стандарт OSHA, щодо патогенних речовин в крові (BBP) (29 CFR 1910.1030), призначений для захисту працівників від небезпеки для здоров'я від впливу патогенних мікроорганізмів, що передаються через кров. Оскільки працівники лабораторій можуть зазнавати різноманітних небезпек на роботі, інші стандарти OSHA передбачають процедури, як запобігти або зменшити вплив деяких найпоширеніших небезпечних хімічних речовин: Стандарт особистого захисного обладнання (313) (29 CFR 1910.132), Стандарт захисту рук (29 CFR 1910.138), Стандарт ведення діловодства (29 CFR 1904) тощо. Центри контролю та профілактики захворювань США (CDC) спільно з Національним інститутом охорони здоров'я (NIH) опублікували посібник з біобезпеки в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях (5th Ed., 2009), який став кодексом практики з біобезпеки та авторитетним довідником для оцінювання ризику в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях.

Загальні принципи лабораторної безпеки, визначені стандартами та вказівками, розглядають як універсальні, і їх слід читати як єдине ціле, оскільки вони мають перехресні посилання один на одного. Ці документи можуть бути використані окремим дослідником або лабораторіями для виявлення або розпізнавання небезпек та оцінювання ризиків і для складання плану мінімізації / управління ризиками до початку роботи.

Загальними принципами безпечної лабораторної практики є:

1. Знання матеріалів:

а) мінімізувати всі дії хімічних речовин;

б) підходити до всіх хімічних речовин як до небезпечних та дотримуватися обережності;

в) уникати недооцінки ризику;

г) дотримуватися гранично допустимих значень).

2. Дотримуйтеся безпечних практик та використовуйте стандартні операційні процедури (SOP).

3. Знання надзвичайних ситуацій та розташування засобів безпеки.

Стратегії оцінювання стану безпеки лабораторії містяться в посібниках з безпеки та передбачають управління і контроль різних лабораторних систем за допомогою контрольних списків лабораторної безпеки:

- індивідуальний захист (ЗІЗ), лабораторне обладнання (втяжки, прилади, вентиляція, захист від води, температура тощо) та технічна безпека;

- адміністративна безпека (СОП, процедурний контроль, доступ до лабораторій, проектування та будівництво лабораторії, норми вентиляції, обстеження району та охорона лабораторії);

- біологічна безпека (рівні біологічної безпеки, культури тканин та лінії клатин, паспорти безпеки щодо інфекційних речовин, знезараження, безпека приміщень, транспортування біологічних матеріалів);

- хімічна безпека (загальні хімічні процедури та моніторинг впливу, розливання хімічних речовин та високотоксичні хімікати, рекомендації щодо зберігання хімічних речовин);

- кріогенна, електрична, механічна, радіаційна, лазерна та наноматеріальна безпека;

- безпека чистого приміщення, поводження з відходами та надзвичайні процедури.

Стандарти та керівні принципи містять перевірені на міжнародному рівні етичні принципи та детальний коментар щодо того, як слід застосовувати універсальні етичні принципи, зосереджуючись насамперед на правилах та принципах для надійного захисту. Низка лабораторних професійних організацій мають етичний кодекс, заснований на загальних принципах, визначених Міжнародною федерацією біомедичних лабораторних наук (IFBLS) і застосовуваних до вчених біомедичної лабораторії (BLS) у всьому світі.

BLS несе відповідальність сприяти зі своєї професійної компетенції загальному добробуту громади:

1) дотримання суворої конфіденційності інформації про пацієнта та результатів тестів;

2) захист гідності та конфіденційності пацієнтів;

3) відповідальність за якість та цілісність клінічних лабораторних послуг;

- 4) несення особистої відповідальності;
- 5) ставлення до пацієнтів та колег з повагою, турботою та вдумливістю;
- 6) виконання обов'язків чітко, своєчасно та відповідально;
- 7) захист інформації про пацієнта як конфіденційної, в межах закону;
- 8) обережне використання лабораторних ресурсів;
- 9) виступ за надання якісних лабораторних послуг економічно вигідним способом;
- 10) надання якісних послуг та догляд незалежно від віку, статі, раси, релігії, національного походження, інвалідності, сімейного стану, сексуальної орієнтації, політичних поглядів, соціального походження, здоров'я чи економічного стану.

Література

1. Code of ethics for Biomedical Laboratory Scientists, IAMLТ,1992; revised by IFBLS, 2010.
2. Julio R. Tuma. Ethics on the laboratory floor. 2014.
3. The Code of Ethics of the American Society for Clinical Laboratory Science.
4. The Code of Ethics of American Society of Clinical Pathology (ASCP).
5. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3rd ed.
6. Ralph Stuart. A System for Dealing with Ethical Dilemmas in the Research Lab. 2018.

Глава 5. СТАНДАРТИ

5.1. Лабораторні стандарти/*Р. Жерар*/

Спочатку давайте окреслимо проблему та деякі визначення: для лабораторії проблемою є результат, його отримання та його надійність.

У документації ці проблеми називають результатами, процесами та невизначеностями.

- Результат може бути кількісним і відображати значення. У цьому випадку лабораторія має взяти до уваги, а отже, заміряти невизначеність, пов'язану з результатом. Невизначеність визначається внутрішньо відповідно до стандартів (ISO8655, GUM тощо).

- Результат може бути якісним, лише відображаючи стан зразка (придатний/непридатний до вживання тощо). У цьому випадку стан потрібно отримати шляхом порівняння з цифрами, наприклад (кількість колоній бактерій на грам тощо). Це порівняння залишається в компетенції аналітичного експерта.

- Процес, який також називають протоколом, описує етапи отримання результату. Цей процес має бути вибіркоким, повторюваним, відтворюваним, справедливим і т. інше. Ці різні критерії будуть визначені та затверджені лабораторією. Перевірка буде внутрішньою та зовнішньою.

Ми можемо «класифікувати» лабораторії за типом результатів і таким чином визначити, які типи документації з ними пов'язані:

- Базові дослідницькі лабораторії: у цьому типі лабораторій розробляють протоколи. Найбільш часто використовуваним стандартом у цьому типі лабораторій є стандарт ISO 9001, який є організаційним визнанням. Аналітичні процеси дуже мало «перевірені», оскільки вони є абсолютно новими (тому не використовуються іншими лабораторіями). Також хорошою основою є «Правила мистецтва» професії лабораторного аналітика.

- Аналітичні лабораторії: у цьому випадку отриманий результат має велике значення, оскільки він безпосередньо впливає на аналізований продукт (випадки агропродовольстві, вироблені продукти тощо) або на пацієнта (медицина людини, ветеринар). Помилка є або може бути катастрофічною з позиції впливу на здоров'я (не виявлено хворобу, непотрібне або неадекватне лікування тощо) або фінансова (знищення товару, втрата іміджу бренда, користувача тощо). Тому ці лабораторії мають повну систему управління якістю, а також національне та міжнародне визнання своїх методів, отриманих акредитацією. ISO17025 – найпоширеніший стандарт у цьому випадку.

Протоколи валідовані з використанням стандартів, таких як ISO8655, а підтримка технічної компетентності лабораторії забезпечується під час участі в міжлабораторних випробуваннях.

5.2. Національне та міжнародне визнання (акредитація, НЛП, НВП тощо)

Належна лабораторна практика (GoodLaboratoryPractice (GLP)) – перелік заходів, вимог і методів, спрямованих на забезпечення максимально високої якості лабораторних досліджень.

Принципи належної лабораторної практики (*Principles of Good Laboratory Practice (GLP)*) розроблені з метою поліпшення якості та достовірності результатів випробувань. Дотримання загальних принципів GLP під час виконання досліджень полегшить процес обміну інформацією, сприятиме захисту здоров'я людини, тварин та охороні довкілля.

Належна виробнича практика (GoodManufacturingPractice (GMP)) – це частина системи забезпечення (менеджменту) якості, котра гарантує, що діяльність лабораторії контролюється за відповідними стандартами та відповідає її призначенню. Правила GMP призначені для зниження ризиків за провадження діяльності лабораторії.

Система менеджменту (управління) якості – це сукупність основних процесів в організації діяльності (управлінської, виконавчої, звітної, контролюючої), спрямованих на досягнення злагожденості дій для реалізації поставлених цілей.

Система менеджменту якості в лабораторії обов'язково вимагає колективної діяльності й докладання спільних зусиль для належної роботи, підтвердження та дотримання вимог чинних нормативних актів. Впровадження системи менеджменту якості з урахуванням вимог міжнародних стандартів ISO дозволяє зробити діяльність лабораторії максимально ефективною та у повному обсязі використовувати можливості ISO 17025.

Основні принципи системи менеджменту якості (за ISO 9001:2000 Qualitymanagementsystems – Requirements)

1. Орієнтація на замовника. Лабораторія залежить від своїх замовників і тому має розуміти поточні та майбутні потреби, виконувати їхні вимоги і прагнути перевершити їх очікування.

2. Лідерство. Керівництво встановлює єдність призначеності та напрямів розвитку; створює та підтримує умови для діяння персоналу для забезпечення виконання поставлених завдань; постійно дбає про навчання персоналу, забезпечує необхідними ресурсами. Важливим у реалізації принципу лідерства є регулярне отримання зворотного зв'язку безпосередньо щодо результативності та ефективності системи управління якістю; розробка коригувальних та запобіжних дій.

3. Задіяність персоналу. Компетентний, правомочний та задіяний персонал – суттєво важливий для покращення спроможності лабораторії забезпечувати ефективні результати. Система якості та її механізми мають спонукати співробітників проявляти ініціативу до постійного поліпшення якості

діяльності лабораторії, брати на себе відповідальність у вирішенні проблем якості, активно підвищувати свої знання та передавати їх колегам.

4. Процесний та системний підхід. Узгоджені та передбачувані результати досягаються більш ефективно та результативно, якщо розуміють діяльність та керують нею як взаємопов'язаними процесами (цілісна система). Система якості складається із взаємопов'язаних процесів. У компанії мають бути налагоджені процеси внутрішнього обміну інформацією та система реагування на запити і побажання споживачів. Системний підхід передбачає постійне удосконалення системи через аналізування та оцінювання, прийняття коригувальних та запобіжних дій.

5. Постійне поліпшення. Варто постійно прагнути до поліпшення результативності та ефективності діяльності, а не очікувати появи проблеми.

6. Прийняття рішень на підставі фактів. Ефективні рішення ґрунтуються на аналізування достовірних і точних даних та інформації. Цей принцип стосується не лише управління функціонуванням і технічним забезпеченням функціонування, а й управління проведенням самих випробувань за методиками, що становлять галузь акредитації лабораторії.

7. Керування взаємовідносинами. Для досягнення сталого успіху лабораторія керує своїми взаємовідносинами з відповідними зацікавленими сторонами, наприклад, постачальниками. Реалізація цього принципу вимагає ідентифікації основних постачальників, організації чітких і відкритих зв'язків і відносин, обміну інформацією, спільної роботи з чіткого розуміння потреб споживачів.

Елементи системи контролю якості в лабораторії

Раціональна організація роботи лабораторії має охоплювати всі види її діяльності:

- чітке планування діяльності;
- наявність відповідних приладів, приміщень, обладнання;
- метрологічне забезпечення у точній відповідності з правилами і нормами;
- зручна організація робочих місць (атестація робочих місць);
- наявність інструкцій, методик виконання досліджень на робочому місці;
- знання та виконання правил техніки безпеки й охорони праці;
- раціональна організація процесу виконання лабораторних досліджень;
- забезпечення необхідними реактивами та контрольними матеріалами;
- належне виконання кожним працівником лабораторії його функціональних обов'язків;
- теоретична і практична компетентність та підвищення кваліфікації лабораторного персоналу;

- виконання правил біобезпеки згідно з вимогами нормативних документів.



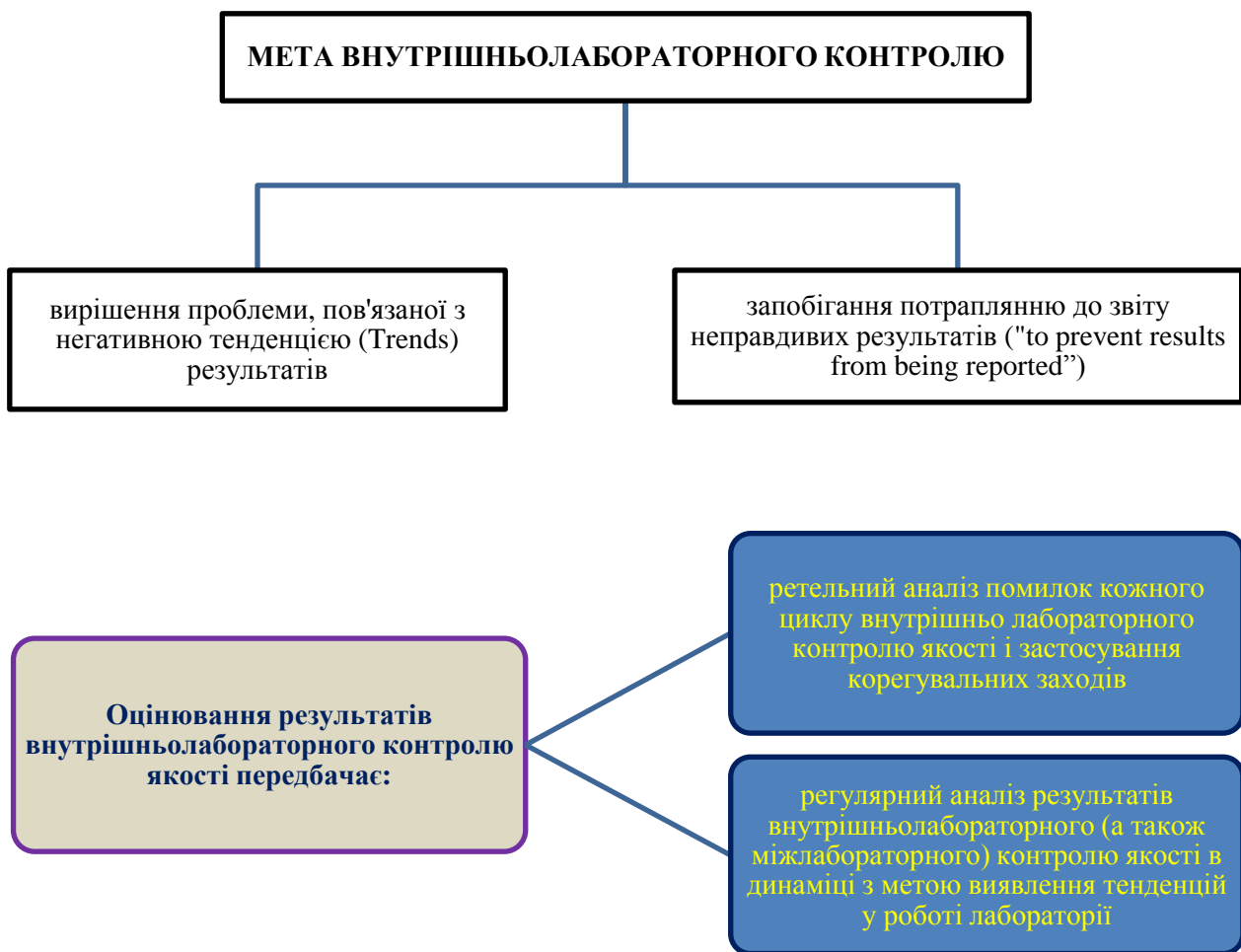
Рис. 1. Чинники, які визначають об'єктивність та надійність лабораторних досліджень

Зовнішній та внутрішній контроль системи якості

Два основні підходи системи контролю якості (QC – QualityControl), які мають бути реалізовані в лабораторії:

- внутрішньолабораторний QC, який полягає в щоденному контролі характеристик результатів досліджень та / або виконується у встановленому порядку для набору проб під час виконання серії досліджень;
- зовнішній QC, заснований на участі лабораторії в програмах професійного тестування.

Внутрішньолабораторний контроль – це планова систематична діяльність, що обов'язкова для будь-якої лабораторії. Необхідно планувати внутрішньолабораторний контроль шляхом проведення, наприклад, періодичного дублювання випробувань іншим оператором.



Одним з головних критеріїв оцінювання технічної компетентності лабораторій під час акредитації відповідно до ISO/IEC 17025 є результати їх участі в міжлабораторних порівняльних випробуваннях (МПВ).

Міжлабораторні порівняльні випробування – це організація, проведення й оцінювання випробувань на однакових або подібних контрольних зразках двома чи більше лабораторіями відповідно до заданих умов (ISO/IEC 17043 Оцінка відповідності. Загальні вимоги).

Документ EAL-P7 «Міжлабораторні порівняльні випробування» встановлює основні критерії проведення МПВ і доповнює Настанову ISO/IEC 43-1...2. Під час проведення МПВ акредитованих лабораторій використовуються настанови ISO 33 «Використання сертифікованих стандартних зразків» і ISO 35 «Сертифікація стандартних зразків. Основні та статистичні принципи».

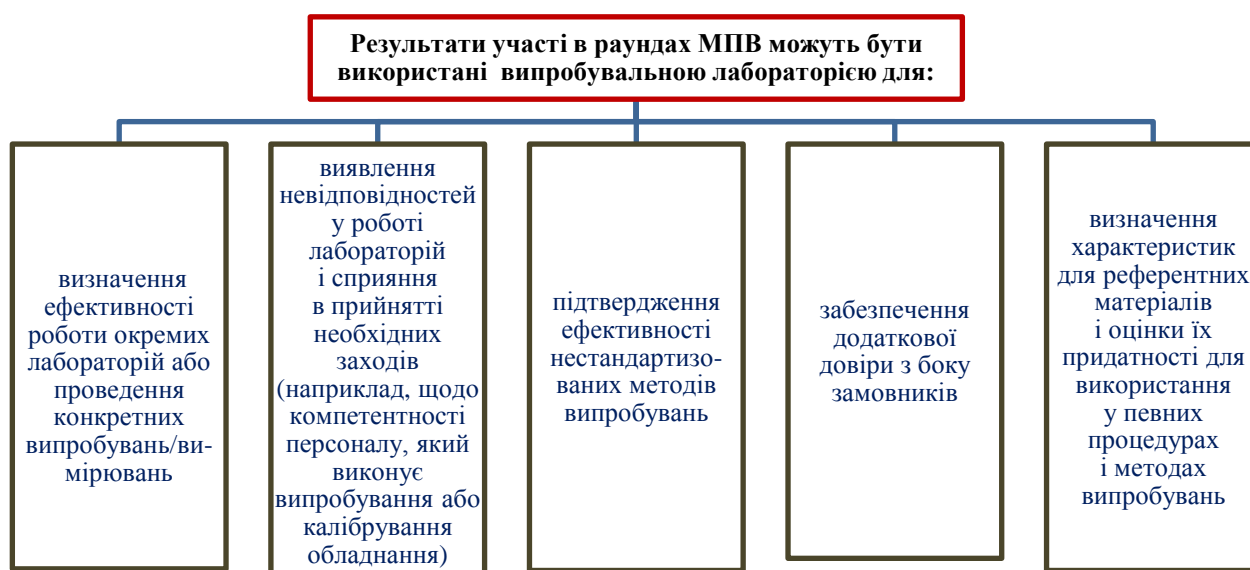
Основним завданням, яке розв'язується за допомогою МПВ, є експериментальна перевірка технічної компетентності лабораторій у визначенні показників складу та властивостей речовин і матеріалів у заявленій (затвердженій) галузі акредитації, що проводиться як на стадії акредитації, так і за наступного інспекційного контролю. Аналіз досвіду діяльності різних

організацій показує, що за наявності групи з декількох лабораторій, що виконують випробування тих самих речовин і матеріалів, саме МПВ є найбільш раціональним методом перевірки технічної компетентності. Участь у МПВ, у т. ч. під час акредитації та інспекційного контролю, сприяє підвищенню довіри до результатів діяльності випробувальної лабораторії. Коректно спланований міжлабораторний експеримент, як правило, дозволяє не тільки оцінити вірогідність результатів, отриманих у кожній з лабораторій, що беруть участь у ньому, але і вирішити низку інших завдань, пов'язаних з метрологічним забезпеченням випробувань.

Зокрема, МПВ проводять для:

- встановлення метрологічних характеристик методик вимірювань, випробувань, контролю (МВВ);
- перевірки єдності та достовірності вимірювань за конкретною МВВ у групі лабораторій;
- оцінювання рівня освоєння декількома лабораторіями конкретної МВВ;
- перевірки статистичної підконтрольності МВВ у групі лабораторій;
- уточнення приписаних значень характеристик похибки методик;
- атестації стандартних зразків складу і властивостей, а також зразків для контролю.

Участь випробувальної лабораторії в раундах МПВ є одним з основних прийомів визначення ефективності методу випробування поряд із калібруванням із використанням стандартних зразків, порівнянням результатів, отриманих за допомогою інших методів, систематичною оцінкою чинників, які впливають на результат, оцінюванням невизначеності результатів на підставі наукового осмислення теоретичних принципів і практичного досвіду.



Залежно від координаторів МПВ поділяють на національні та міжнародні, Координаторами під час проведення міжнародних раундів є міжнародні, визнані й уповноважені на проведення відповідних робіт організації або центри. Раунди, які проводяться національними координаторами в межах України, також визначають як професійні тестування.

<https://www.iso.org/standards.html>

<http://www.eptis.org/>

<http://www.demarcheiso17025.com/>

<http://www.european-accreditation.org>

5.3. Документи та робота з ними/О. Хітська/

Кожна лабораторія розробляє стандартні операційні процедури (СОП) щодо управління документацією з метою забезпечення виконання вимог Стандарту ISO/IEC 17025 щодо управління документацією: під час її розробки, ідентифікації, затвердження, видання, зміни і розподілу по відділах (секторах) лабораторії, а також під час зберігання та архівування.

Основні завдання документації системи менеджменту якості – опис всіх необхідних процесів роботи контрольно-аналітичної лабораторії в достатньому обсязі та донесення інформації до персоналу, спрощення реєстрації даних і моніторинг роботи контрольно-аналітичної лабораторії. Документи системи менеджменту якості мають забезпечувати внутрішні потреби виконавців і керівників лабораторії в їх щоденній діяльності, а також надавати докази для перевірок про те, що відповідні вимоги зовнішніх нормативних актів ураховано і утілено в практику в достатній мірі.

Управління (менеджмент) документацією – процес розробки документації, її ідентифікації, затвердження, видання, зміни і розподілу по відділах (лабораторіях), а також зберігання й архівування.

Документ – викладення необхідної інформації на папері або будь-яких інших носіях (електронному, фотографічному, аналоговому та цифровому форматі).

На внутрішню документацію системи менеджменту якості в першу чергу впливає зовнішня документація:



Внутрішня документація лабораторії обов'язково має містити:

- настанову з якості;
- стандартні Операційні Процедури (СОП);
- робочі інструкції;
- посадові інструкції;
- процедури випробування;
- документацію з даними про функціонування системи управління якістю та технічними даними (журнали, картки, бланки, форми, протоколи тощо).

Настанова з якості (quality manual) – основний документ, який описує різні елементи системи менеджменту якості для гарантування якості результатів, отриманих лабораторією під час проведення досліджень. У Настанові з якості мають бути описані політика з якості, програми, системи, процедури та інструкції у тій мірі, яка необхідна для стислого опису процесів діяльності лабораторії і підтвердження відповідності цих процесів вимогам зовнішнього нормативного акта.

СОП (Standard Operating Procedures (SOPs)) – це затверджені керівництвом письмові інструкції для управління/проведення діяльності за всіма напрямками роботи з виробництва або контролю якості продукції.

Мета СОП – надати працівникам інструкції стосовно того, що і коли слід робити.

СОП мають описувати всі основні процеси, які зазначені в кожному перерахованому вище розділі Настанови з якості, і, крім того, охоплювати більш вузькі види діяльності: внутрішнє маркування, карантин і зберігання матеріалів; установа, налагодження інструменту й обладнання; монтаж і валідація обладнання; матеріали для досліджень, опис методів і обладнання, які при цьому використовуються; відбір зразків; експлуатація, прибирання приміщень, санітарні заходи, технічна безпека; калібрування аналітичних приладів; контроль показників навколишнього середовища; вимоги до кваліфікації, навчання, гігієни персоналу; приготування й контроль стандартних зразків тощо. СОП – це покрокові інструкції, вони мають певне призначення, сферу застосування, обов'язки, процедури виконання, необхідні посилання. Саме СОП забезпечують стабільне, однакове, правильне та відтворюване виконання роботи.

Переваги введення СОП:

1. Можливість забезпечити одноманітність, узгодженість та контроль процесів і гарантувати, що процедуру виконують чітко тим самим способом кожного разу, незалежно від оператора.

2. Створюється стандартна і загальна база для навчання співробітників, швидше і ефективніше проходить адаптація нових співробітників на робочому місці.

3. Мінімізується негативний вплив «особистого» чинника (досвід, знання, навички та вміння окремого співробітника вже не мають великого значення); мінімізується ймовірність помилкових дій і поведінки).

4. Підтримується незмінний та стабільний рівень надання послуг.

5. Створюються умови для впровадження систем менеджменту якості в роботу лабораторії.

Підготовку СОП доручають найбільш компетентним співробітникам лабораторії, які безпосередньо зайняті у виконанні описуваних процедур, з використанням нормативних матеріалів, методичного забезпечення, монографій, наукових публікацій.

Рекомендований перелік СОП у випробувальній лабораторії:

- порядок ведення документації в лабораторії;
- порядок складання СОП;
- документування (реєстрація) діяльності лабораторії;
- операції з техніки безпеки лабораторії;
- утилізація біологічних відходів;
- моніторинг середовища;
- прибирання приміщень лабораторії;
- контроль за обладнанням лабораторії;
- технічне обслуговування обладнання;
- замовлення, отримання, ідентифікація, маркування, обробка та зберігання реагентів, обладнання та приладів;
- проведення внутрішнього аудиту роботи лабораторії;
- збереження конфіденційності результатів;
- заходи в разі невідповідностей;
- дії щодо персоналу, зокрема підвищення кваліфікації, навчання, одяг і гігієну;
- робота з лабораторною інформаційною системою (якщо така є);
- валідація / верифікація обладнання та методик виконання досліджень;
- СОП для кожної окремої методики дослідження.

У чинну документацію лабораторії можуть вносити зміни або доповнення, викликані такими причинами:

- за результатами внутрішнього аудиту;
- за результатами ревізії;
- за результатами аналізу з боку керівництва;
- скаргою замовника;
- ініціативою співробітника щодо подальшого розвитку системи управління якістю.

Лабораторна Інформаційна Система (LIMS скор. від англ. Laboratory Information Management System – система керування лабораторною інформацією) – це професійне програмне забезпечення, яке призначене для керування лабораторними потоками робіт і документів, забезпечує одержання достовірної інформації про результати випробувань і оптимізацію керування (введення, відстежування, документування) цією

інформацією з метою її використання для прийняття своєчасних управлінських рішень.

Лабораторні інформаційні системи повинні мати функціональні можливості, які дозволяють забезпечувати виконання вимог належної лабораторної практики (GLP), належної автоматизованої лабораторної практики (GALP), належної виробничої практики (GMP), стандарту ISO 17025, ISO 2859, ISO 3951 та інших нормативних актів.

Типове програмне забезпечення охоплює низку функцій:

1. Лабораторні дані (методи, процедури, персонал, робочі процеси, СОП).
2. Зразки (реєстрація, тестування, обробка, авторизація, архівування, стандарти, посилання).
3. Інструменти (технічне обслуговування, калібрування, сервіс, робоче навантаження, планування).
4. Ресурси (робота з обладнанням та навантаження персоналу, час, витрати на аналіз).
5. Якість (специфікації, обмеження, аудит, перевірка тощо).
6. Комунікації (інфраструктура, постачальники).
7. Безпека (безпечні системи – користувачі, паролі, групи, авторизація).
8. Валідація (цілісність та послідовність даних, нормативна відповідність, валідація).



<https://www.iso.org/standards.html>

<http://www.eptis.org/>

<http://www.demarcheiso17025.com/>

<http://www.european-accreditation.org>

5.4. Метрологічне забезпечення лабораторії/Л. Домненко/

5.4.1. Структура метрологічної служби, цілі та основні принципи роботи

Згідно з чинним Законом України «Про метрологію та метрологічну діяльність» (далі – Закон «Про метрологію»), метрологічна діяльність – це діяльність, пов'язана із забезпеченням єдності вимірювань. Відповідно до пункту першого статей 9–15 Закону України «Про метрологію» до національної метрологічної служби (метрологічна служба – мережа організацій, окрема організація або окремих підрозділів організації чи їх поєднання, на які покладено відповідальність за забезпечення єдності вимірювань у закріпленій сфері діяльності) належать:

(а) центральний орган виконавчої влади (далі – ЦОВВ), що забезпечує формування державної політики у сфері метрології та метрологічної діяльності, здійснює державне управління забезпеченням єдності вимірювань в Україні.

До повноважень ЦОВВ належать:

- забезпечення нормативно-правового регулювання у сфері метрології та метрологічної діяльності;
- організація проведення фундаментальних досліджень у сфері метрології;
- забезпечення функціонування та вдосконалення національної еталонної бази;
- розроблення або участь у розробленні державних наукових і науково-технічних програм, що стосується забезпечення єдності вимірювань;
- представництво та участь від України в діяльності міжнародних, європейських та інших регіональних організацій з метрології;
- здійснення інших повноважень, визначених законами та покладених на нього актами Кабінету Міністрів України.

(б) ЦОВВ, що реалізує державну політику у сфері метрології та метрологічної діяльності, до повноважень якої належать:

- координація діяльності щодо забезпечення функціонування метрологічної системи України;
- організація функціонування та підготовка пропозицій з удосконалення національної еталонної бази;
- уповноваження на проведення повірки законодавчо регульованих засобів вимірювальної техніки, що перебувають в експлуатації;
- здійснення інших повноважень, визначених законами та покладених на нього актами кабінету Міністрів України.

(в) ЦОВВ, що реалізує державну політику у сфері метрологічного нагляду;

(г) наукові метрологічні центри визначає Кабінет Міністрів України з числа державних підприємств, установ та організацій, що реалізує державну політику у сфері метрології та метрологічної діяльності, і створюють, удосконалюють, зберігають і застосовують національні еталони.

Положення про наукові метрологічні центри затверджує ЦОВВ, що реалізує державну політику у сфері метрології та метрологічної діяльності. Наукові метрологічні центри у сферах діяльності, визначених положеннями про них та нормативно-правовими актами:

1) здійснюють фундаментальні наукові дослідження у сфері метрології, а також виконують роботи, пов'язані з розробленням та реалізацією державних програм з метрології та концепції розвитку метрологічної системи України;

2) здійснюють науково-прикладні дослідження та виконують науково-дослідні роботи, пов'язані із створенням, удосконаленням, зберіганням, звіренням, застосуванням національних еталонів, створенням систем передачі розмірів одиниць вимірювання;

3) беруть участь у розробленні проєктів технічних регламентів, інших нормативно-правових актів, а також нормативних документів у сфері метрології та метрологічної діяльності;

4) здійснюють координацію та науково-методичний супровідробіт із забезпечення єдності вимірювань за відповідними напрямками діяльності;

5) проводять оцінювання відповідності засобів вимірювальної техніки;

6) проводять калібрування та повірку засобів вимірювальної техніки;

7) проводять вимірювання у сфері законодавчо регульованої метрології;

8) ведуть інформаційний фонд за напрямками своєї діяльності;

9) здійснюють міжнародне співробітництво з питань, що належать до їх компетентності.

Наукові метрологічні центри за договорами з юридичними та фізичними особами можуть виконувати інші роботи (надавати інші послуги), пов'язані із забезпеченням єдності вимірювань.

(д) державні підприємства, які належать до сфери управління центрального органу виконавчої влади, що реалізує державну політику у сфері метрології та метрологічної діяльності, та провадять метрологічну діяльність в областях та місті Києві(далі – метрологічні центри);

(е) Служба єдиного часу і еталонних частот здійснює міжгалузеву координацію та виконання робіт, спрямованих на забезпечення єдності вимірювань часу і частоти та визначення параметрів обертання Землі та надання часо-частотної інформації споживачам в економіці, у сфері науки та оборони, а також фізичним та юридичним особам, у тому числі надання інформації для забезпечення застосування єдиного обліково-звітного часу.

Служба стандартних зразків складу та властивостей речовин і матеріалів здійснює міжгалузеву координацію та забезпечує виконання робіт, пов'язаних із

розробленням і впровадженням стандартних зразків складу та властивостей речовин і матеріалів.

Служба стандартних довідкових даних про фізичні сталі та властивості речовин і матеріалів здійснює міжгалузеву координацію та забезпечує виконання робіт, пов'язаних з розробленням і провадженням стандартних довідкових даних про фізичні сталі та властивості речовин і матеріалів.

Завдання та основні засади діяльності служб, зазначених вище, визначають положення про них, затверджені Кабінетом Міністрів України.

(ж) метрологічні служби центральних органів виконавчої влади, інших державних органів, підприємств та організацій можуть створювати метрологічні служби для проведення робіт (надання послуг), пов'язаних із забезпеченням єдності вимірювань у визначених сферах діяльності. Структура, функції, права та обов'язки цих служб визначають положення про такі служби, які затверджують керівники цих органів, підприємств та організацій. Типове положення затверджує ЦОВВ, що забезпечує формування державної політики у сфері метрології та метрологічної діяльності. На підприємствах та в організаціях, які виконують роботи у сфері законодавчо регульованої метрології, обов'язково утворюють метрологічні служби або призначають особи, відповідальні за забезпечення єдності вимірювань.

(з) органи з оцінювання відповідності засобів вимірювальної техніки та повірочні лабораторії.

(є) метрологічне забезпечення діяльності у сфері оборони України здійснюється з урахуванням особливостей, визначених Кабінетом Міністрів України.

5.4.2. Забезпечення компетентності метрологічних лабораторій підприємств у сучасних умовах

В Законі України «Про метрологію відсутні вимоги до атестації вимірювальних та калібрувальних лабораторій, як це регламентовано вимогами у попереднього Закону України «Про метрологію та метрологічну діяльність» від 11.02.1998 № 113/98-ВР [2]. Процедура атестації цих лабораторій була регламентована «Порядком проведення атестації головних та базових організацій метрологічних служб центральних органів виконавчої влади» [3] (далі – «Порядок проведення»). У цьому «Порядку проведення» були визначені всі питання перевірки компетентності лабораторій, форми та зміст необхідних документів. Вимірювальні лабораторії України активно використовували процедуру атестації, яка допомагала їм забезпечувати якість вимірювань, та підтверджувала компетентність лабораторії. Основним визнанням на сьогоднішній день на міжнародному та вітчизняному рівнях засобом підтвердження компетентності лабораторій,

що здійснюють метрологічну діяльність (далі – метрологічні лабораторії) є відповідність вимогам ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 [4]. Під метрологічною діяльністю розуміють діяльність, пов'язану із забезпеченням єдності вимірювань (ст. 1 Закону України «Про метрологію»). Тому, згідно зі сучасними вимогами, до метрологічних лабораторій відносять повірочні, калібрувальні та вимірювальні лабораторії. На підприємстві вони можуть мати конкретні назви, головне – яку метрологічну діяльність вони здійснюють.

Згідно із Законом України «Про метрологію» – повірочна лабораторія – підприємство чи організація або їх відокремлений підрозділ, що проводить повірку засобів вимірювальної техніки; калібрувальна лабораторія – підприємство / організація або їх відокремлений підрозділ, що здійснює калібрування засобів вимірювальної техніки. Вимірювальна лабораторія – це підприємство / організація, їх відокремлені підрозділи та фізичні особи – підприємці, що здійснюють проведення певних вимірювань, не пов'язаних з оцінюванням відповідності продукції, процесів та послуг.

Компетентність метрологічних лабораторій – це офіційно підтверджена можливість лабораторії здійснювати метрологічну діяльність у конкретній сфері на підставі відповідності вимогам процедур проведення вимірювань, та на підставі відповідних ресурсів. Незважаючи на те, як називається лабораторія, її компетентність завжди визначається за відповідними критеріями та забезпечується наявністю, відповідно до галузі діяльності лабораторії, таких ресурсів:

- компетентний персонал;
- приміщення та умови довкілля у них;
- технічне обладнання;
- методики проведення робіт;
- система управління якістю.

Конкретні вимоги до критеріїв компетентності встановлюється у тих документах, які визначають вимоги безпосередньо до компетентності лабораторій або до виконання робіт, та за якими компетентність оцінюється. Основні вимоги до компетентності лабораторій, регламентовані у ДСТУ ISO/IEC 17025:2017.

Підтвердження або визнання компетентності може здійснюватися першою, другою та третьою стороною. Перша сторона – це саме підприємство, яке забезпечує якість виконання лабораторією випробувань або калібрування ЗВТ на підставі забезпечення її необхідними ресурсами та проведення внутрішньої перевірки її діяльності (внутрішнього аудиту). Друга сторона – це замовник продукції підприємства, який може формувати вимоги до проведення метрологічного контролю ЗВТ, а також вимоги до перевірки компетентності лабораторії. Третя сторона – це незалежна організація, яка перевіряє та

підтверджує компетентність лабораторії проводити випробування або калібрування ЗВТ.

Незалежно від того, якою стороною проводиться перевірка лабораторії, критерії ті самі, щовказані вище. І вони завжди мають відповідати вимогам методик випробування / калібрування, які застосовують для метрологічного контролю конкретних ЗВТ. Насамперед має бути у наявності кваліфікований персонал, компетентність якого підтверджується освітою, підготовленістю до роботи та майстерністю. Персонал, якому доручається випробування продукції, калібрування обладнання, повинен мати досвід роботи, знати і виконувати вимоги методики випробування / калібрування, вміти обробляти та оформлювати результати випробування / калібрування. Тому на питання – потрібно або нікожні 5 років проводити навчання для персоналу є тільки позитивна відповідь, а також доповнення про необхідність проведення періодичних внутрішніх перевірок якості виконання робіт персоналом. Вимоги до приміщень та умов докільця в лабораторіях теж мають відповідати вимогам методик випробування / калібрування.

Приміщення також мають відповідати протипожежним, санітарним вимогам, вимогам з охорони праці.

Умови докільця, насамперед, включають вимоги до температури навколишнього середовища. Відхилення температури за встановлені межі під час вимірювання не допустимо, оскільки це може призвести до хибних результатів визначення придатності обладнання за рахунок появи додаткових складових невизначеності та впливати на достовірність результатів. Це стосується всіх визначених у методиці випробування / калібрування впливових чинників.

Одним з аспектів забезпечення якості вимірювань / випробувань є участь у раундах між лабораторних порівняльних випробувань (далі – МПР). МПР широко використовуються для низки завдань і знаходять все більше застосування на міжнародному рівні.

Типовими завданнями МПР є:

- оцінювання характеристик функціонування лабораторій з проведення певних випробувань або виконання вимірювань і постійний моніторинг за ними;
- виявлення проблем у лабораторіях, пов'язаних, наприклад, із застосуванням неправильних процедур вимірювань / випробувань, недостатньою ефективністю навчання і управління персоналом та їх усунення;
- встановлення ефективності та порівнянності методів вимірювань / випробувань;
- забезпечення максимальної довіри у замовників лабораторії;
- виявлення відмінностей між лабораторіями;

- навчання метрологічних лабораторій, які беруть участь у раундах МПР, яке ґрунтується на результатах звірень;
- підтвердження заявленої невизначеності;
- оцінювання характеристик методу;
- приписування значень стандартних зразків та оцінювання їх придатності для використання в певних процедурах вимірювань / випробувань;
- підтримка у встановленні еквівалентності вимірювань, виконуваних національними метрологічними інститутами, через ключові звірення і додаткові звірення, що проводяться від імені Міжнародного бюро мір і ваг (BIPM), і взаємодіючими з ними регіональними метрологічними організаціями.

Міжлабораторні випробування проводять у вигляді:

- випробувань, які являють собою будь-яку технічну операцію, призначену для визначення або контролю однієї або декількох характеристик чи параметрів об'єкта випробувань, яку виконують за встановленою процедурою;
- вимірювань, які являють собою технічну операцію, призначену для відображення фізичних величин, що вимірюються, їх значення за допомогою експерименту та обчислень за встановлених МВВ.

Міжлабораторні випробування проводять у формі:

- міжлабораторних порівнянь результатів вимірювання;
- спільних міжлабораторних експериментів з метою встановлення опорних значень;
- міжлабораторних звірень;
- міжлабораторних порівняльних випробувань.

Участь у проведенні міжлабораторних випробувань сприяють підвищенню технічного рівня лабораторії та компетентності її персоналу.

Під час проведення вимірювань та випробувань у міжнародній практиці приділяють значну увагу забезпеченню єдності вимірювань та таким складовим, як простежуваність вимірювань, калібрування ЗВТ, оцінка точності вимірювань та валідація і верифікація методик вимірювань.

Загальні критерії компетентності для повірочних лабораторій такі самі, як і для інших лабораторій.

Технічні засоби, що застосовують під час випробування / калібрування, – це стандартні зразки, стандартні еталонні матеріали та матеріали для контролю якості, еталони для калібрування, допоміжне обладнання, мають бути у складі, визначеному в методиці випробування / калібрування. Однак, при цьому виникає питання з калібрування робочих еталонів. Щодо калібрування обладнання можна прочитати в п. 6.4 [4]. Також в Україні чинні гармонізовані із міжнародними такі документи, як [5] та [6], що стосуються робочих еталонів. Робочі еталони, в т. ч. вихідні для підприємства, не відносять до об'єктів законодавчо регульованої метрології, тому

підприємство / лабораторія визначається з калібруванням еталонів і так само, як між калібрувальний інтервал для робочих еталонів є рекомендований, тому підприємство / лабораторія самостійно визначає цей інтервал на підставі, наприклад, стандартів Міжнародної організації законодавчої метрології, які впроваджені в Україні як національні стандарти [5] та [7].

Що саме робити – повірити чи калібрувати еталони підприємство/лабораторія самостійно вирішує це питання на підставі наступного:

- під час перевірки встановлюється відповідність метрологічних характеристик робочого еталона його експлуатаційним документам. Можна використовувати державні повірочні схеми для встановлення розряду робочого еталона для його вибору за методикою перевірки. Відмова метрологічного центру від перевірки еталона не є обґрунтованою, тому що підприємство / лабораторія, як замовник, виставляє свої вимоги, а вимоги замовника слід виконувати. Видача свідоцтва про перевірку еталона як на робочий ЗВТ теж не є перешкодою для застосування еталона, але в цьому разі слід замовляти протокол перевірки для встановлення простежуваності робочого еталона до первинного еталона;

- під час калібрування встановлюється відхилення показів робочого еталона підприємства від значень реалізованих тим еталоном, який застосовували під час калібрування як відхил та невизначеність вимірювань встановлення цих відхилень. Підприємство безпосередньо (саме) має вирішувати придатність калібрувального еталона до перевірки на ньому ЗВТ.

Якщо підприємство має намір проводити калібрування ЗВТ, то воно саме вирішує обов'язковість наявності акредитації або оцінювання компетентності калібрувальної лабораторії першою, другою або третьою стороною. При цьому для акредитації обов'язково впровадити в калібрувальній лабораторії ДСТУ [9] та звернутися для здійснення цієї процедури до Національного агентства з акредитації України.

У разі, якщо акредитація не передбачається, то обов'язково слід мати документально підтверджену простежуваність своїх еталонів до національних еталонів. А це означає, що робочі еталони мають бути калібровані в акредитованих калібрувальних лабораторіях з відповідною сферою діяльності.

Таким чином, можна зробити висновок, що метрологічні лабораторії мають обов'язково приділяти максимум зусиль із забезпечення своєї компетентності. Сучасні вимоги до забезпечення якості метрологічних робіт передбачають наявність різних підходів до встановлення компетентності лабораторій, що надає свободу підприємствам щодо вирішення цього питання, на свій розсуд та / або за вимогами замовників продукції.

5.4.3. Система менеджменту якості лабораторії, документи

Метою впровадження системи менеджменту якості (СМЯ) в організації є підтвердження діяльності відповідно до вимог нормативної документації (стандартам, нормам та ін.), що надає впевненості замовникам в отриманні якісних відповідних послуг щодо випробувань.

На наш погляд, найбільш ефективними під час створення і впровадження СМЯ в будь-якій організації є вимоги, викладені у стандартах серії ISO 9000 «Qualitymanagementsystems», застосування яких дозволяє досягти таких переваг:

- краще розуміння і узгодженість діяльності у сфері якості у всій організації;
- гарантії постійного використання системи якості для управління загалом;
- удосконалення системи документації;
- підвищення розуміння персоналом аспектів якості;
- підвищення продуктивності праці, зниження затрат;
- створення фундаменту постійного удосконалення діяльності.

Але відповідність метрологічної лабораторії (вимірювальної, калібрувальної, аналітичної) вимогам ISO 9001 «Qualitymanagementsystems – Requirements» ще не надає їй гарантій отримувати достовірні результати. Лабораторія – це складна система, в роботі якої задіяно багато елементів: персонал, інфраструктура, методики вимірювання, процеси, обладнання, методи роботи, документація. Складність системи вимагає, щоб всі елементи працювали правильно і скоординовано. Основна ціль системи якості лабораторії – гарантувати точність, надійність і своєчасність представлення результатів випробувань, аналізування, тестування. На сьогодні є багато напрацювань у сфері менеджменту якості лабораторії. Основним міжнародним стандартом є ISO/IEC 17025:2005 «Generalrequirementsforthecompetenceoftestingandcalibrationlaboratories» (Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій), де встановлені вимоги до системи менеджменту і до її технічної компетентності. Вимоги до системи якості в обох вищезгаданих стандартах аналогічні, але їх формулювання в ISO/IEC 17025 більш конкретизовані стосовно роботи лабораторії і тому відрізняються від ISO 9001.

Відповідність діяльності лабораторії вимогам стандарту ISO/IEC 17025 означає, що лабораторія відповідає вимогам і до технічної компетентності, і до системи менеджменту і таким чином гарантує замовникам дотримання умов отримання достовірних результатів випробувань.

Найбільш відомими міжнародними нормативними документами системи менеджменту якості лабораторій, крім зазначених вище, є:

- ISO/IEC 17043 «Conformity assessment – general requirements for proficiency testing»;
- ISO 13528 «Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison»;
- ISO Guide 34 «General requirement for the competence of reference material producers»;
- ISO 10013 «Guidelines for quality management system documentation».

Ці документи прийняті як національні стандарти України:

- ДСТУ ISO 9001 «Системи управління якістю. Вимоги»;
- ДСТУ ISO/IEC 17025 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій»;
- ДСТУ ENISO/IEC 17043 «Оцінка відповідності. Загальні вимоги до перевірки професійного рівня»;
- ДСТУ ISO 13528 «Статистичні методи для застосування під час перевірки професійного рівня за допомогою міжлабораторних порівнянь»;
- ДСТУ Н ISO/IEC Guide 34 «Загальні вимоги до виробників стандартних зразків»;
- ДСТУ ISO/TR 10013 «Настанови з розроблення системи управління якістю».

Якщо лабораторія розробила та впровадила СМЯ відповідно до свого напрямку діяльності, вона може бути акредитована у міжнародній або національній системі. Критерії, які розроблені для більшості систем акредитації, містять вимоги до системи якості та узгоджені з міжнародними стандартами.

Але акредитація не має бути кінцевою метою лабораторії навіть з позиції конкуренції на ринку лабораторних послуг. СМЯ лабораторії потрібно постійно підтримувати у робочому стані та удосконалювати для гарантування якості послуг й підтвердження акредитації.

5.4.4. Документація лабораторії

Основним «продуктом» діяльності лабораторії є інформація, представлена у вигляді даних і документів, які є елементом СМЯ. Для забезпечення доступності, достовірності, своєчасності і надійності документація лабораторії має бути під постійним наглядом, що забезпечується системою управління документації, яка може бути як в електронному, так і паперовому вигляді, або їх комбінацією. Управління документацією – це систематичне застосування встановлених правил як до окремого документа, так і до групи документів.

Документація, яка регламентує роботу лабораторії складається з різних видів документів: організаційно-розпорядчі, кореспонденція, юридичні, кадрові, бухгалтерські, форми реєстрації даних і найбільша частина – нормативно-технічні документи, які, у свою чергу, є зовнішніми (закони, технічні

регламенти, технічні вимоги, стандарти, що регламентують технічні вимоги до продукції, яка випробується, та методи її випробувань і вимірювань, паспорти на обладнання та інше), і внутрішніми (інструкції, правила, СОП, методики, процедури випробувань), які розроблені в лабораторії.

Документи, які належать до одного виду, у більшості випадків мають однакову схему управління.

Основні дії з управління документацією лабораторії:

- *Розроблення*– перш ніж розробляти документ необхідно визначити мету, вимоги до змісту, склад осіб, які беруть участь у створенні документа.

- *Ідентифікація*– кожен документ має бути прив'язаний до місця і часу. Правила ідентифікації дозволяють однозначно встановити приналежність документа і відслідкувати його рух.

- *Аналізування*– перш ніж документ набере чинності, потрібно проаналізувати його на відповідність цілей створення, повноту охоплення проблеми.

- *Погодження*– потрібне для перевірки обґрунтування відомостей, що представлені у документі.

- *Розповсюдження*– необхідно для впевненості у тому, що документ доставлений до зацікавлених осіб.

- *Забезпечення доступності*– доступність означає можливість співробітників користуватися документом у потрібний час і у потрібному місці для виконання своїх обов'язків.

- *Зберігання* (в електронному чи паперовому вигляді) - важливо забезпечити захист документа і можливість його відновлення.

- *Перегляд*– здійснюють для підтримання документації в актуальному стані через визначені проміжки часу.

За рівнем ієрархії структура документів повторює рівні управління лабораторією: стратегічний, тактичний, оперативний. Рівень ієрархії встановлює статус документів, сферу їх дії і дозволяє розподілити відповідальність за дії з документом.

Документація лабораторії – елемент СМЯ, за допомогою якої відбувається комунікація як всередині лабораторії, так і за її межами, має бути завжди актуальною, достатньою і доступною для персоналу.

5.5. Акредитація/Р. Жерар, К. Козек - Пазжковська/

Сертифікація–надання незалежним органом письмової гарантії (сертифікат) про те, що продукт, послуга чи система відповідають певним вимогам.

Сертифікація–це підтвердження того, що клієнт (власник сертифіката) працює згідно з набором вимог, які визначає розробник стандарту. Органи

оцінювання відповідності (CABs), які також називаються органами сертифікації (OC), виконують ці сертифікаційні завдання. Для виконання сертифікації OC має бути акредитованим органом з акредитації.

Сертифікацію може бути зроблено відповідно до таких стандартів та норм: ISO 9001, ISO 22 000, ISO 14 000, BRC, IFS.

Акредитація—офіційне визнання незалежним органом, відомим як орган акредитації, що орган сертифікації діє відповідно до міжнародних стандартів.

Але також деякі стандарти можуть бути акредитовані.

Наприклад: **лабораторний стандарт ISO 17025**.

Зазвичай для кожної країни існує лише один орган акредитації (наприклад, UKAS для Великої Британії, PCA для Польщі тощо), тоді як у кожній країні діє кілька органів сертифікації – від маленьких місцевих органів сертифікації до великих міжнародних корпорацій, таких як SGS, BSI, DNV, BV, Dekra, TUV та інше.

Акредитація – це незалежне оцінювання третьою стороною та демонстрація компетенції. Це оцінювання незалежності, об'єктивності та компетенції для виконання певних видів діяльності. Акредитація означає підвищення впевненості в дотриманні необхідного рівня якості надаваних послуг.

Акредитація – це діяльність державних органів. Це останній рівень контролю державними органами, який призначений для забезпечення того, щоб органи оцінювання відповідності (наприклад, лабораторії, органи експертизи або сертифікації) мали технічні можливості для виконання своїх обов'язків. Використовують у регульованих галузях та добровільно. Акредитація підвищує довіру до оцінювання відповідності. Це також посилює взаємне визнання товарів, послуг, систем та органів сертифікації в ЄС.

Акредитація в ЄС

- Постанова Європейського Парламенту та Ради від 9 липня 2008 р. № 765/2008, що встановлює вимоги щодо акредитації та нагляду за ринком, що стосуються збуту продукції та скасовує Постанову (ЄЕС) № 339/93.

- Стандарт ISO / IEC 17011: 2006. Оцінка відповідності. Загальні вимоги до органів акредитації, які акредитують органи оцінки відповідності, а також вимоги, що впливають із підписаних багатосторонніх угод, таких як: Міжнародний форум з акредитації, Міжнародне співробітництво з акредитації лабораторій, Європейське співробітництво з акредитації.

Вимоги до акредитації встановлені в Постанові 765/2008.

Основні принципи акредитації:

- один орган з акредитації в кожній країні ЄС (однак можна використовувати національний орган акредитації іншої країни);

- акредитація – це діяльність у державному секторі та некомерційна діяльність;

- немає конкуренції між національними органами з акредитації;

- представлені зацікавлені сторони;
- акредитація є найкращим засобом демонстрації технічних можливостей органів у регульованій області.

Національні органи акредитації зобов'язані періодично проходити експертну оцінку Європейською кооперацією з акредитації (яку вимагає стаття 64 Положення Комісії (ЄС) № 600/2012), і тому держави-члени ЄС приймають сертифікати акредитації таких національних органів з акредитації:

Франція:

Comité français d'accréditation (COFRAC)

Німеччина:

Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH (DAkkS)

Польща:

Polskie Centrum Akredytacji – Polish Centre for Accreditation (PCA)

Україна:

Національне агентство з акредитації України (НААУ)

Акредитація лабораторій

Відповідно до спеціальних норм лабораторії можуть бути акредитовані за такими напрямками:

- Тестування – EN ISO / IEC 17025.
- Медичні дослідження – EN ISO 15189.
- Калібрування – EN ISO / IEC 17025.

Акредитація лабораторії – це офіційне визнання компетенції організації в тому, що вона може виконувати певні специфічні випробування, дослідження або калібрування приладів. Для того, щоб бути акредитованими, в лабораторії мають бути встановлені програми контролю та забезпечення якості для всіх аспектів лабораторних операцій. Усі засоби та обладнання повинні забезпечувати відповідність запланованих використань. Лабораторія також має брати участь у програмі аналітичного тестування. Без акредитації незрозуміло, які стандарти та системи якості фактично використовують лабораторії. Щоб втримати це визнання, лабораторії періодично переоцінюються органом з акредитації, щоб впевнитися, що лабораторії постійно дотримуються вимог та перевірити, чи підтримується їхній стандарт роботи.

Клієнти перевіряють, для яких конкретних тестів та вимірювань лабораторії акредитовані. Ця інформація, як правило, вказана в акредитаційних документах лабораторії, видана органом з акредитації.

Опис у рамках акредитації також дає змогу клієнтам знайти відповідну лабораторну або тестову службу.

Органи з акредитації лабораторій оприлюднюють оцінки акредитації лабораторій як у друкованих довідниках, так і в Інтернеті. Орган з акредитації проводить регулярне оцінювання перевіряє всі аспекти діяльності лабораторії.

Визначають та обговорюють області, які потребують удосконалення, а детальний звіт подають наприкінці кожного візиту. У необхідних випадках органи з акредитації моніторять коригувальні дії, щоб впевнитися, що було вжито відповідні заходи.

Акредитація – це ефективний маркетинговий інструмент для організацій, які займаються тестуванням, калібруванням та оцінюванням.

За допомогою системи міжнародних угод акредитовані лабораторії отримують форму міжнародного визнання, що сприяє більшому визнанню їхніх даних на міжнародних ринках.

Це визнання допомагає знизити витрати для виробників та експортерів, які тестують свої товари або матеріали в акредитованих лабораторіях, зменшуючи або виключаючи необхідність повторного тестування в іншій країні.

5.6. Міжнародні організації в галузі лабораторної практики: Асоціація офіційних хіміків-аналітиків, мікробіологів, ISO, Європейські норми

/Т. Якімова/

Міжнародна АОХА об'єднує уряд, промисловість та наукові кола для встановлення стандартних методів аналізу, що забезпечують безпеку та цілісність харчових продуктів й інших продуктів, що впливають на здоров'я населення у всьому світі.

Як лідер аналітичних досягнень, Міжнародна АОХА розвиває безпеку харчових продуктів, цілісність харчових продуктів та охорону здоров'я, об'єднуючи членів, організації та експертів, що займаються розробкою та підтвердженням стандартів, методів і технологій, що мають глобальне значення.

Міжнародну АОХА було створено в 1884 р. як Асоціацію офіційних сільськогосподарських хіміків. Пізніше прийняли назву «Асоціація офіційних хіміків-аналітиків», щоб краще відображати додаткові сфери інтересів безпеки. Сьогодні юридична назва організації – Міжнародна АОХА, намагаючись відобразити глобальний характер впливу.

Програма Офіційних методів аналізуSM (ОМА) є провідною програмою методів Міжнародної АОХА. Ця програма методів відрізняється від щорічного видання «Офіційні методи аналізу» АОАС. Затверджені методи піддаються суворому систематичному науковому дослідженню, щоб забезпечити їх високу надійність – і те, що їх можуть з упевненістю використовувати у промисловості контролюючі органи, дослідницькі організації, випробувальні лабораторії та академічні установи.

Офіційні методи аналізуSM (ОМА) – це найповніше та найнадійніше зібрання хімічних та мікробіологічних методів і консенсусних стандартів. Багато офіційних методів було прийнято як гармонізовані міжнародні довідкові методи Міжнародною організацією зі стандартизації (ISO), Міжнародною молочною

федерацією (IDF), Міжнародним союзом чистої та прикладної хімії (IUPAC) та Комісією Codex Alimentarius.

ISO (Міжнародна організація стандартизації)

ISO є найбільшим у світі розробником та видавцем міжнародних стандартів, і стандарти ISO застосовують для багатьох видів організацій, зокрема клінічні лабораторії та лабораторії громадського здоров'я.

ISO – це мережа національних інститутів стандартів 157 країн, по одному члену з країни, з Центральним офісом у Женеві, Швейцарія, який координує систему. Це неурядова організація, яка формує місток між державним та приватним секторами. З одного боку, багато інститутів, що входять до його складу, є частиною урядової структури своїх країн або були уповноважені урядом. Однак багато членів мають унікальні коріння у приватному секторі, створеному національними партнерствами галузевих асоціацій. Отже, ISO дозволяє досягти консенсусу щодо рішень, які відповідають як вимогам бізнесу, так і широким потребам суспільства.

Роботу з підготовки стандартів ведуть технічні комітети ISO. Кожен член організації має право бути представленим у комітетах. Міжнародні організації, як урядові, так і неурядові, також беруть участь у діяльності комітету. Проекти міжнародних стандартів, прийняті технічним 1 ISO/IEC Guide 2: 1996 (EN 45020: 1998) Стандартизація та супутня діяльність – загальний словник. Женева, Міжнародна організація зі стандартизації, 1996.

126 комітетів лабораторної системи управління якістю передають органам-членам для голосування. Публікація така, як міжнародний стандарт вимагає, схвалення принаймні 75 % органів-членів, які проголосували.

CLSI (Інститут клінічних та лабораторних стандартів)

CLSI – це глобальна, неприбуткова організація, що розробляє стандарти, яка сприяє розробці та використанню добровільних консенсусних стандартів та керівних принципів у межах спільноти охорони здоров'я. Документи CLSI розробляють експерти, які працюють у підкомітетах або робочих групах під керівництвом та наглядом регіонального комітету. Розробка стандартів CLSI – це динамічний процес. Кожен регіональний комітет CLSI зобов'язується виробляти консенсусні документи, що стосуються певної дисципліни, як це описано в його місії.

CEN (Європейський комітет стандартизації)

CEN було засноване 1961 році національними органами з питань стандартів Європейського економічного співтовариства та асоційованих країн. Загальні умови містять відкритість, прозорість, консенсус та інтеграцію. Офіційне прийняття європейських стандартів вирішується зваженою більшістю голосів національних членів CEN і є обов'язковим для всіх них. Обов'язки розподілено

між 30 національними членами з кожної країни, 7 асоційованими членами та 2 радниками, а також Центром управління CEN у Брюсселі.

ВООЗ (Всесвітня організація охорони здоров'я)

ВООЗ розробила кілька стандартів для діагностичних лабораторій, які спеціалізуються на захворюваннях. Одним із прикладів є поліомієліт, де акредитація необхідна для того, щоб лабораторія брала участь у Мережі з питань викорінення поліомієліту. Вибрано сім критеріїв, включаючи мінімальну активність 150 зразків щороку, успішну участь у тестуванні кваліфікації, а також точність та своєчасність повідомлень про хід справ.

База даних **EPTIS** є спільною публікацією всесвітнього консорціуму організацій. Усі члени цього консорціуму так чи інакше беруть участь у РТ і відіграють помітну роль у національних або міжнародних інфраструктурах якості. Є члени-координатори, які відіграють більш активну роль у EPTIS, та підтримуючі члени, які забезпечують більш невлесиму підтримку. Загальним координатором EPTIS є Федеральний інститут досліджень та випробувань матеріалів (BAM) у Німеччині.

Європейська інформаційна система ПК (EPTIS) – назва проєкту ЄС, спрямованого на проведення інвентаризації регулярно діючих схем перевірки кваліфікації у країнах-учасниках. Партнери проєкту – великі національні лабораторії та інститути.

EPTIS – це база даних, створена в 2000 році в Європі, яка спочатку об'єднувала постачальників тестів перевірки кваліфікації з 16 країн регіону і сьогодні має зареєстрованими понад 800 програм. Координатори EPTIS прагнули розширити сферу своєї діяльності, долучивши інші країни та регіони. Зазначена ініціатива має підтримку важливих міжнародних установ, які представляють випробувальні та калібрувальні лабораторії, а також Міжнародного співробітництва з акредитації лабораторій (ILAC) та інших акредитаційних співпраць.

Через проєкт IAAC, що фінансується за рахунок коштів Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) і перебуває під керівництвом Підкомітету лабораторій IAAC, провайдери тестування кваліфікації Канади, Мексики, Карибського басейну, Центральної Америки та Південної Америки мають бути інтегровані в EPTIS, таким чином допомогти лабораторіям отримати доступ до інформації стосовно програм, доступних у регіоні.

Глава 6. ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ

6.1. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) як метод молекулярно-генетичного аналізу/С. Рубан, А. Геть, С. Грищенко, Х. Курта, С. Ведмідь, Н. Грищенко, О. Скрипник, Л. Кайсин, М. Хоменко/

ПЛР – це експериментальний метод, який заснований на принципі експоненціального збільшення кількості копій ділянки вихідної ДНК–матриці за допомогою ферментів *in vitro*. При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка обмежується праймерами, і лише в тому випадку, якщо вона присутня в досліджуваному зразку біологічного матеріалу. Метод ПЛР розробив Кері Мулліс у 1983 році, а у 1993 році за це відкриття його нагороджено Нобелівською премією у галузі хімії [Глазко В.І., 2001; 2003].

Полімеразна ланцюгова реакція проходить у три стадії з відповідними температурними та часовими параметрами, які автоматично змінюються у програмованому термостаті – ампліфікаторі.

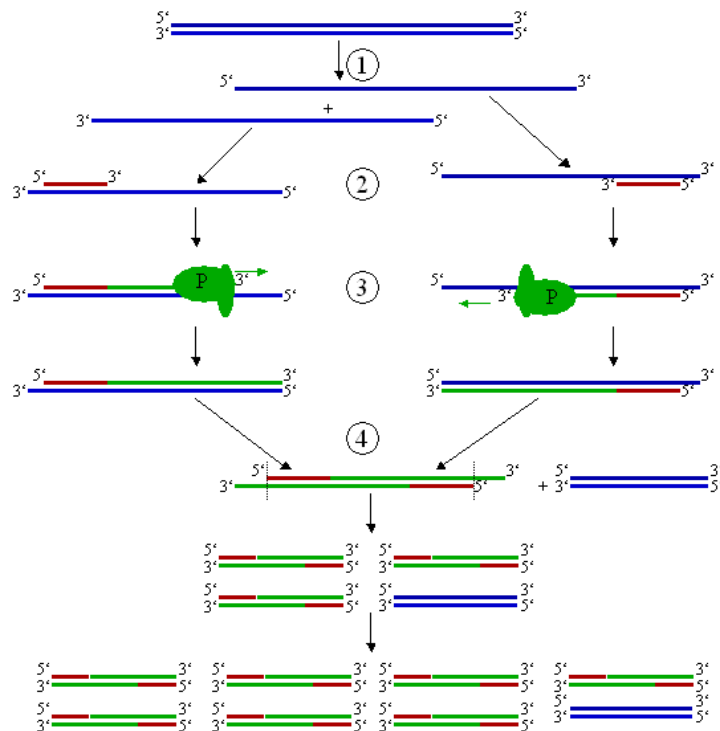


Рис. 6.1. Схематичне зображення циклу ПЛР

(1) денатурація при 94–96 °С; (2) гібридизація при 56–65 °С; (3) елонгація при 72 °С; (4) завершення першого циклу. Два отримані ДНК-ланцюга служать матрицею для наступного циклу, тому кількість матричної ДНК в ході кожного циклу подвоюється

Перша стадія – термічна денатурація – руйнування дволанцюгової молекули ДНК за температури 93–95 °С з утворення двох одинарних ланцюгів.

Для повної денатурації ДНК з метою підвищення виходу ПЛР продукту за температури 95 °С протягом 2–5хв проводять початкову денатурацію.

Друга стадія – гібридизація – приєднання праймерів до комплементарної послідовності ДНК на протилежних ланцюгах ДНК у межах специфічної ділянки. Гібридизація праймерів відбувається за правилами комплементарності Чаргаффа, у якому зазначено, що у дволанцюговій молекулі ДНК напроти аденіну (А) завжди знаходиться тимін (Т), а напроти гуаніну (Г) – цитозин (Ц). Одним з найважливіших параметрів ПЛР є температура гібридизації праймерів (T_A), яка, як правило, залежить від структури праймерів і є нижчою температури їх плавлення на 3–5 °С та в середньому становить 55–65 °С.

Третя стадія – елонгація (подовження) – синтез *Taq*-полімеразою комплементарного ланцюга ДНК за температури 72 °С. Температурний цикл ампліфікації багаторазово повторюється і за 25–40 циклів у суміші накопичується достатня для візуалізації кількість специфічних коротких синтезованих фрагментів ДНК – ампліконів [Mullis K, 1986].

Специфічні фрагменти, обмежені на кінцях праймерами, вперше з'являються наприкінці другого циклу, накопичуються у геометричній прогресії і дуже скоро починають домінувати серед продуктів ампліфікації [Глазко, 2006].

Зростання необхідного продукту в геометричній прогресії (експоненціально) обмежено кількістю реагентів, присутністю інгібіторів, утворенням побічних продуктів. Накопичення специфічних продуктів ПЛР у суміші відображається такою формулою:

$$A = M (2^n - n - 1) \sim 2^n,$$

де А – кількість специфічних (обмежених праймерами) продуктів реакції ампліконів;

М – початкова кількість ДНК-мішеней;

n – кількість циклів ампліфікації;

~ позначка математичної еквівалентності певного процесу (в нашому випадку це процес ампліфікації).

На останніх циклах реакції зростання уповільнюється, це називають «ефектом плато». Термін «ефект плато» використовують для опису процесу накопичення продуктів ПЛР на останніх циклах ампліфікації, коли кількість ампліконів досягає 0,3–1 пмоль.

Залежно від умов та кількості циклів реакції ампліфікації, на момент досягнення «ефекту плато» впливають: утилізація субстратів (дНТФ і праймерів); стабільність реагентів (дНТФ і ферменту); кількість інгібіторів, включаючи пірофосфати і ДНК-дуплекси; неспецифічні продукти або праймер-димери, конкуруючі за праймери, дНТФ та полімеразу; концентрація специфічного продукту і неповна денатурація за високої концентрації продуктів ампліфікації. Що менше початкова концентрація ДНК-мішені, то вище ризик виходу реакції на плато. Цей момент може настати до того, як кількість специфічних продуктів

ампліфікації буде досить, щоб їх можна було проаналізувати. Уникнути цього дозволяє оптимізація умов проведення полімеразної ланцюгової реакції, а саме складу та концентрації компонентів реакційної суміші та режиму ампліфікації [McPherson M.J, 2000].

Стандартними компонентами ПЛР-суміші є:

- ДНК-матриця;
- суміш форвардного та реверсного олігонуклеотидних праймерів, комплементарні кінцям цільового фрагмента;
- термостабільна ДНК-полімераза – фермент, який каталізує реакцію полімеризації ДНК. Полімераза для використання у ПЛР має зберігати активність за високої температури тривалий час, тому використовують ферменти, виділені з бактерій-термофілів *Thermusaquaticus* (Taq-полімераза), *Pyrococcusfuriosus* (Pfu-полімераза), *Pyrococcuswoesei* (Pwo-полімераза) та інші [Arezi B, 2003].
- Дезоксинуклеотидтрифосфати (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- Іони Mg^{2+} , необхідні для роботи полімерази;
- Буферний розчин, що забезпечує необхідні умови реакції – рН, іонну силу розчину. Містить солі, бичачий сироватковий альбумін.

Інтерпретація результатів ПЛР-аналізу та оцінка ефективності ПЛР може відбуватися шляхом розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі методом горизонтального електрофорезу, методом капілярного електрофорезу або на моніторі комп'ютера за використання флуоресцентних (ПЛР у реальному часі) зондів [Ребриков Д.В., 2009].

6.2. Вимоги до інструментів та обладнання

6.2.1. Опис інструментів та обладнання з їх характеристикою та призначенням для проведення лабораторних робіт

Організацію роботи лабораторії, вимоги до обладнання та персоналу визначають Наказом МОЗ 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».

Спеціальну комплектацію необхідного лабораторного обладнання визначають з урахування функціонального призначення лабораторії. Необхідно враховувати молекулярно-біологічні методи та тест-системи, які планують використовувати для виконання досліджень, а також обсяги виконуваних робіт.

Для проведення випробувань використовують прилади та витратні матеріали, до яких відносять пробірки та наконечники, які виключають можливість перехресної контамінації (забруднення) вихідного матеріалу, виділених нуклеїнових кислот (ДНК / РНК) та продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Для таких цілей необхідно використовувати:

- термостати з твердотільним блоком;
- одноразові пластикові пробірки, вільні від ДНКаз та РНКаз;
- наконечники з фільтром для мікродозаторів, вільні від ДНКаз та РНКаз;
- спеціальні контейнери для скидання використаних наконечників і пробірок.

Дозатори, робоча та зовнішня поверхня корпусу приладів мають бути стійкими до мийних, дезінфекційних засобів та ультрафіолетового випромінювання.

Під час застосування методики ПЛР з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією «за кінцевою точкою» використовують спеціальний детектор типу «Джин» або «Ала1/4», який доцільно встановлювати в ампліфікаційній, з'єднавши його з комп'ютером зі спеціальною операційною системою відповідно до встановленого обладнання [МУ 1.3.2569-09.М., 2009].

Генетичний аналізатор, який використовують для проведення секвенування та фрагментного аналізу, встановлюють в окремій кімнаті для детекції та інтерпретації результатів [Наказ МОЗ України від 24.01.2008 № 26; МУ 1.3.2569-09.М., 2009].

Мінімальний перелік основного обладнання лабораторій генетичного аналізу

Для обробки матеріалу і виділення ДНК / РНК

За рівнем автоматизації процесу виділення нуклеїнових кислот розрізняють: ручні методи, напівавтоматичні та повністю автоматичні методи.

Для ручного методу виділення нуклеїнових кислот необхідно:

1. Бокс біологічної безпеки не нижче класу II.
2. Центрифуга-вортекс.
3. Мікроцетрифуга від 12 до 16 тис.г для пробірок об'ємом 1,5 мл.
4. Твердотільний термостат з діапазоном робочих температур 25–100 °С.
5. Вакуумний відсмоктувач з колбою–пасткою.
6. Спектрофотометр.
7. Набір автоматичних дозаторів зі змінним об'ємом (5 мм³, 200 мм³ та 1000 мм³).
8. Холодильник на 2–8 °С з морозильною камерою на – 20 °С.

Бокс біологічної безпеки. Розроблений з метою захисту персоналу лабораторії, навколишнього середовища та робочих матеріалів від впливу інфекційних аерозолів і потрапляння часток, утворення яких можливе під час роботи з матеріалами, які вміщують в себе інфекційні складові. Залежно від своєї класифікації пропонують різні рівні захисту від контамінації (забруднення) зразків.

		
<p>Рис. 6.2. Бокс біологічної безпеки (БББ) класу I забезпечує захист для працівників та навколишнього середовища, але не захищає продукт (зразки, проби) від контамінації.</p>	<p>Рис. 6.3. Бокс біологічної безпеки (БББ) класу II забезпечує захист працівників, навколишнього середовища захист від зараження проб за допомогою рециркуляції очищеного через фільтр HEPA повітря в ламінарному вертикальному потоці всередині шафи.</p>	<p>Рис. 6.4. Бокс біологічної безпеки (БББ) класу III забезпечує абсолютний рівень безпеки, який не може бути досягнутий у боксах I та II класах. Бокс має герметичну конструкцію із підтримкою пониженого тиску, що забезпечує додаткову гарантію безпечної роботи.</p>

Центрифуга–вортекс

Центрифуга–вортекс забезпечує відтворення «Спін-Мікс-Спін» технології, призначеної для «скидання» мікрооб'ємів реагентів на дно пробірки (перше центрифугування-спін), подальшого перемішування (мікс) і повторного збору реагентів (повторний спін) зі стінок і кришечки мікропробірок. Максимальна швидкість центрифугування за допомогою центрифуги-вортекс становить 6 тис. об./хв. Призначена для роботи одночасно з 12 пробірками, що дозволяє зекономити час пробопідготовки та є необхідним інструментом для проведення ПЛР-аналізу.



Рис 6.5. Центрифуга-вортекс «Мультиспін» «MSK-6000», Biosan

Мікроцентрифуга

Мікроцентрифуга – лабораторний прилад для високошвидкісного осадження часток, що дозволяє підтримувати такі методики обробки мікрооб'ємів зразків, як, наприклад, виділення нуклеїнових кислот та білків. Забезпечує високі максимальні значення відносної відцентрової сили, залежно від моделі, до 13 тис. об/хв, 17 тис. об/хв або 21 тис. об/хв та дозволяє працювати як зі складними, так і з простими методиками. Призначена для роботи із пробірками місткістю від 1,5 до 2,0 мл. Конструкція мікроцентрифуг оснащена герметичною кришкою, що надійно герметизує біологічні зразки всередині ротора. Найновіші сучасні моделі із роторами змінного об'єму, наприклад 24×2 мл, а також для центрифугування ПЛР-стріпів 8×8 стріпів, які дозволяють обробляти велику кількість зразків за один цикл.

Міцні матеріали конструкції та аксесуарів стійкі до впливу агресивних хімічних речовин, допускають протягом багатьох років ретельне очищення приладів та автоклавування обладнання, забезпечуючи їх безпечну та надійну експлуатацію.



Рис. 6.6. Мікроцентрифуга «MicroCL 17», Thermofisher

Твердотільний термостат

Термостати твердотільні або Драй-блок, з термоблоками виготовленими з різних металів, застосовують для підтримки заданої температури зразків у пробірках, які вміщені у лунки термоблока. Термостати розрізняють за діапазоном підтримуваних температур, різновидів блоків для пробірок різної місткості та точності підтримки заданої температури. Високою вважають точність $\pm 0,1$ °C від заданої користувачем температури. Термостати, залежно від моделі та фірми виробника, забезпечують діапазон температур від +5 до +130 °C.

Сучасні термостати містять термоблоки для пробірок із різноманітними комбінаціями допустимих об'ємів, наприклад, один термоблок може містити лунки для мікропробірок 1,5 мл та 0,5 мл, або ж комбінацію мікропробірок 1,5 мл, 0,5 мл та 0,2 мл.

Твердотільні термостати містять вбудований вентилятор, що дозволяє охолоджувати термоблок за короткий період час. Рідкокристалічний графічний дисплей полегшує роботу з приладом, дозволяє точно встановлювати і відстежувати всі параметри роботи термостата. Прилад дозволяє проводити методики, які потребують різних температур інкубації на різних етапах одного процесу, а також при прогрівах на високих температурах.

Цифрові темоблоки широко застосовується в лабораторіях наукового і медичного профілю для пробопідготовки, зберігання ферментів, ферментативних реакцій, ампліфікації ДНК, коагуляції сироватки, руйнування гелю для гелелектрофорезу тощо.

На теперішній час з різноманітними технічними характеристиками представлені твердотільні термостати виробництва провідних компаній Biosan, ДНК-технології, ThermoScientific, Eppendorf та ін.



Рис. 6.7. **Цифровий твердотільний термостат «TDB-120», Biosan**
Діапазон робочих температур +25 – +120 °С, точність ±0,1 °С, з алюмінієвим блоком А-103 для мікропробірок 1,5 мл (32 місця), 0,5 мл (21 місце) і 0,2 мл (50 місць)



Рис.6.8. **Цифровий термостат «CompactDryBath S», ThermoFisher**
Діапазон робочих температур +2 – +100 °С, точність ≤ ±0,5 °С, наявні різні комбінації змінних блоків для пробірок різного об'єму від 0,2 мл до 50 мл



Рис.6.9. **Твердотільний термостат «Гном», ДНК-Технологія**
Діапазон робочих температур від кімнатної до 99 °С, точність ±0,5 °С, формат блоку: для пробірок на 1,5 мл – 40 місць, для пробірок на 5 мл – 28 місць. Оснащений теплоізолюючою притискною кришкою для рівномірного нагрівання та запобігання відкривання кришок пробірок

Вакуумний відсмоктувач з колбою–пасткою

Вакуумний відсмоктувач (аспіратор) з колбою-пасткою призначений для аспірації (видалення) слідів спирту (або буфера) зі стінок пробірок типу Еппендорф під час очищення ДНК / РНК та для інших технологій переосадження макромолекул.

Прилад також може бути використаний для рутинних операцій відмивання клітин від живильного середовища та ресуспендування в буфері. Принцип роботи аспілятора полягає в створенні негативного тиску в колбі-пастці за допомогою мікрокомпресора, вбудованого у корпус. Колба-пастка з'єднана поліетиленовою трубкою з наконечником. Рідина видалається з пробірки у колбу-пастку в разі зіткнення наконечника з поверхнею розчину. Для зручності з правого боку приладу може знаходитися міні-штатив-органайзер, призначений для двох пробірок, необхідних для відмивання і зберігання наконечника з метою його повторного використання.

Аспіратор містить аспіраційний мікробіологічний фільтр, який усуває ризик виходу бактерій, вірусів та інфекційних частинок з колби-пастки. Аспіраційний мікробіологічний фільтр – гідрофобен: затримує частинки розміром більше 0,027 мкм, що менше вірусів гепатитів А, В і С, з ефективністю до 99,9 %.

Специфікації аспіраторів різних компаній-виробників відрізняються за об'ємом колби-пастки, тиском вакууму, розмірами, наявними додатковими аксесуарами тощо (рис. 6.9, рис. 6.10).

	
<p>Рис. 6.9. Аспіратор з колбою–пасткою «FTA-1», Biosan Максимальний вакуум – 0,05 Мпа, ємність колби-пастки – 1000 мл, компактні розміри 160 x 210 x 340 мм</p>	<p>Рис. 6.10. Відсмоктувач електричний вакуумний «7А-23В», Біомед Максимальний вакуум – 0,09 Мпа (685 мм рт. ст.), ємність колби пастки – 2500 мл × 2 ємності, розміри 350×305×795 мм</p>

Спектрофотометр

Спектрофотометр – лабораторний прилад, надає дані про спектральні характеристики аналізованих складових та призначений для:

- вимірювання концентрації нуклеїнових кислот: дволанцюгової ДНК, одноланцюгової ДНК, РНК, олігонуклеотидів на довжині хвилі 260 нм;
- визначення концентрації білка з поглинання на довжині хвилі 280 нм;
- визначення чистоти зразка за співвідношенням 260/280 нм;
- ідентифікації речовин та аналізу мікрочастинок;
- визначення щільності клітинних культур;
- кількісного аналізу білків, кон'югатів, металопротеїни;
- розрахунку інтенсивності мічення флуоресцентними барвниками.

Вимірювання концентрації нуклеїнових кислот – це рутинна практика біохімічних, молекулярно-генетичних, фармакологічних, імунологічних мікробіологічних та інших лабораторій.

Визначення концентрації та якості препарату нуклеїнових кислот є одним із ключових початкових етапів в експериментах, що використовують ПЛР, кількісну ПЛР, фрагментний аналіз та секвенування нового покоління. Необхідно враховувати, що оцінювання вихідного матеріалу перед ставленням експерименту за дороговартісними реагентами набуває вирішального значення.

Спектрофотометричний аналіз з використанням кювет

Пристрій спектрофотометрів та їх характеристики можуть значно відрізнитися залежно від виробника і завдань, для вирішення яких розрахований прилад. Однак основні елементи конструкції у всіх приладів подібні. Це джерело світла, монохроматор, кюветне відділення зі зразком та реєструючого детектора.

Монохроматор – пристрій для виділення із загального випромінюваного спектра окремої вузької його частини (1–2 нм).

Спектрофотометр має два джерела світла: для видимої ділянки спектра (VIS) та джерело ультрафіолету (UV) від 100 до 390 нм. Також у деяких приладах можуть додатково застосовувати набори світлофільтрів.

Наявне кюветне відділення спектрофотометра, для вміщування кювети з досліджуваним зразком, яке додатково може бути обладнано механізмами для термостатування, перемішування, додавання речовин безпосередньо у ході вимірювання.

Схему приладу можна відобразити таким чином (рис. 6.11).

Таку схему спектрофотометра називають однохвильовою. Для вимірювання поглинання один і той самий монохроматичний промінь світла необхідно по чергові пропускати через кювету зі зразком та кювету з розчинником, який виступає як контрольний.

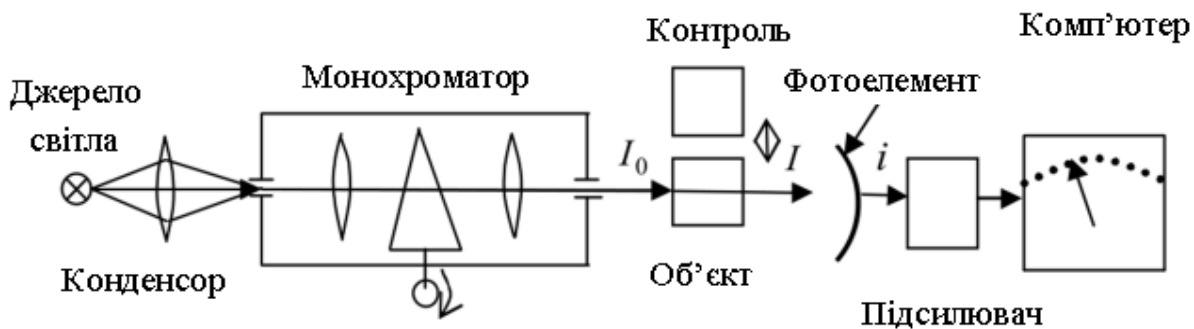


Рис.6.11. Схема будови спектрофотометра

Сучасні моделі спектрофотометрів побудовані за двохвильовим принципом. У цьому типі спектрофотометрів монохроматичний промінь періодично направляється обертовим дзеркалом по двох каналах, в один з яких поміщається кювета зі зразком, а в іншій – кювета з розчинником. Промені проходять зразок і контроль в протифазі, при цьому різницю в інтенсивності реєструють фотометричною системою з подальшою інтерпретацією результату.

Різні фотометричні функції, зокрема одно та декілька хвильовий аналіз, у поєднанні з методами кінетики забезпечують сканування у широкому діапазоні довжини хвилі на рівні від 190 нм до 1100 нм.

Приклад кюветного спектрофотометра відображено на рис. 6.12.



Рис.6.12. Спектрофотометр з кюветним відділенням та сенсорним дисплеєм «DS-C», DeNovix

Спектрофотометричний аналіз без кювет. Для досліджень мікрооб'ємів речовин використовується безкюветна технологія, коли зразок утримується за рахунок сил поверхневого натягу рідини. Інноваційні технології дозволяють проводити точні вимірювання мікрооб'ємів зразка на рівні від 0,3 мм³.

Для проведення спектрофотометричного аналізу краплю зразка наносять на нерухомий модуль приладу. Зверху на краплю опускають рухомий модуль приладу, як результат із зразка формується стовпчик рідини між рухомим та нерухомим модулями. Висота стовпчика регулюється автоматично. Прилад вимірює поглинання світла у променях VIS / UV у стовпчику зразка (рис. 6.13, рис. 6.14).

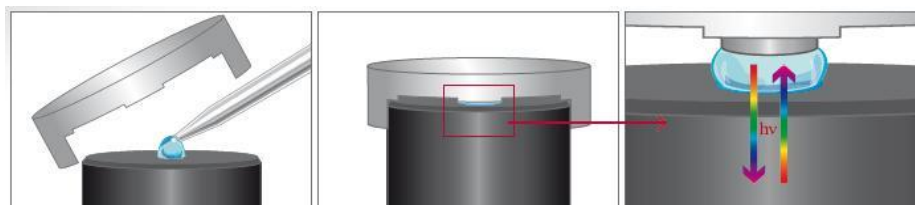


Рис. 6.13. Схема спектрофотометричного аналізу без кювет



Рис. 6.14. Спектрофотометр для аналізу без кювет «NanoDrop 2000/2000c»,
ThermoScientific

Автоматичні дозатори

Автоматичні дозатори – це піпеточні прилади поршневого типу. Дозатори мають відповідати ГОСТ та ISO 9001:2000 за точністю вимірювань і відтворюваністю.

Принцип роботи дозаторів заснований на повітряному витісненні рідини. Дозування відбувається за рахунок переміщення поршня у вимірювальному циліндрі. При цьому поршень або зменшує обсяг повітря під ним, або збільшує. Якщо наконечник дозатора поміщений в рідину, то в разі збільшення обсягу між рідиною і поршнем рідина буде прагнути заповнити звільнений під поршнем об'єм простору. Таким чином, у наконечник дозатора увійде об'єм рідини, еквівалентний об'єму, який звільнився під поршнем під час його переміщення. Коли необхідно скинути забрану рідину з дозатора, поршень рухається в напрямку наконечника і зменшує обсяг повітря між рідиною і поршнем, таким чином, рідину витісняє повітря з наконечника повністю.

Розрізняють дозатори змінного або фіксованого об'єму, електронні та ручні механічні, одно- та багатоканальні.

Лабораторні дозатори фіксованого об'єму розраховані на відбір та дозування конкретно встановленого об'єму речовини. Дозатори змінного об'єму дозволяють здійснювати забір рідини у широкому діапазоні значень мікрооб'ємів.

Ручні механічні дозатори передбачають дозування набраної рідини шляхом обертання єдиної головки плунжера (рис. 6.15).



Рис. 6.15. Ручні механічні одно- та восьмиканальні дозатори змінного об'єму, *Eppendorf*

Під час використання електронних дозаторів розряд об'єму дозування виставляють та коригують шляхом управління показниками на екрані дозатора (рис. 6.16). Такі дозатори дозволяють попередньо програмувати багатокрокові процеси для вирішення специфічних завдань та надають можливості користувачеві задавати об'єм дозування значно швидше, ніж у стандартних ручних механічних дозаторах.



Рис. 6.16. Електронні одно- та восьмиканальні дозатори змінного об'єму, *Picus®* and *Picus® Nxt*

Автоматичні дозатори виготовляються із сучасних високоякісних пластиків, стійких до хімічно активних середовищ, що дозволяє користувачеві працювати з різноманітними рідинами, як з розчинами, так і з концентрованими рідинами.

Автоматизація процесів виділення ДНК / РНК

Ефективність виділення ДНК та РНК значно підвищиться, якщо використовувати для цих цілей спеціальні прилади. Зниження кількості ручних операцій на стадії виділення нуклеїнових кислот веде до збільшення продуктивності, скорочення часу, зниження ризику перехресної контамінації, стандартизації процесу виділення та зниження ймовірності появи помилок у роботі оператора.

Розроблено прилади автоматизації процесу виділення нуклеїнових кислот, тим самим підвищується швидкість і продуктивність виділення. Використання автоматичних систем особливо корисне під час виділення РНК, яка швидко інактивується під впливом різних РНКаз. Для таких цілей розроблено прилади: QIASymphony SP/AS (Qiagen) (рис. 6.17), Neon-100 (Xiril) (рис. 6.18), MagMAX™Express-96 (AppliedBiosystems) (рис. 6.19) [І.В. Дзюблик, 2012].



Рис. 6.17. Прилад QIASymphony SP/AS, Qiagen

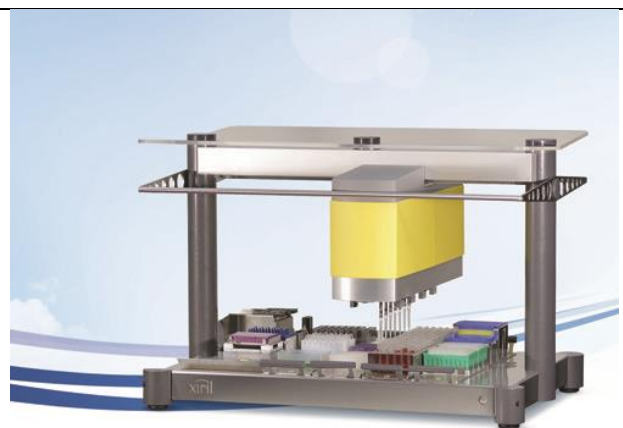


Рис. 6.18. Прилад Neon-100, Xiril



Рис. 6.19. Прилад MagMAX™Express-96, AppliedBiosystems

Обладнання, необхідне для приготування ПЛР ампліфікації:

1. ПЛР-бокс;
2. термоциклер або ампліфікатор для проведення ПЛР в режимі реального часу;
3. центрифуга-вортекс;
4. набір автоматичних дозаторів змінного об'єму;
5. холодильник побутовий;
6. морозильна камера.

ПЛР-бокс

ПЛР-бокс призначений для стерильних робіт UVC / T-M-AR застосовується для чистої роботи з ДНК-пробами. Забезпечує захист від контамінації. Усі моделі боксів є настільними, виготовлені з металевої рами, скла і робочої поверхні, виконаної з нержавіючої сталі (рис. 6.20).

Бокси оснащені однією відкритою УФ-лампою, встановленою у верхній частині боксу. УФ-випромінювання дезінфікує робочу поверхню, інактивують фрагменти ДНК / РНК протягом 15–30 хвилин. Наявний цифровий таймер контролює тривалість прямого ультрафіолетового опромінення. Лампа денного світла в середині боксу забезпечує освітлення робочого місця.

Крім того, бокси оснащені бактерицидним проточним УФ-рециркулятором повітря AR, що забезпечує постійне дезінфікування всередині боксу під час роботи. Рекомендовані під час роботи з ДНК / РНК ампліконами.



Рис. 6.20. УФ-бокс для ПЛР UVC/T, Biosan

Термоциклер

Ампліфікатор ДНК, термоциклер (amplifier, thermalcycler) – прилад, який використовується для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Прилад автоматично підтримує потрібну кількість циклів реакції і оптимальні тимчасові і температурні параметри для кожного циклу.

Розрізняють класичні ампліфікатори та ампліфікатори для проведення ПЛР у режимі реального часу.

Класичні ампліфікатори призначені для проведення ПЛР з подальшою інтерпретацією результатів за використання додаткових методів та обладнання для візуалізації ПЛР-продуктів та інтерпретації результатів шляхом горизонтального електрофорезу, капілярного електрофорезу та інших методів. Наприклад, до класичних ампліфікаторів відносять ампліфікатор VeritiWell (Applied Biosystem) (рис. 6.21), MiniAmp™ (Applied Biosystem) (рис. 6.22), Mastercycler (Eppendorf) (рис. 6.23) тощо.

		
Рис. 6.21. Ампліфікатор VeritiWell, Applied Biosystem	Рис. 6.22. Ампліфікатор MiniAmp™, Applied Biosystem	Рис. 6.23. Ампліфікатор Mastercycler, Eppendorf

Ампліфікатори для проведення ПЛР у режимі реального часу (Real-Time) – це багатофункціональні пристрої, що поєднують у собі функції стандартного ампліфікатора та флуоресцентного детектора. Систему ПЛР використовують для проведення полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу, яка відрізняється від класичної ПЛР детекцією та кількісними обчисленнями кількості одержуваної ДНК [S. A. Bustin, 2004; Ball, 2003].

Завдання, які вирішують за використання ампліфікаторів RealTime:

- якісна ПЛР-аналізу, що забезпечує:
 - 1) виявлення збудників широкого спектра інфекційних захворювань;
 - 2) одночасне визначення декількох збудників у досліджуваному матеріалі для генотипування мікроорганізмів;
 - 3) кількісний ПЛР-аналіз;
 - 4) визначення вірусного навантаження в разі інфекцій;
 - 5) визначення концентрації генетично-модифікованих інгредієнтів;
 - 6) оцінювання рівня експресії генів;
 - 7) проведення альтернативної ампліфікаційної технології для підтвердження результатів і виявлення життєздатних збудників (NASBA-аналіз);
 - детекція флуоресценції по кінцевій точці;
 - для плавлення ПЛР-продуктів з високою роздільною здатністю (HRM), аналізу точкових мутацій ДНК / РНК, HLA-скринінгу, аналізу епігенетичного метилювання.

Ампліфікатори *Real-Time* поділяють на ампліфікатори пляшкового та роторного типу з кількістю каналів для детекції флуоресцентних барвників від 4 до 6 каналів. За своїми функціональними та технічними характеристиками прилади досить подібні, проте можливість застосування різних технологій подачі потоку прогрітого повітря дозволила уникнути недоліків, пов'язаних із виникненням крайового ефекту в разі використання ампліфікатора пляшкового типу.

Ампліфікатор пляшкового типу – це багатофункціональна система ПЛР у режимі реального часу, яка має пляшковий формат термоблока. Прогрів до робочих температур та зміна градієнта температур відбувається шляхом подачі нагрітого повітря через кришку ампліфікатора.

Ампліфікатор роторного типу – ампліфікатор, який має кільцевий (роторний) дизайн реакційного блоку (рис. 6.24). Технологія прогріву реакційних сумішей у пробірках передбачає рівномірний розподіл гарячого повітря по всій поверхні пробірок з реакційною сумішшю.



Рис. 6.24. Ампліфікатор роторного типу Rotor-Gene Q, Qiagen

Обладнання, необхідне для детекції результатів ПЛР-дослідження методом горизонтального електрофорезу:

1. Камера для електрофорезу з блоком живлення (джерело постійного струму), кюветою для формування агарозного гелю, гребінки для формування лунок у гелі;
2. Транслюмінатор;
3. Гель-документуюча станція.

У разі використання ПЛР у класичному форматі детекція ампліконів здійснюють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Окрім того, цей метод дозволяє перевірити якість виділеної ДНК для проведення подальших досліджень.

Електрофорез— це електрокінетичне явище переміщення частинок дисперсної фази (колоїдних або білкових розчинів) у рідкому або газоподібному середовищі під дією зовнішнього електричного поля.

Горизонтальний електрофорез в агарозному гелі – стандартний метод, який використовують для розділення, ідентифікації та очищення ДНК та РНК.

Детекція на спеціальних гельдокументуючих системах дозволяє візуалізувати результати за допомогою флюоресціюючого та інтеркалюючого барвника етидію бромистого. За допомогою бромистого етидію в ультрафіолетових променях візуально можливо виявити близько 0,1 мкг нуклеїнових кислот. Метод не передбачає кількісного визначення.

Камера для горизонтального електрофорезу

Камера для горизонтального електрофорезу – пристрій відносять до лабораторної техніки, а саме до приладів для розділення заряджених молекул методом електрофорезу в горизонтальному гелі, і призначений для електрофоретичного аналізу біологічних макромолекул. Пристрій можна застосовувати для лабораторного аналізу білків та нуклеїнових кислот, зокрема і для детекції ПЛР-продуктів.

На сьогоднішній день, прилади для горизонтального гель-електрофорезу, як правило, являють собою модифікації пристроїв, запропонованих Шефнер (1), Лорелла (2) або Віме (3), в яких агарозний гель розміщують на окремій скляній чи пластиковій пластинці або в спеціальній ванночці. Пластинку встановлюють на платформі приладу таким чином, щоб гель знаходився безпосередньо під поверхнею буферного розчину для проведення електрофорезу. Опір геля мало відрізняється від показника опору буферного розчину для електрофорезу – тому через гель проходить значна частина струму.

Камера містить захисну кришку та шнури для під'єднання до електроживлення – джерела постійного струму (рис. 6.25).

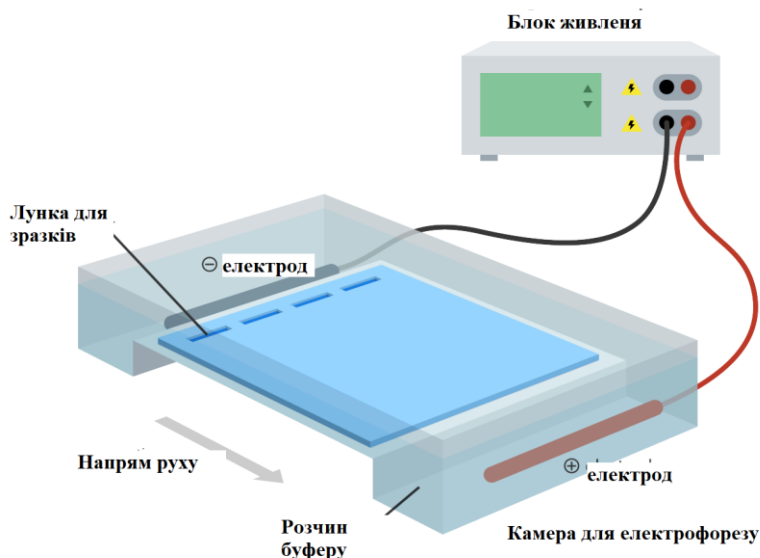


Рис. 6.25. Камера для горизонтального електрофорезу в агарозному гелі

Трансліюмінатор та гель-документуюча станція

Залежно від методики детекції продуктів ПЛР-ампліфікації необхідними може бути обладнання для проведення електрофорезу зі системою документації – гель-документуюча станція або трансліюмінатор, для візуалізації даних розділення продуктів ПЛР в УФ-променях.



Рис. 6.26. Гель-документуюча станція, *BioRad*



Рис.6.27.Трансліюмінатор, *Coleparmer*

Альтернативною заміною в разі застосування методики ПЛР з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією «за кінцевою точкою» використовують спеціальний детектор типу «Джин» (рис. 6.28) або «Ала ¼» (рис. 6.29), який доцільно встановлювати в ампліфікаційній, з'єднавши його з комп'ютером з визначеною операційною системою відповідно до використовуваного обладнання.



Рис. 6.28. Детектор флуоресцентний «Джин-4», ДНК-технологія



Рис. 6.29. Детектор флуоресцентний «Ала ¼», *Biosan*

Основне обладнання, необхідне для детекції результатів ПЛР-дослідження методом капілярного електрофорезу:

1. генетичний аналізатор;
2. термоциклер;
3. центрифуга-вортекс;
4. холодильник побутовий;
5. морозильна камера.

Генетичний аналізатор

Генетичний аналізатор – прилад для аналізу флуоресцентно-мічених фрагментів ДНК з використанням методу капілярного електрофорезу і може бути широко використано для різних видів генотипування, що застосовують:

- у криміналістиці, під час створення геномних баз даних для ідентифікації особи, встановлення спорідненості і вирішення питань спірного батьківства;
- для ДНК-аналізів у сільському господарстві за селекції і паспортизації цінних порід тварин, сортів рослин та ін.;
- для діагностування онкологічних та інфекційних захворювань і моніторингу перебігу захворювань;
- для діагностування спадкових захворювань, а також схильності до них;
- для розшифрування генома людини, тварин і рослин;
- для пошуку і вивчення нових генів, відповідальних за важливі фізіологічні процеси (рак, старіння і ін.).

Принцип роботи капілярного генетичного аналізатора передбачає систему для збудження і детекції випромінювання від безлічі капілярних каналів, що розташовані на поперечно-скануючому столику. Кінці капілярів, поміщені в катодну та анодну ванночки, під'єднані до джерела високої напруги. Лазерне джерело опромінює капіляри в зоні детекції, а оптичний сигнал перетворюється оптичною системою, що містить об'єктив, який фокусує лазерне випромінювання та збирає флуоресцентний сигнал, дихроїчне дзеркало, відображає лазерне випромінювання та спрямовує його в об'єктив, а також пропускає флуоресцентний сигнал, два світлофільтри, один з яких відрізає відбите від капіляра лазерне випромінювання, а другий – інтерференційний світлофільтр. Пройшовши таку оптичну систему, сигнал реєструється фотоелектронним помножувачем (ФЕП). В одному з варіантів реалізації пристрою, флуоресцентний сигнал може поділитися на чотири еквівалентних пучка, кожен з яких пропускають через відповідний інтерференційний світлофільтр і реєструють ФЕП. Сигнал з ФЕП після посилення надходить у комп'ютер для відповідної обробки (патент США N 5274240, МПК 6 G 01 N 21/64, опубл. 1993 р.).

На сьогоднішній день, генетичні аналізатори (секвенатори) від компанії *Applied Biosystems (Life Technologies)* представлять золотий стандарт

капілярного електрофорезу. Моделі мають від 4 до 8 капілярів і пропонують повну автоматизацію досліджень. Використовуються для проведення секвенування *denovo* та ресеквенування, а також фрагментного аналізу: LOH, AFLP, дослідження однонуклеотидних поліморфізмів (SNPs), Микросателитная аналіз, HLA-типування, MLPA дослідження, та ін.



Рис. 6.30. Генетичний аналізатор (секвенатор) «ABP 3500»,
AppliedBiosystems

Сучасною найефективнішою технологією є використання мікрочіпів на основі однонуклеотидного поліморфізму – SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Цей метод дозволяє робити генетичний аналіз максимально спеціалізованим, дозволяє вивчати відмінності тканин одного організму. Методика цього методу на сьогоднішній день є досить дорогою, тому його доступність обмежена.

Останнє десятиліття наукові дослідження у молекулярній генетиці присвячено вивченню одиничних замін нуклеотидів (SNP). Величезна їх кількість у геномах кожного виду сільськогосподарських тварин та новітні технології для генотипування за цим типом маркерів, відпрацьовані у провідних наукових лабораторіях, витісняють інші типи маркерів зі сфери досліджень генетичного різноманіття видів та порід.

Система NextSeq 550 (рис. 6.31) – потужна високопродуктивна система секвенування з високою якістю даних, що забезпечує гнучку потужність, необхідну для секвенування цілого генома, транскриптома та цільового перерозподілу, а також можливість сканувати мікрочіпи, зокрема Infinium Methylation EPIC BeadChip та інші вибрані BeadChips.



Рис. 6.31. Сканер мікрочіпів ДНК/РНК NextSeq 550, *Illumina*
A – відділення для зразків або мікрочіпів; B – монітор; C – лінія стану роботи приладу – вказує на становище інструменту: робочий (синій), вимагає уваги (помаранчевий), готовий до секвенування (зелений) або вимкнеться у наступних 24 години (жовтий); D – відсік для картриджів з буферним розчином; E – відсік для картриджів з реагентами

Для кожного етапу досліджень необхідно передбачити наявність окремих холодильників для зберігання реагентів та проб.

У кімнаті прийому, реєстрації, розбирання і первинної обробки матеріалу встановлюють холодильну камеру плюс 4 ± 2 °C та морозильну камеру мінус 18 ± 2 °C.

У кімнаті виділення нуклеїнових кислот встановлюють холодильну камеру плюс 4 ± 2 °C для зберігання набору реагентів та морозильну камеру на мінус 18 ± 2 °C для тривалого (до одного року) зберігання ДНК / РНК. Для більш тривалого (від одного року) зберігання ДНК / РНК встановлюють морозильну камеру на мінус 70 °C.

У кімнаті приготування реакційних сумішей для ПЛР встановлюють холодильні камери плюс 4 ± 2 °С та морозильну камеру мінус 18 ± 2 °С – для зберігання наборів реагентів для приготування ПЛР-суміші.

У кімнаті детекції продуктів ПЛР-ампліфікації для зберігання реагентів для електрофоретичної детекції розміщують холодильну камеру плюс 4 ± 2 °С [І.В. Дзюблик, 2012].

6.3. Основні технічні вимоги до лабораторій, облаштування робочих місць, вимоги до приміщення

Організація роботи ПЛР-лабораторій в Україні здійснюють відповідно до Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти (БПА) I–IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» (Наказ Міністерства охорони здоров'я від 24.01.2008 № 26.), які встановлюють вимоги до приміщень лабораторій і порядку організації і проведення в них робіт.

Правила поширюються на лабораторії (відділи, відділення) мікробіологічного профілю установ охорони здоров'я (далі – лабораторії), закладів науки та освіти, спеціалізовані лабораторії незалежно від їх підпорядкування та форм власності, що проводять молекулярногенетичні дослідження з БПА I-IV груп патогенності або матеріалом, підозрюваним на їх вміст, дослідження з контролю об'єктів довкілля, харчових продуктів та продовольчої сировини за показниками безпеки, а також на наявність генетичномодифікованих джерел (далі – ПЛР-лабораторії).

Роботу з БПА I-IV груп патогенності методом ПЛР проводять за наявності дозволу Державної санітарно-епідеміологічної служби України на право роботи (далі – дозвіл на роботу) із збудниками I-IV групи патогенності (небезпечності), токсинами, рекомбінантними молекулами ДНК, відповідно до постанови Кабінету Міністрів України від 22.06.99 N 1109 (1109-99-п) «Про затвердження Положення про державний санітарно-епідеміологічний нагляд в Україні».

Організацію робіт на етапах прийому, розбору, первинної обробки матеріалу, підготовки проб і виділення НК, а також знезараження проб проводять відповідно до вимог ДСП 9.9.5.035.99 «Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності», затверджених постановою головного державного санітарного лікаря України від 01.07.99 N 35 (далі – ДСП 9.9.5.035.99), та ДСП 9.9.5.-080-2002 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) державного санітарного лікаря України» від 28.01.2002 N 1 (v0001588-02) (далі – ДСП 9.9.5.-080-2002).

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

Роботу з ПЛР-діагностування організовує і проводить фахівець з вищою спеціальною освітою, який має сертифікат лікаря-спеціаліста з лікарських спеціальностей «бактеріологія», «вірусологія» або «мікробіологія і

вірусологія» та пройшов курси спеціалізації, стажування або інші види підготовки, має необхідну за програмою теоретичну і практичну підготовку за своєю спеціальністю, відповідно до Положення про порядок проведення атестації лікарів, затвердженого наказом МОЗ України від 19.12.97 N 359 (z0014-98), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 14.01.98 за N 14/2454.

Приймання матеріалу, ведення записів у журналах, виконання допоміжних маніпуляцій під час проведення досліджень та деяких етапів аналізу, дезінфекцію, знешкодження матеріалу тощо здійснюють лаборанти, які отримали свідоцтво про проходження підвищення кваліфікації та перепідготовки молодших медичних та фармацевтичних спеціалістів відповідно до Положення про Свідоцтво про проходження підвищення кваліфікації та перепідготовки молодших медичних та фармацевтичних спеціалістів (z0208-93), затвердженого наказом МОЗ України від 07.09.93 N 198 (z0206-93), зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 31.12.93 за N 208.

Кваліфікаційні вимоги до працівників лабораторій викладені у Довіднику кваліфікаційних характеристик професій працівників. Випуск 78. Охорона здоров'я (va117282-02), затвердженому наказом МОЗ України від 29.03.2002 N 117 (v0117282-02).

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

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

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

Лабораторію забезпечують аптечкою стандартної комплектації для надання першої медичної допомоги.

Для виконання досліджень за методом NASBA-Real-Time вимоги до організації роботи такі самі, як і для ПЛР-лабораторій, що використовують флуоресцентну детекцію [І.В. Дзюблик, 2012].

Загальне планування приміщення ПЛР-лабораторії, розміщення у ній робочих та допоміжних зон здійснюється відповідно до переліку молекулярно-біологічних методик, які використовуватимуть у цій лабораторії.

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

«Чиста» зона:

- приміщення прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу;
- приміщення для виділення НК;
- приміщення приготування реакційних сумішей та ампліфікації.

«Брудна» зона:

- приміщення детекції продуктів ампліфікації (за застосування методів електрофорезу) – форезна;
- секвенаторна.

Принципову схему організації ПЛР-лабораторії наведено на рис. 6.32.

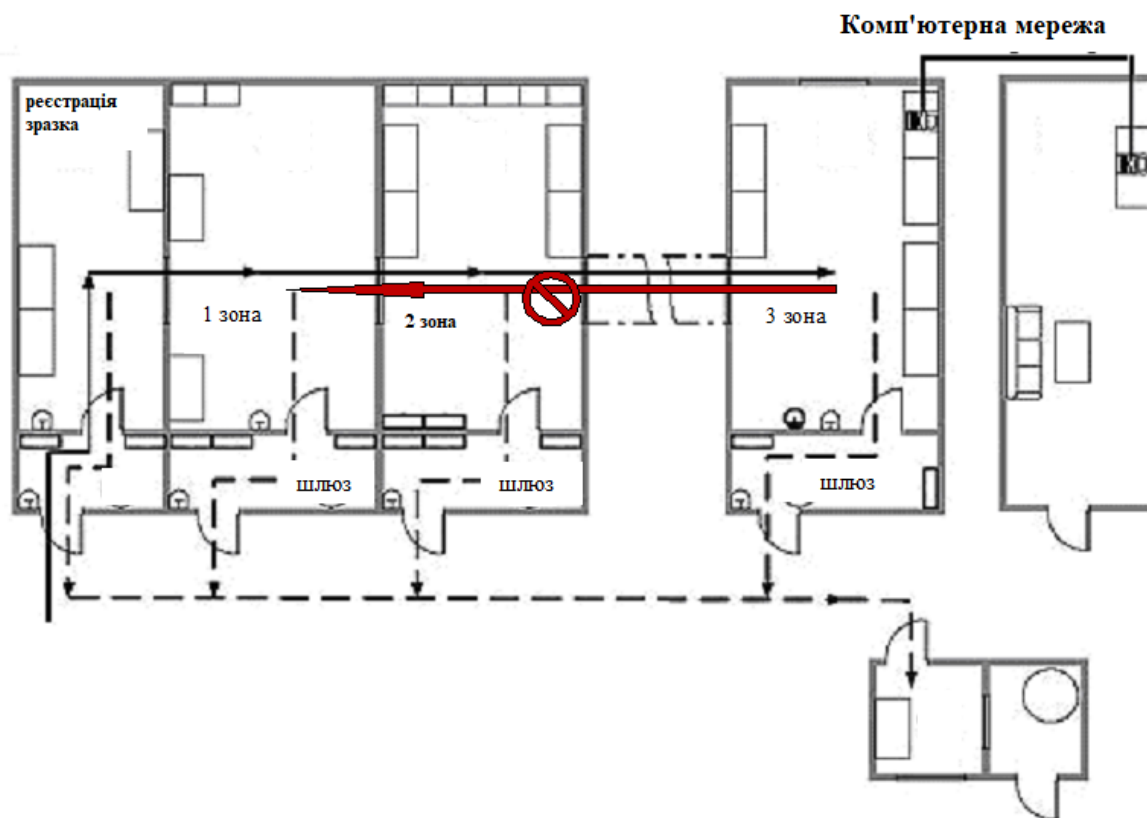




Рис. 6.32. Принципова схема організації ПЛР-лабораторії

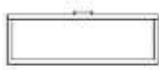
Умовні позначення:

 – раковина;



– пристрій для зливу води після вологого прибирання приміщення

 – автоклав;



– шафи в передбоксах (для одягу) і боксах;



– вікно-шлюз;



– рух досліджуваного матеріалу;



– рух відпрацьованого матеріалу.

Робочі приміщення ПЛР-лабораторії мають бути непрохідними і створеними за типом боксів з передбоксами. Площа кожного із робочих приміщень ПЛР-лабораторії має бути не меншою ніж 12 м^2 на одне робоче місце, у тому числі передбоек не менше 2 м^2 . У разі збільшення робочих місць площу слід збільшувати на 6 м^2 на кожне робоче місце, тобто:

$$S = 12 + 6 \times (n-1)m^2,$$

де n – кількість робочих місць.

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

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

Усі маніпуляції, що супроводжуються ризиком утворення аерозолів (струшування, центрифугування тощо), під час обробки матеріалу виконують у боксах безпеки II або III класу (залежно від групи патогенності мікроорганізму, наявності якого підозрюють у досліджуваному матеріалі).

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

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

Приміщення для проведення ампліфікації має бути окремим. У ньому проводять приготування реакційної суміші, внесення до пробірки для ПЛР виділених препаратів ДНК або комплементарної ДНК (далі –кДНК), зворотну транскрипцію (далі – ЗТ) РНК та ампліфікацію ДНК або кДНК.

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

У ПЛР-лабораторіях з великим обсягом однотипних досліджень для приготування реакційної суміші обладнують окрему боксовану кімнату, яка

функціонально, через шлюзове вікно, пов'язана з кімнатою для внесення виділених препаратів НК та проведення ампліфікації.

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. Не допускається використання піпеток та посуду, призначених для електрофорезу, застосовувати для інших методів досліджень.

У разі використання в ПЛР-лабораторії методу ПЛР з флуоресцентною детекцією як єдиного методу окрему кімнату детекції продуктів ампліфікації не організовують (рис. 6.33).

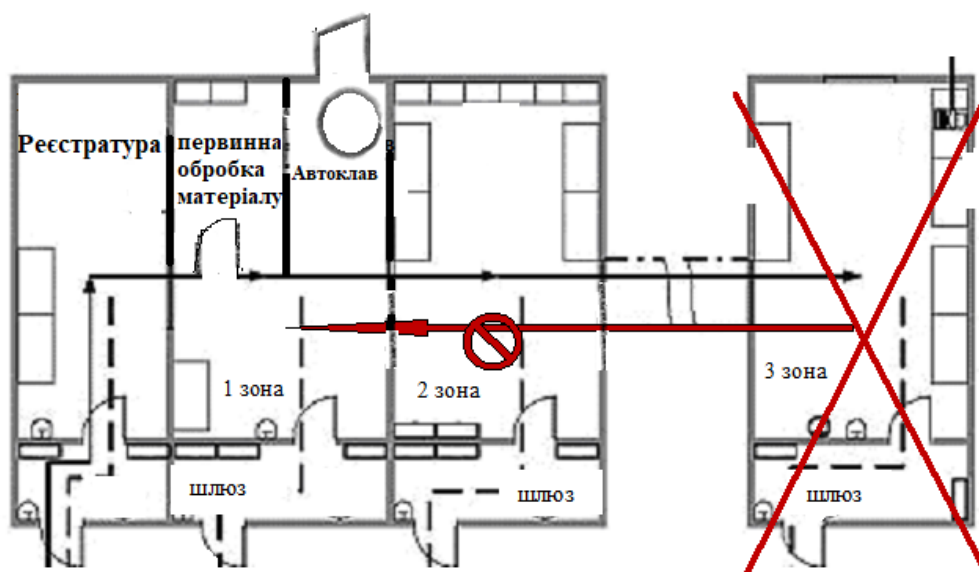


Рис. 6.33. Принципова схема ПЛР-лабораторії з використанням гібридизаційно-флуоресцентної детекції

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

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

Приміщення секвенаторної влаштовують за типом бокса з передбоксником загальною площею не менше 12 м^2 , в тому числі 10 м^2 – робоча кімната. Передбоксник обладнують водопостачанням та каналізацією.

Підготовка зразка для завантаження його у секвенатор складається з кількох основних етапів (та може розрізнятися в залежно від методики, що використовують):

- виділення НК з клінічного матеріалу проводять у кімнаті виділення НК, як для ПЛР у класичному форматі;
- ампліфікація ділянки НК, що охоплює зону інтересу (якщо це РНК - необхідним є етап ЗТ для отримання кДНК), проводять в приміщенні ампліфікаційної;
- очищення отриманого ампліфікованого продукту ПЛР-реакції (від праймерів, залишкових дезоксинуклеотидів, ферментів, матричної НК, неспецифічних ПЛР-продуктів) проводять у форезній. Використовують такі методи очищення: за допомогою електрофорезу в агарозному гелі; на колонках; ферментативне очищення;
- оцінювання якості / кількості ДНК (з подальшим розведенням за необхідності) за допомогою агарозного електрофорезу чи спектрофотометрично проводять у форезній;
- проведення ПЛР з використанням термінаторів проводять у секвенаторній;
- доочищення отриманого ампліфікованого продукту після реакції з термінаторами (від солей, надлишкових дидезоксинуклеотидів) проводять у форезній. Використовують такі методи очищення: очищення етанолом, ізопропанолом, гель-фільтрація, мембранна фільтрація;
- ресуспендування зразка (у формаміді або воді) проводять у форезній;
- завантаження зразка у секвенатор.

Планувальні рішення і розміщення обладнання мають 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.

ПЛР-лабораторію має бути обладнано водопроводом, каналізацією, забезпечено електрикою і опалюванням відповідно до чинного законодавства. Усі приміщення лабораторії мають бути забезпечені достатнім природним і штучним освітленням. Упередбокснику кожної робочої кімнати має бути раковина для миття рук.

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

Кратність обміну повітря в приміщеннях ПЛР-лабораторії має відповідати значенням, наведеним у табл. 6.1.

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

Найменування приміщення	Приток: кратність обміну повітря, м ³ /год	Витяжка: кратність обміну повітря м ³ /год
Зона прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки біоматеріалу	5	6
Зона виділення НК	5	6
Зона приготування реакційних сумішей та проведення ПЛР	5	5
Зона детекції продуктів ампліфікації методом електрофорезу	5	7

Припливно-витяжна вентиляція має бути обладнано окремо для «чистої» та «брудної» (форезна та зона ГФА) зон ПЛР-лабораторії.

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

За необхідності в ПЛР-лабораторії може бути встановлено кондиціонери за умови використання їх під час технологічних перерв. Під час роботи з досліджуваним матеріалом кондиціонери мають бути вимкнені.

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

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

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

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

ПЛР-лабораторію має бути забезпечено телефонним зв'язком, комп'ютерною та оргтехнікою, під'єднаною до локальної електронної мережі.

ПЛР-лабораторію забезпечують засобами пожежогасіння.

6.4. Рекомендації ICAR щодо акредитації лабораторій. Світові вимоги до лабораторій, правила акредитації. Принципи роботи референс-лабораторій

Дослідження в молекулярній біології, особливо геноміці, забезпечують новою інформацією про промислових тварин. З одного боку, використання молекулярної інформації може сприяти довірі споживача в можливості моніторингу та контролю за етапами виробництва продукції тваринництва. З іншого боку, молекулярна інформація позитивно впливатиме на досягнення в генетичних удосконаленнях тваринних рис, через використання геномної селекції, маркерів, генної інтрогресії, прогнозування гетерозису, перевірка / прогнозування родоводів та статус генетичного дефекту у носія. У більшості випадків, переваги у використанні молекулярної інформації через геномне оцінювання, виходить із підвищеної точності селекційної цінності тварин, скорочення інтервалів генерації та підвищення інтенсивності селекції. Навіть, враховуючи такі досягнення, все ще існує потреба в дослідженнях та розробках для пошуку асоціації між генетичними маркерами та корисними ознаками. Крім того, навіть із цим включенням геномної інформації до схем відбирання необхідним є розуміння дії генів, генних взаємодій та диференційної експресії генів, щоб уникнути негативного колатерального ефекту. Співпраця між тваринницькою індустрією та дослідженнями необхідна для успішного пошуку генетичної інформації в комерційних популяціях тваринництва [ICAR Guidelines].

6.4.1. Генетичні маркери

Генетичні маркери є основними молекулярними інструментами генетики. Як перші ДНК-маркери починаючи з 1960-х років, у тваринництві використовували вивчення груп крові, пізніше розпочали вивчення мікросателітів (MS), а з 1990-х дотепероднонуклеотидного поліморфізму (SNP). SNP та MS є поліморфічними частинами ДНК (алелі) для специфічного локусу конкретної хромосоми.

Мікросателіти – це ділянки ДНК, що містять тандемні нуклеотидні повтори, зазвичай динуклеотидні або тринуклеотидні. Ці сегменти розповсюджені по всьому геному та є некодуючими ділянками, які не піддаються селективному тиску. Мікросателіти зазвичай використовують для встановлення рівня генетичної спорідненості, визначення між- та внутрішньовидового поліморфізму, встановлення походження різних видів та популяцій загалом.

Однонуклеотидний поліморфізм (SNP) є найбільш поширеним типом генетичної мінливості: кожен SNP являє собою мінливість в одиничному нуклеотиді. Існує безліч SNP, розташованих по всьому геному кожного виду тварини. Для геноміки найбільш інформативними SNP традиційно є: або розташовані в (а) кодуєчій області, де різні алелі змінюють структуру або функцію кодованого білка, або (b) в некодуючих областях, які беруть участь у

регуляторній функції гена. Для геномних значень селекції, SNP, які розташовані в інших частинах генома, також є інформативними, оскільки вони можуть бути у невірному зв'язку з алелями, які викликають фенотипічні зміни.

Однією з переваг є розміщення на SNP комплексів із міцною паралельною обробкою даних, за допомогою якої можуть бути перевірені тисячі або сотні тисяч SNP, що є економічним і ефективним методом перевірки великої кількості тварин. Сьогодні за цією схемою найбільші лабораторії генотипування тварин можуть обробляти понад 100 000 тварин на рік. Таким чином, наявність великих панелей SNP сприяє пошуку мутацій, що лежать в основі генетичної варіації простих і складних ознак. Це також прискорює час виявлення ознак, пов'язаних із генами або частинами генів та швидкість прийняття стратегій геномного відбору.

Терміни та визначення

Таблиця 6.2

Огляд термінів, що використовують у молекулярній генетиці, геноміці та аналізі походження

Термін	Визначення
1	2
Підтвердження ідентифікації тварин	Це процес, в якому за допомогою геномних маркерів можна довести приналежність певного зразка тканини до певної тварини
Геноміка	Спектр технологій, які визначають генетичний склад тварини на рівні гена і послідовності ДНК генома тварини
Гаплотип	Група алелів генетичних маркерів, які разом успадковуються від одного з батьків. Генетичні маркери знаходяться на одній хромосомі і зазвичай містять певну довжину сегмента на цій хромосомі
Акредитація ICAR	Визнання ICAR, що організація надала достатні докази того, що вона відповідає всім вимогам ICAR
Імпуція	Процес заповнення відсутніх генотипів тварини на основі родоводів та інших генетичних маркерів. Зазвичай використовують на основі SNP та / або мікросателітної імпуції від SNP
MAF	Частота мінорних алелів
Прогнозування предків по материнській лінії	Процес, за допомогою якого гаплотипи, успадковані від самки, використовуються для прогнозування ймовірного самця

1	2
Мікросателіти	Сегменти ДНК, що містять тандемні нуклеотидні повтори, зазвичай з динуклеотидною або тринуклеотидною структурою. Також називаються STR: короткі-тандемні-повтори (short-tandem-repeats)
Аналіз батьківства	Загальний аналіз генотипів, пов'язаних з походженням, може містити перевірку батьківства, виявлення батьківства і прогнозування потомків по материнській лінії
Тест на батьківство	Процес, за допомогою якого досліджують потенційних батьків, як правило, самців, а іноді самок, що базуються на узгодженні генотипів, що зводиться до виявлення найбільш імовірного батька та / або матері
Перевірка батьківства	Процес, за допомогою якого генотипи зареєстрованих батьків (самця та / або самки) досліджують щодо генотипу тварини, щоб визначити, чи один або обидва з них є батьками
QTL (локус кількісних ознак)	Локус кількісних ознак. Частина генома, яка впливає на кількісні ознаки (темпи росту, масу, довжину). Ця область може мати невеликий <math><0,01\%</math>, або великий вплив > 5 %, на фенотип. Кількісна ознака матиме значну поширеність QTL по геному
Перевірка батьківства самця	Подібно до перевірки батьківства, але заснована на вивченні лише зареєстрованого самця
SNP	Однуклеотидний поліморфізм: зміна однієї азотистої основи у послідовності ДНК

6.4.2. Використання ДНК технологій

Визначення батьківства та призначення батьків

До появи генотипування за SNP маркерами, основною комерційною метою використання генетичних маркерів було визначення батьківства. Традиційно, тестування на батьківство ґрунтувалося на виключенні зв'язку (тобто, самця або самки), коли генотип тварини, не збігається із передбачуваним у цій парі. Імовірність віднесення до правильної пари тварин залежатиме від кількості використовуваних маркерів, кількості алелів у локусах, незначної частоти алелів у популяції, кількості батьків та кількості можливих спаровувань. Міжнародне товариство генетики тварин (www.isag.us) рекомендує для цього видоспецифічні панелі мікросателітів та маркерів SNP, доступ до яких можна отримати за посиланням, наведеним у Додатку 1. Для великої рогатої худоби, ICAR розробили набір з походження SNP, ICAR554, який містить рекомендовану панель ISAG та інші високоінформативні SNP. Ця панель дозволяє проводити точну перевірку та виявлення батьківства, не допускаючи допущень за високої щільності. Таким чином, панель ICAR554 може бути поширена країнами та

конкурентами для аналізу батьківства, не боязні, що інші можуть використовувати їх для прогнозування геномних значень селекції. ICAR та InterbullCenter співпрацюють у поширенні міжнародної служби обміну генотипами, яка називається GenoExi описана далі в главі 5 особливо для обміну генотипами SNP із основною метою аналізу батьківства.

Простежуваність та аутентифікація тваринної продуктивності, що пропонується споживачам

Внаслідок багаторазових кризисів, зокрема і спалахів губчастої енцефалопатії корів, виявленої у конині, збільшується попит таких досліджень.

Генетичні маркери для аутентифікації продуктів тваринного походження для маркування якості, пов'язано з географічним розташуванням, конкретними породами або їх кросами. Це вимагає встановлення молекулярних стандартів або частот алелів для кожної породи в межах одного виду. Багато інформації надходить з досліджень генетичного різноманіття серед порід. Особливий інтерес представляють гени, що піддаються інтенсивному відбору в кожній популяції. З достатньо великим набором SNP і генотипованих чистокровних еталонних тварин також можна прогнозувати найбільш імовірний породний склад особин.

Молекулярно-генетична інформація для маркерних схем у селекції

Кількісні ознаки, як правило, контролюють великою кількістю генів. Однак окремі гени іноді впливають на значну кількість варіативних ознак. Наприклад, ген міостатин із подвійними м'язами у великої рогатої худоби, ген DGAT1 із компонентами молока у дійних корів, або плодовитість бурульської породи та феномен поліовуляції. Оскільки генотип тварини не змінюється протягом всього життя, використання ДНКінформації через ідентифікацію маркерів, пов'язаних з QTL, з впливом на продуктивні ознаки або ідентифікацію самого гена разом з причинним варіантом представляє великий інтерес. Тим не менш, зі складними ознаками зростає потреба у наявності достатньо великого набору маркерів щодо молекулярної інформації для прийняття рішень про відбір. Геномна інформація є важливим критерієм відбору для ознак, які важко і дорого вимірюються та / або займають багато часу. До 2018 року було виявлено >116 000 великої рогатої худоби, >10 000 курчат, >28 000 свиней та >2000 овець, локуси кількісних ознак яких пов'язані з економічно важливими ознаками, такими як здоров'я, каркас тіла, молоко, фертильність і екстер'єр. База даних AnimalQTLdb, розміщена в NationalAnimalGenomeResearchProgram, містить актуальну інформацію про дані QTL великої рогатої худоби, курки, коня, свині, форелі та овець.

Для складних та економічно важливих ознак, генетичні маркери та геномна селекція дають значні можливості для відбору. Загалом, генетичні маркери та геноміка відіграють основну роль під час селекції. Геноміка також

може дозволити нам збільшити інтенсивність відбору, оскільки ми можемо прогнозувати значення геномної селекції на великій кількості тварин і, таким чином, мати більше кандидатів для відбору.

Резистентність до хвороб та генетичні дефекти

Іншою групою ознак з високим потенціалом використання молекулярних даних і геноміки є ті, які пов'язані зі стійкістю до захворювань. Існує низка багатофакторних або складних захворювань, які є результатом взаємодії генома тварини із компонентами навколишнього середовища. Ознаки стійкості до хвороб є одними з найбільш складних для внесення до програм генетичного поліпшення, оскільки вони вимагають якісного оцінювання стану хвороби тварини і систематичного контролю утримання чи екологічним станом, які дозволяють виявити вплив навколишнього середовища на стан здоров'я тварини. Тому, якщо гени або генетичні маркери, пов'язані з резистентністю, правильно відібрані, стійкі тварини зможуть бути обрані на базі їх геномної інформації. Для багатьох захворювань для ідентифікації генів, пов'язаних з резистентністю, потрібні експериментальні умови. Сьогодні використовують генетичний аналіз для виявлення гетерозиготних носіїв генетичних захворювань, викликаних одиночними рецесивними генами. Прикладами у молочній худоби можуть бути: комплексне викривлення хребта (CVM), брахіспіна (BY), дефіцит холестерину (CD) та гени або гаплотипи, що викликають втрату ембріонів або мертвонародження у різних молочних порід. У 2018 році OMIA (OnlineMendelianInheritanceinAnimals), перерахували понад 770 ознак або генетичних дефектів у тваринництві. Внесення цих причинних алелів або пов'язаних гаплотипів у програму розведення дозволить виробникам звести до мінімуму свій ризик виникнення генетичних дефектів, максимізуючи генетичний прогрес корисними рисами.

6.4.3. Технічні аспекти

Систематичний відбір ДНК рекомендується проводити у декількох популяціях тварин. ДНК можна виділити із будь-якої ядерної клітини організму. Тепер доступними є протоколи з виділення ДНК з крові (білі кров'яні тіลця), сперми, слини (клітини епітелію), волосяних фолікулів, м'язів, шкіри, органів (таких як печінка, селезінка тощо). Еритроцити також можуть використовувати в птахівництві, оскільки у птахів збережена ядерність клітин, а у більшості інших видів тварин не можуть. Для рутинного аналізу ДНК потрібна невелика кількість тканинного матеріалу. Проте, якщо існує необхідність багаторазового використання ДНК особини (повне секвенування генома, прослідковуваність (облік), перевірка валідацій алелів,...), то витрати на зберігання ДНК, витрати на екстракцію, якість і кількість, отримані за різними протоколами, мають бути ретельно вивчені та оптимізовані. Загальноприйнятими є методи відбору,

зокрема волосяних фолікулів, зразків тканин (часто за допомогою перфоратора для взяття проб вушної раковини) в закритому контейнері, плями крові на фільтрувальному папері та змиви із носової порожнини.

Можна організувати централізовану базу даних, що відносять до основного використання генетичної інформації:

- перевірка, призначення та / або виявлення батьківства;
- простежуваність (traceability) м'ясних продуктів;
- ідентифікація породи або породна різноманітність;
- якісні та кількісні ознаки.

Таблиці баз даних можуть містити:

- ідентифікація тварини із посиланнями до всієї інформації про цю тварину та її родичів;
- кількість генетичних маркерів (n);
- стандартна назва кожного маркера i (де $i = 1, n$);
- відповідний номер для маркера, наприклад, як dbSNP ID;
- алелі для маркера i ;
- геномне розташування маркера i ;
- вплив на non-reference (не посилюючий) алель на білок;
- фенотипічний прояв алеля;
- асоціація з іншими ознаками.

Однією з найважливіших частин великої бази даних геномів є забезпечення того, що генотип, пов'язаний з окремою твариною, дійсно належить цій тварині. Більшість великих баз даних геномів у тваринництві мають справу з даними SNP, тому цей розділ зосереджуватимуть на контролі якості за геномною категорією даних. Необхідні як заходи для контролю якості зразків, так і системи контролю якості SNP, тому на ранніх стадіях рекомендовано розробити для них певну систему.

Із метою стандартизації стосовно номенклатури генів або локусів наведено інформацію в посиланнях: <https://www.genenames.org/about/guidelines/#!#genenames> та : <http://varnomen.hgvs.org>.

ICAR послуги пов'язані із ДНК технологіями

Починаючи з 2018 року, ICAR пропонує три послуги, пов'язані з використанням ДНК, кожна з них пов'язана з аналізом батьківства в тій чи іншій формі, як показано далі.

ДНК послуги ICAR:

ICAR акредитація для лабораторій, що займаються генотипуванням:

- тестування якості послуг із генотипування ДНК, що використовують кільцевий тест (пробу) ISAG(International Society for Animal Genetics);
- визначення батьківства на основі мікросателітів;

- акредитація для центрів інтерпретації даних ДНК;
- визначення походження та / або батьківства;
- співпраця з Interbull Centre;
- обмін SNP-маркерами для перевірки та / або визначення походження;
- акредитація центрів з ДНК ідентифікації.

6.4.4. Акредитація лабораторій, що надають послуги із генотипування ДНК

Враховуючи необхідність високих стандартів якості у всіх випадках використання молекулярних даних, ICAR протягом кількох років пропонували послугу акредитації на основі визначених мінімальних вимог для лабораторій, що надають послуги генотипування ДНК. Основні вимоги цієї акредитації містять підтвердження мінімальних внутрішніх стандартів забезпечення якості управління та участь у міжнародному кільцевому тесті (participation in an international ring test), розробленому та запропонованому Міжнародним товариством генетики тварин (ISAG).

Крім того, такі лабораторії, зазвичай, аналізували отримані генотипи для надання послуг із мікросателітного та / або SNP-аналізу на батьківство, зокрема, або перевірку походження, або підтвердження ідентифікації тварин. Служба акредитації ICAR раніше визнавала лабораторії із генотипування як акредитовану організацію, що забезпечує аналізування батьківства без додаткового тестування технічної точності. Починаючи з 2018 року, запуск служби акредитації на базі центрів інтерпретації даних ДНК на основі SNP аналізу батьківства замінила попередню акредитацію для перевірки на основі SNP. Планується аналогічні процедури для введення в ICAR акредитації аналізу батьківства на основі мікросателітів, але до цього часу існуючий процес акредитації лабораторій генотипування залишатиметься чинним.

Для мікросателітного та SNP генотипування великої рогатої худоби передбачені такі рекомендації з акредитації. Мінімальні вимоги до інших видів та інших аналізів ДНК можуть бути визначені в майбутньому.

Область застосування

Ці рекомендації стосуються ICAR акредитації лабораторій генотипування, які аналізують біологічні зразки великої рогатої худоби за допомогою мікросателітних і / або SNP-генотипувань, які згодом можуть бути використані для аналізу батьківства, імпутації генотипу, оцінку значень геномної селекції та інших видів діяльності, пов'язаних зі стратегіями геномної селекції. Цей процес акредитації також містить мікросателітну перевірку батьківства. Для ICAR акредитації, пов'язаної з верифікацією батьківства на основі SNP, лабораторії генотипування мають подати до ICAR для паралельної їх акредитації за аналізом батьківства до центрів інтерпретації даних ДНК, як описано нижче.

ICAR правила та рекомендації для акредитації лабораторій генотипування

Процес акредитації містить такі кроки:

- заявка на акредитацію;
- оплата відповідних зборів;
- огляд заяви;
- надання акредитації.

Лабораторна акредитація

Сьогодні акредитація за стандартами ISO17025 або ISO9001 є обов'язковою для акредитації на основі даних мікросателітного аналізу (STR). Чинний в 2020 році стандарт ICAR вимагатиме від акредитації лабораторій генотипування, акредитації ISO17025 або еквівалентної для забезпечення якості внутрішніх систем управління, що і буде обов'язковою вимогою для акредитацій на основі SNP. Крім того, в 2020 року сертифікація ISO9001 більше не буде дійсною, і тільки ISO17025, або еквівалентна акредитація, буде належним рівнем акредитації для забезпечення якості внутрішніх систем управління для мікросателітної (STR) акредитації.

Участь та представлення кільцевого тесту

ISAG проводить міжнародний кільцевий (порівняльний) тест лабораторій як для мікросателітального, так і для SNP генотипування. Участь у ISAG та представлення у цих кільцевих тестів має бути відкрита та надані сертифікати, якщо такі наявні. Заявники також мають підписати згоду, що дозволяє ISAG розкривати результати їх кільцевих тестів для ICAR. Участь у принаймні двох кільцевих тестах ISAG є мінімальною вимогою. Для мікросателітного кільцевого тесту ISAG лабораторії генотипування необхідно надати інформацію про 12 наборів мікросателітів ISAG. Експертний комітет визначить межі для кожного кільцевого тесту з належним урахуванням структури тесту та середньої продуктивності лабораторій у кільцевому тесті за рік. Тільки ті лабораторії, які досягають 1-го рангу в щорічному кільцевому тесті ISAG, автоматично отримують акредитацію ICAR, як лабораторії генотипування, а акредитація лабораторій з нижчим рівнем проводиться на розсуд комітету експертів.

Мікросателітні маркери. Необхідно вказувати назви всіх мікросателітів, відібраних у всіх тварин (набір маркерів I) та всіх тих, у яких не було визначено походження (маркерний набір II), а також всіх тварин, що типували впродовж останніх двох років. Мінімальною вимогою для міжнародного обміну є повний набір з 12 офіційних мікросателітних маркерів ISAG. Для забезпечення достатнього досвіду в лабораторії, аналіз 500 тварин на рік встановлюється мінімальною вимогою для сертифікації із мікросателітного контролю.

Ймовірність виключення (2 батьків або 1 з батьків) кожного маркера і повних наборів маркерів мають бути обчислені і надані в заявці. Описуються тип

популяції та кількість тварин (мінімум 150), що використовують для обчислень. ICAR рекомендують використовувати голштинську породу як еталонну групу. Комітет експертів ICAR прийме рішення щодо акредитації на основі аналізу популяції.

SNP маркери. Необхідно вказувати всі генотипи SNP на тваринах обох груп маркерів та тваринах, яких генотипували впродовж мінімум останніх двох років. Мінімальною вимогою є використання принаймні 95 SNP з набору, рекомендованого ISAG, для всіх генотипів тварин.

Номенклатура маркерів

Номенклатуру маркерів має бути описано. Номенклатура ISAG є необхідною для офіційних 12 наборів маркерів, так само як і для наборів маркерів SNP.

Акредитація організацій, що здійснюють аналіз на батьківство на основі SNP

З появою SNP генотипування функція генотипування ДНК як лабораторної діяльності може бути відокремлена від функцій перевірки та визначення батьківства. Отже, ICAR встановили окрему акредитацію для застосування результатів генотипування на основі SNP, яке можуть проводити лабораторії, асоціації порід, генетичні центри оцінювання та будь-які інші організації, що беруть участь у верифікації батьківства та / або обробці даних генотипів SNP.

Постачальники послуг можуть використовувати різні лабораторії для різних порід або видів. Беручи до уваги важливість ідентифікації тварин та перевірки батьківства для реєстрації тварин, ICAR вирішило визначити мінімальні вимоги до використання результатів генотипування ДНК та іншої інформації з метою:

- перевірка батьківства;
- визначення батьків;
- підтвердження ідентифікації тварин.

Метою цих рекомендацій є створення бази для акредитації процесів, що використовують організації, які використовують генотипи SNP великої рогатої худоби. Мінімальні вимоги до інших видів тварин та інших аналізів ДНК можуть бути визначені в майбутньому.

Область застосування

Ці рекомендації стосуються акредитації ICAR організацій, які використовують результати тестів на основі SNP для аналізу батьківства великої рогатої худоби, що містить перевірку батьківства, виявлення походження та / або підтвердження ідентифікації тварин.

6.5. Методики відбору середніх проб біологічного матеріалу

6.5.1. Техніка відбору середніх проб та способи їх короткотермінового або довготривалого зберігання для визначення показників якості

Повний аналітичний процес можна поділити на три послідовних етапи: відбір проби, підготовка проби до аналізу та аналіз проби, які детально описано у літературних джерелах [Сенченко Б.С., 2001; Єрмолаєв А.П., 1998; Житенко П.В., 2001; Пронін В.В., 2012].

Методика виконання. Методично правильно відібрана середня проба молока – одна з найважливіших умов правильного визначення його якісних показників, її можуть відбирати безпосередньо у приміщенні ферми, в молочній, у пунктах приймання молока тощо. Перш ніж проводити відбір середніх проб від окремих тварин чи стада, слід ознайомитися з їх продуктивністю, розпорядком дня на фермі та приготувати місце для зберігання пляшок (місткостей) під час відбору проб [Сенченко Б.С.].

Якщо в день відбору спостерігається порушення режиму годівлі або розпорядку дня, відбір середніх проб не проводять. Під час визначення якісних показників молока кожної корови – їх має доїти постійна доярка. Відбираючи середню пробу, немає значення, з якого надою розпочинати цю роботу, головне, щоб у ній були порції молока від усіх надоїв. Звичайно, якщо аналізи проводитимуть відразу (через 2–2,5 год) після відбирання проб, то зручніше розпочинати з обіднього (за триразового) або вечірнього (за дворазового) доїння. У випадках, коли стадо велике і за один раз відібрати проби неможливо, його ділять на декілька груп і розробляють графік їх відбору.

Відповідно з вимогами державного стандарту для повного аналізу відбирають пробу об'ємом близько 0,5 дм³ (л). Якщо ж визначають тільки кислотність і вміст жиру – достатній об'єм проби у 50 см³.

Відбирати проби слід у чисті і сухі пляшки (місткості) з етикетками і корками. Для мікробіологічних досліджень проби відбирають у стерильні пробірки, пляшечки або колби і закорковують ватними корками.

Відбираючи середні проби для аналізів, необхідно дотримуватися пропорційності відбору молока відповідно до надою або кількості молока в посудині. Пропорційність регулюють встановленням кратності (1, 2, 3), яку зберігають під час відбору з усього посуду чи надоїв впродовж доби від кожної тварини або розрахунком кількості см³ молока, які необхідно відібрати від кожного кілограма (літра) у посудині.

Оскільки молочний жир досить швидко піднімається на поверхню, то перед відбором середньої проби молоко слід добре перемішати. Після відкриття фляг або відсіків молочної цистерни молочний жир, що зібрався на кришках і стінках, шпателем знімають і переносять у ці самі фляги чи цистерни та

старанно, занурюючи зверху і до низу 8–10 разів, перемішують колотівкою. В автомобільних цистернах молоко перемішують упродовж 3-4 хвилин.

Відбираючи проби із посуду однакової форми (молокоміри, відра, фляги), найчастіше використовують металеві або пластмасові трубки-відбірники (пробники) з внутрішнім діаметром 9 мм. Металеві трубки, черпачки та колотівки, які використовують для цього, мають бути вкриті антикорозійним сплавом. Заржавілі, забруднені та зіпсовані інструменти використовувати під час відбирання проб **заборонено** [Єрмолаєв А.П., 1998].

Перед відбиранням проби трубку-відбірник слід попередньо ополоснути молоком, з якого відбирають пробу. Для цього, не закриваючи верхній її кінець, трубку повільно опускають і виймають з молока, а черпачки просто ополіскують у молоці. Після перемішування молока трубку повільно занурюють до дна посудини таким чином, щоб рівень молока в трубці і посудині весь час був однаковим. Трубка заповниться молоком до рівня, який воно займає в посудині (рис. 6.34). Після цього верхній отвір закривають великим пальцем і переносять молоко в сухі та чисті пляшки (місткості) з етикетками, на яких вказують кличку тварини або назву ферми, бригади, прізвище доярки та дату відбору середньої проби. Пляшки закорковують корками і зберігають у спеціальних ящиках.

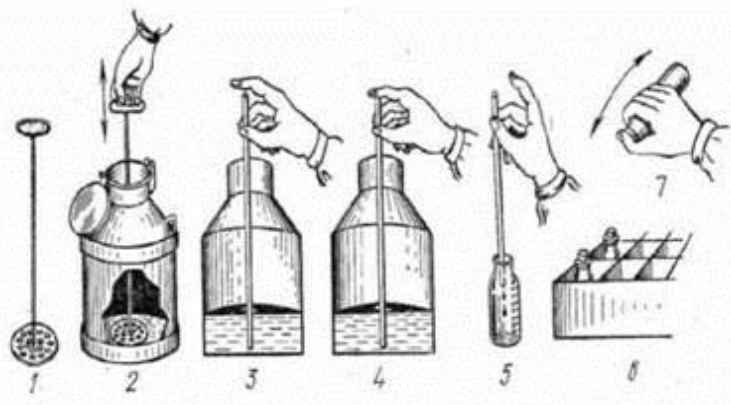


Рис. 6.34. Послідовність відбирання середніх проб молока

1 – колотівка для перемішування молока; 2 – перемішування молока;
3 – занурення трубки у молоко для відбирання проб; 4 – положення вказівного пальця руки перед перенесенням проби; 5 – виливання молока у пляшку для проб;
6 – ящик для збереження проб молока; 7 – перемішування середньої проби молока перед проведенням аналізів

Якщо трубок немає, або молоко знаходиться у різному за формою посуді, то середню пробу відбирають шляхом відмірювання мірним циліндром або черпачками (кухлем), визначивши пропорційність відбирання попереднім розрахунком. Наприклад: у трьох посудинах міститься 215, 350 і 520 або 1085 кг молока. Для повного аналізу необхідно відібрати $0,5 \text{ дм}^3$ молока, або від кожного кілограма $500: 1085 = 0,46 \text{ см}^3$. Отже, з першої посудини слід узяти 99 см^3 , другої – 161 см^3 , а третьої – 240 см^3 молока. Одержані під

часрозрахуваннядробні величини для зручності заокруглюють. Відбираючи проби молока від кожної корови в умовах доїння на доїльному майданчику або в молокопровід можна використовувати пристрої УЗМ-1 чи УЗМ-1А.

Зберігають пляшки з пробями у спеціальному ящику з гніздами. Періодично, щоб не відстоювалися вершки, вміст пляшок збовтують. Якщо проби необхідно транспортувати, то пляшки мають бути заповнені лише на 3/4 їх об'єму. Не слід до кінця наповнювати пляшки молоком, оскільки перед аналізом їх вміст не можна буде перемішати.

За умов одночасного відбирання проб для мікробіологічних, фізико-хімічних та органолептичних досліджень, проби для мікробіологічних відбирають у першу чергу, використовуючи стерильне обладнання та місткості.

Консервовані проби, що зберігалися тривалий час, слід також підігріти до 35–40 °С, добре перемішати і охолодити до 20±2 °С. Для цього проби спочатку ставлять у ванну з водою, температура якої 46–50 °С, а охолоджують у воді з температурою 12–15 °С [Житенко П.В., 2001; Пронін В.В.].

6.5.2. Відбір проб для проведення ДНК-досліджень

Закону України «Про племінну справу у тваринництві» (3691-12) визначає порядок проведення тестування за ДНК-маркерами у тваринництві.

Організацію та проведення відбору зразків біоматеріалу для тестування за ДНК-маркерами здійснюють ветеринарні фахівці господарств / власників тварин.

Зразки ДНК можуть бути отримані з будь-якої ядерної клітини в організмі. Тепер доступні протоколи виділення ДНК для крові (лейкоцитів), сперми, слини (епітеліальні клітини), волосяних фолікулів, м'язів, шкіри, органів (такі як печінка, селезінка тощо). Еритроцити також можуть використовувати для птахів, оскільки вони зберігають ядерне тіло, водночас у більшості інших видів воно відсутнє у клітинах еритроцитів. Необхідною є невелика кількість матеріалу для рутинного аналізу ДНК. Проте, якщо існує багаторазове використання ДНК людини (ціле секвенування геному, простежуваність, вірогідність алелей збудника), потім зберігання ДНК витрати, витрати на видобуток, якість і кількість, отримані різними протоколами, мають бути ретельно вивчені і оптимізовані. Загальні методи збирання охоплюють волосяні фолікули, зразки тканини (часто вуха) в закритому контейнері, плямах крові на фільтрувальному папері і носових тампонах [Наказ від 24.10.2001№ 319/93].

Відбір крові

Проводять в антикоагулянт або на марлевий тампон. За умови використання марлевого тампона його просякують відібраною кров'ю та висушують на повітрі. Для ДНК-аналізу достатньо 0,5 мл рідкої крові або кров'яної плями на марлевому тампоні розміром 5x5 мм.

Умови зберігання крові:

- рідкої – 5–7 днів за температури 4 °С або декілька місяців за температури-20 °С;
- висушеної – у герметично закритому сухому пакеті до 5 років за кімнатної температури або в холодильнику за температури 4 °С.

Висушену кров можна пересилати поштою до підприємства (лабораторії) генетичного контролю.

Відбір та зберігання сперми

Відбирають 0,5–2 мл нативної сперми. Сперму для виділення ДНК зберігають за умов, аналогічних для зберігання рідкої крові.

Відбір біоптатів

Біоптати можуть мати різне походження. Для ДНК-аналізу можна використовувати вищипи з вуха, які залишаються під час мічення тварин. Термін зберігання шматочків розміром від 5x5 мм за температури 4 °С – 3–4 доби, у замороженому стані (-20 °С і нижче) – необмежений час.

Під час відбору кожен пробу маркують індивідуальним номером. Складають акт про відбір проб у довільній формі, в якому вказують повну назву господарства / власника, де зроблено відбір біоматеріалу, час відбору, його вид, записують номери тварин та відповідні номери проб [Наказ від 24.10.2001№ 319/93].

6.5.3. Основні принципи формування банків біологічного матеріалу

Необхідність збереження генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин

Вітчизняні локальні породи тварин не можуть конкурувати з класичними спеціалізованими породами за основними продуктивними якостями, але їх характеризують надзвичайно цінні особливості (міцність конституції, тривалість продуктивного використання, стійкість до інфекційних захворювань, високі відтворна здатність, вміст жиру та білка в молоці, забезпечення високого генетичного ефекту під час схрещування та ін.). Тобто, вони залишаються носіями цінних спадкових якостей, без яких подальше генетичне поліпшення тварин неможливе. Із зникненням порід зникає генофонд, що звужує різноманітність господарсько-корисних ознак, а отже, обмежує селекцію. Тому збереження цього національного надбання є важливою державною справою.

В Україну імпортовано стада відселекціонованих порід сільськогосподарських тварин з метою ефективного використання їх генофонду під час створення нових вітчизняних високопродуктивних порід. Їх слід

розглядати як малочисельні і збереження їх генофонду має забезпечуватися за рахунок коштів державного бюджету.

Саме тому, на цьому етапі розвитку тваринництва необхідна національна програма збереження і раціонального використання генофонду, яку б регламентувала держава, забезпечувала гармонійний розвиток і ефективне використання генетичного різноманіття сільськогосподарських тварин вітчизняного і світового генофонду з метою генетичного поліпшення тварин і всебічного забезпечення суспільства в продуктах тваринництва та збереження цінних генетичних комплексів і носіїв, необхідних спадкових ознак.

Збереження генофонду локальних, зникаючих і малочисельних порід усіх видів сільськогосподарських тварин є складовою частиною Закону України «Про племінну справу у тваринництві» (3691-12). Згідно з 24 статтею збереження племінних (генетичних) ресурсів поліпшуючих, існуючих, локальних і зникаючих порід здійснює спеціально утворений центральний орган виконавчої влади, до відання якого віднесені питання сільського господарства. Він забезпечує створення за рахунок коштів Державного бюджету України генофондних стад, банків сперми та ембріонів, а також наукове забезпечення реалізації програми збереження генофонду порід.

Збереження резервів генів популяцій – досить складне завдання і пов'язане з економічними витратами. Тому необхідно визначитись, які породи зберігати, розробити критерії вибору порід, форми, методи і чисельність поголів'я гамет, ембріонів, що підлягають збереженню та спосіб використання їх у перспективній селекції.

Одним із важливих завдань збереження і ефективного використання генофонду порід є їх інвентаризація і створення на її основі банку даних генетичного різноманіття і специфічних характеристик порід, визначення серед них генетично цінних та спрямування ефективного використання їх у селекційних програмах.

Об'єктивну оцінку різноманітності генофонду та генетичного статусу порід домашніх тварин передбачено провести із використанням поліморфізму еритроцитарних антигенів, білків сироватки крові, ферментів тканин, структури білків, цитогенетичного аналізу.

Методи збереження генофонду порід

Передбачаються такі методи збереження генофонду порід:

- чистопорідне розведення колекцій «чистих» популяцій сільськогосподарських тварин як вітчизняної, так і зарубіжної селекції у вигляді замкнених генофондних стад, реліктових ферм і заказників тварин;
- тривале збереження заморожених сперми, ооцитів, ембріонів у генетичних банках;

- збереження зародкової плазми і ДНК як носія кодування генетичних варіацій.

Форми збереження локальних та зникаючих видів і порід сільськогосподарських тварин

Суб'єкти із збереження генофонду тварин визначають генофондні стада, генофондні ферми та господарства, заказники, колекціонарії, зоопарки та кріобанки генетичних ресурсів.

Раціональною формою збереження генофонду порід є збереження поголів'я в генофондних стадах (не менше як у 2–3 господарствах).

- Генофондне стадо – чистопородна група тварин, виділена для збереження генофонду певної породи тварин.
- Генофондна ферма – окрема ферма в господарстві, де розводять чистопородних тварин усіх статевих і вікових груп лише однієї породи.
- Генофондне господарство, заказник – розводить тварин однієї або декількох порід на різних генофондних фермах і забезпечує їх чистопорідне розведення.
- Кріобанк генетичних ресурсів.

Основним завданням кріобанку генетичних ресурсів тварин, на відміну від існуючих банків при племпідприємствах, є створення та тривале зберігання необхідних запасів сперми, ембріонів, ооцитів тварин особливої генетичної цінності локальних, зникаючих вітчизняних та малочисельних колекцій спеціалізованих порід зарубіжної селекції і використання їх під час:

- вирішення найбільш важливих селекційних завдань (виведення нових порід, типів, кросів, ліній, підтримання та удосконалення генеалогічної структури, консолідація, докорінне поліпшення існуючих);
- забезпечення чистопородного аутбредного розведення тварин, підтримання генетичної різноманітності в замкнених популяціях генофондних стад, ферм, колекціонаріїв зникаючих і локальних аборигенних та репродукторів спеціалізованих порід;
- для селекційного використання в майбутньому і відтворення чистопорідних тварин порід, які зникли, у разі необхідності, на маточному поголів'ї іншої породи.

Кріобанк генетичних ресурсів є науково-виробничим підрозділом і створюється при наукових центрах, які здійснюють оцінку генофонду, визначають необхідність, форму і обсяги його збереження та використання конкретно по кожній породі. Придбання генетичного матеріалу здійснюється за рахунок Держбюджету.

6.6. Методики лабораторних досліджень під час здійснення цитогенетичного аналізу

6.6.1. Опис методів роботи з підготовки препаратів та їх дослідження на мікроскопі

Для виявлення генетичних аномалій підприємство (лабораторія) генетичного контролю забезпечує цитогенетичний контроль і тестування тварин за ДНК-маркерами.

Закон України «Про племінну справу у тваринництві» (3691-12) визначає порядок проведення цитогенетичних досліджень у тваринництві [МОН України 01.06.2004 № 197].

Цитогенетичний контроль – контроль стану хромосомного апарату тварини, його цілісності, наявності структурних та кількісних порушень каріотипу.

Мета цитогенетичного контролю – установлення відсутності або наявності хромосомних, хроматидних, геномних кількісних та якісних змін і порушень.

Матеріалом для одержання хромосомних препаратів слугує у: великої рогатої худоби, овець, кіз та коней – кров, що відбирається з яремної вени тварини; свиней – кров з вушної вени.

Отримання цитогенетичних препаратів

Для взяття крові у тварин і культивування клітин використовують медичні флакони ємністю 30 мл з пластмасовими кришками, що загвинчуються, пеніцилінові флакони, стерильні бакпечатки.

Підготовка флаконів проводиться у послідовності:

1. флакони миють гарячою водою, використовуючи пральний порошок, тринатрій фосфат чи суміш трилону Б (чда) – 1 частину, гідроксид натрію – 2 частини та дистильовану воду – 10 л;

2. ретельно ополіскують спочатку проточною гарячою водою, потім дистильованою водою та залишають замоченими у дистильованій воді на ніч;

3. висушують у сушильній шафі (температура 110 °С);

4. кип'ятять протягом 2 годин;

5. висушують;

6. закривають ватно-марлевими пробками;

7. обертають пергаментом;

8. витримують за температури 110 °С близько 2 годин;

9. готові флакони закривають чистими, стерильними пеніциліновими пробками, зверху – пластмасовими кришками з невеликим отвором, через який вводять за допомогою голки і шприца необхідні компоненти.

Постановку та культивування культури клітин проводять у стерильному боксі. За умови відсутності боксу ці операції проводять у звичайній чистій кімнаті,

яку опромінюють бактерицидними настінними лампами ОБН-150 протягом 2 годин перед початком роботи.

Постановка культури лімфоцитів периферійної крові

У флакони вводять 0,5 мл крові та поживне середовище такого складу:

- 5 мл середовища 199 (Ерла, Ігла) або RPMI 1640;
- 1 мл інактивованої сироватки крові великої рогатої худоби або людини IV групи (сироватку інактивують у водяній бані за 56 °С протягом 1 години);
- 0,01 мл ФГА «Р» або 0,1 мл ФГА «М» чи конканаваліну А;
- антибіотики в концентрації 100 од. пеніциліну та 100 мкг стрептоміцину або 0,001 мл гентаміцину на 1 мл середовища.

Суспензію перемішують, ставлять у термостат за температури 37 °С на 48 годин.

За дві години до зняття культури в кожен флакон вводять колхіцин у кінцевій концентрації 0,05 мкг/мл. Маточний розчин колхіцину готують на дистильованій воді (10 мг сухого колхіцину на 100 мл води) та зберігають за температури 4 °С 1–2 місяці. Для одержання препаратів, збагачених клітинами на стадіях ранньої мета- та прометафази, за 2 години до фіксації (можна одночасно з колхіцином) додають розчин етидіум броміду в кінцевій концентрації 5–10 мкг/мл. Починаючи з цього етапу, допускається проведення робіт у нестерильних умовах.

Зняття культури лімфоцитів периферійної крові і отримання препаратів метафазних хромосом

По завершенні культивування:

1. Уміст флаконів зливають у центрифужні пробірки та центрифугують протягом 10–20 хв за 1000 об/хв (режим центрифугування за всіх наступних обробок такий самий).
2. Надосадову рідину відсмоктують або обережно зливають.
3. Осад струшують, у пробірку додають підігрітий до температури 37 °С гіпотонічний розчин (0,5 %) KCl.
4. Клітинну суспензію ретельно перемішують, використовуючи пастерівську піпетку з гумовою грушею.
5. Інкують 10 хв за температури 37 °С.
6. Центрифугують.
7. Видаляють надосадову рідину.
8. Клітинну суспензію фіксують у свіжоприготовленому та охолодженому фіксаторі (метиловий спирт, крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1).
9. Зафіксовану суспензію клітин залишають у холодильнику за температури 4 °С на термін від 20 хвилин до 20 годин.
10. Клітинну суспензію проводять ще через 2–3 зміни фіксатора.

11. Отриману клітинну суспензію розчиняють невеликою кількістю свіжого фіксатора до бажаної густини.

12. Наносять 3–4 краплі клітинної суспензії на знежирене предметне скло, препарат підпалюють чи висушують гарячим струменем повітря.

Якість отриманого препарату оцінюють під мікроскопом. Розкиданість хромосом контролюють у затемненому полі мікроскопа. Якщо розкиданість хромосом недостатня, суспензію проводять ще через одну зміну фіксатора, змінивши співвідношення компонентів на 2:1 чи додають у пробірку кілька крапель оцтової кислоти.

Рутинне забарвлення препаратів хромосом проводять за допомогою барвників азуру та еозину. Обидва барвники готуються на дистильованій воді у вигляді 0,15 % розчину і зберігаються у суліях з темного скла. Розчини готують заздалегідь, тому що «дозрілі» розчини ефективніші.

Безпосередньо перед забарвленням готують робочий розчин: змішують 6 частин 0,15 % («дозрілого») розчину еозину і 9 частин дистильованої води. Для фарбування можна використовувати готовий барвник Гімза та готовий азур-еозин, приготовлений за методом Романовського. На 0,5–1 мл вихідного барвника беруть 10 мл дистильованої води.

Фарбування препаратів хромосом проводять у такій послідовності: готовий барвник наносять на предметне скло або предметне скло поміщають у склянку з барвником і витримують протягом декількох хвилин. Інтенсивність забарвлення визначають під мікроскопом.

Під час візуального аналізу клітин під мікроскопом виявляють великі хромосомні порушення – центричні злиття аутосом, тандемні злиття, химеризм клітин за статевими хромосомами.

Для встановлення наявності центричного злиття досить позитивного висновку за 5–10 метафазними платівками. Для встановлення наявності химеризму клітин за статевими хромосомами необхідно знайти 2 X-хромосоми у 10 метафазних платівках.

Для визначення номерів хромосом, що беруть участь у центричному злитті, проводять морфометричний аналіз на фотографічних відбитках. Вибирають метафазні пластинки з оптимальною спіралізацією хромосом і без накладень. Зображення хромосом вирізають і розклеюють попарно. На кількох метафазних пластинках вимірюють довжину кожної хромосоми та визначають її відносну довжину до сумарної довжини всього гаплоїдного жіночого (X-хромосома) набору хромосом.

Під час діагностування лейкозу наявність у цитологічних препаратах короткочасних гемокультурмітозів, відсутніх у здорової великої рогатої худоби, є першою ознакою можливого захворювання тварин на лейкоз.

Аналіз клітин під мікроскопом починають проводити під малим збільшенням мікроскопа в 100 разів, за координатами препаратів визначають розташування метафаз. Потім їх аналізують під імерсійним

збільшенням мікроскопа у 1000 разів і мікрофотографують [МОН України від 01.06.2004 № 197].

Реєстрація хромосомних порушень

Пофарбовані препарати починають аналізувати під збільшенням мікроскопа в 100–200 разів, при цьому проводять їх загальну оцінку (мітотичний індекс та якість метафазних платівок). Метафази краще знаходити та вибирати за невеликого збільшення. Під час доборуметафазних платівок для перегляду їх виключають через непридатність для аналізу за умов:

- хромосоми накладені одна на одну, що заважає ідентифікувати та підраховувати їх загальне число;
- усі хромосоми не вміщуються в поле зору мікроскопа під збільшенням у 900–1000 разів;
- хромосоми занадто довгі чи дуже вкорочені;
- у полі зору спостерігають декілька випадкових хромосом;
- хромосоми нерівномірно профарбовані, погана якість метафазної платівки тощо.

6.7. Методики молекулярно-генетичного аналізу

6.7.1. Опис основних методик виділення ДНК та РНК

Виділення ДНК і РНК – це важливий етап підготовки зразків для діагностичного процесу, без якого не може бути проведено жодної з наступних методи: ампліфікація, детекція продуктів ампліфікації, клонування, секвенування, гібридизація тощо.

Нуклеїнові кислоти (НК) є складовою частиною складних білків – нуклеопротеїнів, які містяться у всіх живих клітинах тварин, бактерій, вірусів, рослин. Нуклеїнові кислоти мають сильно виражені кислі властивості і за фізичних значень рН заряджені негативно. Саме цим пояснюється одна з важливих властивостей нуклеїнових кислот – здатність до взаємодії за типом іонного зв'язку з основними білками (гістонами), іонами металів (переважно з Mg^{2+}), а також з поліамінами (спермін, спермідин) і путресцином.

Тому для виділення нуклеїнових кислот із комплексів з білками необхідно зруйнувати такі міцні та електростатичні зв'язки між позитивно зарядженими молекулами білків та негативно зарядженими молекулами нуклеїнових кислот.

Якщо джерелом нуклеїнових кислот є зразок крові, сперми або біоптату, то необхідно підібрати оптимальні методи виділення, що дозволяють отримувати максимальну кількість продукту з високою чистотою. Під час роботи з культурами клітин можливо використовувати більш прості методи виділення, оскільки вихід НК збільшується пропорційно об'єму культури [І.В. Дзюблик, 2012].

6.7.2. Методика очищення розчину за допомогою методів органічної екстракції (за допомогою фенолу, хлороформу) з послідуєчим осадом ДНК спиртами і розчиненням у воді та ТЕ-буфері. Методика диференційованої сорбції ДНК на твердих носіях

Способи виділення нуклеїнових кислот залежать від виду досліджуваного матеріалу, від його природи, характеру і властивостей об'єкта [Антонова О.С., 2010; Херрингтона С. 1999].

Сучасні методи виділення НК складаються з трьох етапів:

- руйнування (лізис) клітини;
- інактивація нуклеаз;
- очищення.

Часто ідеальна процедура лізису є компромісом декількох методик, вона має бути достатньо жорсткою, щоб руйнувати структуру вихідного матеріалу (наприклад, тканин) і при цьому делікатною, щоб не допустити руйнування НК.

Процедура лізису охоплює:

- механічне руйнування (подрібнення, гіпотонічний лізис);
- хімічну обробку (наприклад, лізис за допомогою детергентів, хаотропних речовин, або тимолове відновлення);
- ферментативне розщеплення білків (наприклад, за допомогою протеїнази К).

Процеси руйнування клітинних мембран та інактивації внутрішньоклітинних нуклеаз можуть бути поєднані. Як інгібіторинуклеаз використовують як неспецифічні денатуруючі агенти (іонні детергенти, гідроокис ртуті, гуаніндихлорид, гуаніндинізотіоціанат, фенол, хлороформ тощо), так і специфічні інгібітори, наприклад, інгібітор РНКаз з плаценти. Після лізису клітин та інактивації нуклеаз клітинну масу легко видалити за допомогою фільтрації або осадження.

Один з популярних методів виділення ДНК заснований на використанні лізису клітин сильного хаотропного агента – гуаніндинізотіоціанату (GuSCN) і подальшої сорбції ДНК на носії. Гуаніндинізотіоціанат – дуже сильний денатуруючий агент, який використовують для одночасного лізису і денатурації всіх клітинних білків (зокрема РНКаз). Після серії відмивок у зразку залишається ДНК, сорбована на носії, з якого вона легко знімається за допомогою буфера, що елює. Метод зручний, технологічний і придатний для підготовки зразка нуклеїнової кислоти до ампліфікації. Водночас можливі втрати ДНК внаслідок незворотної сорбції на носії, а також у процесі численних відмивок. Особливого значення цей факт набуває під час роботи з невеликими кількостями ДНК у зразку. Крім того, навіть незначні кількості GuSCN можуть інгібувати реакцію ампліфікації.

На сьогоднішній день, у молекулярній біології представлено досить велику кількість різних удосконалених методик, заснованих на лізисі клітин

гуанідинізоціанатом або гуанідинхлоридом з подальшою сорбцією нуклеїнових кислот на сорбенті – частинках двоокису кремнію або використовують наступну кислородно-фенольну екстракцію РНК і висаджування її ізопропанолом. Ці методики застосовують у різних модифікаціях виділення ДНК або РНК.

Методи виділення нуклеїнових кислот можна розділити за основними фізичними та біохімічними ознаками на такі класи:

- рідиннофазні методи;
- твердофазні методи.

Рідиннофазні методи

Класичні методи виділення. Класичні методи виділення НК зі складних вихідних зразків (крові, тканини) містять лізис біологічного матеріалу детергентами або хаотропними агентами, іноді у присутності ферментів, що руйнують білки. Після цього етапу відбувається декілька стадій, у яких використовують органічні розчинники, як фенол, хлороформ або етанол. Повне розділення білків від НК може бути досягнуто додаванням перхлорату натрію. Для розділення РНК від ДНК застосовують селективне інкубування з хлоридом літію або специфічне безнуклеазне ізолювання з гуанідин хлоридом чи гуанідинтіоціанатом, комбінованим з фенольною екстракцією або етанольною преципітацією.

Надані методи збільшують ймовірність денатурації НК, втрату зразка або кросконтамінацію зразків, якщо кілька зразків обробляють одночасно. За виділення РНК існує дуже великий ризик контамінації з боку ДНК, що присутня у вихідному зразку. Стандартна методика отримання чистого препарату заснована на тому, що ДНК є полярною молекулою і не розчиняється в органічних розчинниках. Традиційно для виділення ДНК використовується фенол-хлороформна екстракція. Під час перемішування клітинного лізату з фенолу формуються дві фази. ДНК знаходиться у верхній (водній) фазі, а денатуровані білки – у нижній (органічній) фазі. Основним недоліком цього методу є відсутність автоматизації за рахунок стадії центрифугування рідинної екстракції.

Методи, що дозволяють виділяти ДНК та РНК одночасно

Відомі методи, за якими можна виділяти одночасно і ДНК, і РНК з одного досліджуваного об'єкта (зразка). Більшість відомих методів є модифікацією оригінальної процедури, запропонованої Chirgwin із співавторами. При цьому використовують сильні хаотропні агенти, такі як гуанідинтіоціанат і цезію тріфлуороацетат для одночасного руйнування; клітинних мембран та інактивації внутрішньоклітинних рибонуклеаз (РНКаз). Чинниками, що лімітують такі методики, є ультрацентрифугування і великий час аналізу (16–44 годин). Методи одночасного виділення ДНК і РНК, в яких відсутня операція центрифугування,

мають перевагу ще й тому, що фенол діє як ефективний депротейнізуючий агент, що руйнує клітини і денатурує білки. Для ефективного розділення високомолекулярної ДНК від РНК спочатку здійснюється фенольна екстракція, а потім дві фенол-хлороформні екстракції для одночасного видалення білків і ліпідів з розчину, щомістить НК. З метою підвищення виходу НК оптимізують компоненти буфера, що і екстрагує. Наприклад, певний рН буфера (рН 7,9) в присутності детергенту (0,2 % додецилсульфат натрію) і відносно низька концентрація солі (100 мМ LiCl) дозволяють ефективно розділяти НК у водній фазі і дисоціювати білки; 10 мМ EDTA не дозволяє утворюватися білковим комплексам і утворює хелатний комплекс з Mg^{2+} , інгібуючи, таким чином, дію магній-залежних нуклеаз.

Твердофазні методи

Основні принципи твердофазних методів. У твердофазних методах виділення нуклеїнових кислот використовують такі процеси та принципи:

- а) водневі зв'язки з немодифікованою гідрофільною матрицею (кварцем) в хаотропних умовах;
- б) іонообмін у водному розчині, зазвичай з використанням аніонообмінників;
- в) афінність;
- г) механізми виключення за розміром.

Твердофазні системи, що адсорбують нуклеїнові кислоти, – це часточки на основі кварцу, скляні волокна, аніонообмінні носії, які використовують у хроматографічних сепараційних колонках. Як приклад можуть слугувати готові набори для виділення НК на основі силіка-мембрани виробництва Macherey-Nagel (NucleoSpin), Qiagen (QiaAmp) та інші.



Рис.6.38. Схема виділення ДНК на спин-колонках із силіка-мембраною

Ці носії застосовують для виділення або очищення нуклеїнових кислот з висококонцентрованими розчинами хаотропних солей (йодид натрію, перхлорат натрію, гуанідинтіоціанат). Описано застосування діатомової землі як сорбент, в цьому випадку зв'язування також відбувається в присутності хаотропної солі. Інші методи засновані на спільній детергенції з матеріалами, що зв'язують нуклеїнові кислоти, або на використанні твердого сорбенту з

функціональними групами, що зв'язують нуклеїнові кислоти, в поєднанні з поліетиленгліканами і солями у високій концентрації.

Відома група універсальних методів пробопідготовки заснована на використанні афінних іонообмінників типу Chlex (низька ємність сорбенту), які, на відміну від скла, сорбують не ДНК, а, навпаки, домішки, що заважають реакції. Як правило, ця технологія включає дві стадії: кип'ятіння зразка, внаслідок чого клітинні стінки руйнуються, або лізис детергентами, що не інгібують ПЛР, а нуклеїнові кислоти виходять у розчин, і відбувається сорбція домішок на іонообмінниках. Метод простий і зручний у виконанні. Водночас зустрічаються клінічні зразки з такими домішками, які неможливо видалити за допомогою іонообмінників. Крім того, клітинні стінки деяких мікроорганізмів не піддаються руйнуванню простим кип'ятінням. У таких випадках необхідне введення додаткових стадій обробки зразка.

Вкрай зручним є метод виділення нуклеїнових кислот, запропонований Boom зі співавторами [Boometal,1990;Boometetal,1999]. Цей метод включає в себе стадію лізису клітин сильним хаотропним агентом, який руйнує клітинні мембрани і інактивує внутрішньоклітинні РНКазигуанідин-ціацінатом (GuSCN), з подальшою сорбцією НК на носії (скляні кульки, діатомова земля, скляне «молоко» тощо), з якого вона легко знімається елюючим буфером. Наприклад, набори на основі силіки пропонують АмплиСенс, Синтол та інші.

Схема виділення ДНК за використання таких наборів наведена на рис. 6.39.

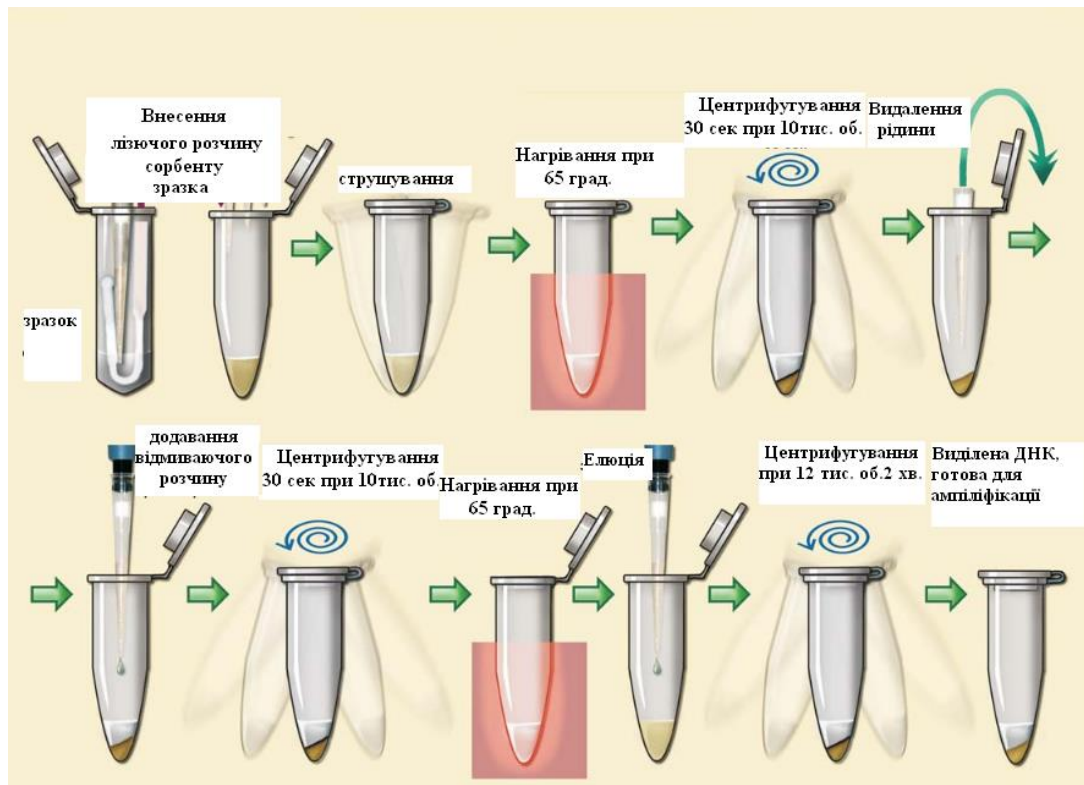


Рис.6.39. Схема виділення нуклеїнових кислот на основі силіки

Нуклеїнова кислота зворотно зв'язується зі склом у присутності високої концентрації хаотропних солей (наприклад, гуанідин хлориду, гуанідинтіоціанат). За таких умов зв'язування білків з матрицею не відбувається. Хаотропні з'єднання являють собою речовини, що порушують впорядковану структуру води і тим самим призводять мембрани в стан хаосу (наприклад, сечовина, йодид натрію). Крім зв'язування, хаотропні агенти забезпечують руйнування клітинних мембран і лізис клітин з наступним виходом нуклеїнової кислоти. Домішки відмиваються хаотропною сіллю, а хаотропна сіль – 80 % етанолом. Очищена нуклеїнова кислота знімається зі скла буфером з низькою іонною силою. Сьогодні багато комерційних фірм пропонують для виділення нуклеїнових кислот колонки зі скляною матрицею. Методи, в яких використовують ці колонки, включають стадії центрифугування або вакуумного відсмоктування.

Метод на основі магнітної сепарації

Використання магнітних твердих носіїв у біохімічних і молекулярно-біологічних процесах має багато переваг порівняно з немагнітними сепараційними методами. Зазвичай магніт прикладається до стінки пробірки, що містить зразок, щоб часточки агрегували біля стінки пробірки, а залишок зразка можна було видалити. Таким способом можливо відокремлювати компоненти клітинного лізату, які інгібують ДНК-полімерази та ПЛР-реакцію, наприклад, полісахариди, фенольні компоненти, гумус. Для процесу виділення використовуються магнітні носії з іммобілізованими афінними лігандами або виготовлені з біополімеру, що збільшує афінність до потрібної нуклеїнової кислоти. Магнітні часточки виробляються з різних синтетичних полімерів, біополімерів, пористого скла або на основі неорганічних магнітних матеріалів, таких як оксид заліза з модифікованою поверхнею. Особливо підходять для виділення суперпарамагнітні часточки, які не взаємодіють одна з одною у відсутності магнітного поля. Ці часточки набувають магнітного моменту в сильному магнітному полі, але не зберігають постійного магнетизму, коли поле прибирають. Якщо усунені магнітна агрегація і злипання часточок, то впродовж реакції досягається суспензування частинок і однакова екстракція нуклеїнових кислот.

Для автоматичного виділення нуклеїнових кислот використовуються магнітні часточки зі скляним покриттям. Нуклеїнова кислота зв'язується зі скляною поверхнею, потім, пов'язана з частками, вона проходить ті ж самі стадії екстракційного процесу, що і в методиці Boom: після серії відмивок у зразку залишається і НК, що сорбована на носії, з якого вона легко знімається за допомогою елюючого буфера. Прикладом є набори для виділення НК на магнітних частках виробництва Ambioo, Macherey-Nagel (NucleoMag), Invitrogen (Dynabeads®) та інші.

Метод зручний, технологічний і придатний для підготовки зразка до ампліфікації, його можна відтворити на роботизованих піпетуючих робочих станціях.

Однак можливі втрати продукту внаслідок незворотної сорбції на носії, а також у процесі численних відмивок. Особливо велике значення це має під час роботи з невеликими кількостями ДНК у зразку. Валові ДНК і РНК виділяються за допомогою одних і тих самих магнітних часточок. Щоб відокремити РНК від ДНК, РНК знищується до стада сепарації ДНК. Найкращим варіантом є додавання РНКаз або лугу. Навпаки, РНК може бути виділена за руйнування ДНК дезоксирибонуклеазою (ДНКазою).

Зазвичай до магнітних носіїв додають зв'язуючі розчини, за допомогою яких здійснюється селективне зв'язування нуклеїнових кислот. Наприклад, для зв'язування вірусних нуклеїнових кислот можна використовувати як вірусні білки, так і комплементарні ДНК- або РНК-послідовності.

Існують комерційні магнітні часточки з іммобілізованими на їх поверхні олігодеокситімідинами для ефективного і швидкого виділення високоочищеної матричної РНК (мРНК) з культур еукаріотичних клітин або виділення валової РНК. Метод виділення заснований на гібридизації послідовності олігодеокситімідину стабільним поліаденільованим 3-кінцем еукаріотичної мРНК. Довжина комплементарної послідовності – 20-30 олігонуклеотидів. Ця послідовність або безпосередньо ковалентно зв'язується з поверхнею часточки, або не опосередковано, через біотинілювання олігонуклеотидів за допомогою взаємодії між покритими стрептавідином частками. Кількість виробників магнітних часток постійно зростає, тому для поставленого завдання легко підібрати зручний метод.

Метод диференційованої сорбції домішок селективним осадом ДНК й промивкою в ТЕ-буфері з використанням набору реагентів Diamond DNA

Методика виділення ДНК за допомогою DiamondDNA включає в себе лізис тканини в лізуючий буфер, сорбуючі інгібітори ферментативних реакцій з розчину і ДНК з розчину з використанням високоефективного осаджувача ДНК. Принципова простота і низька тривалість процесу виділення і очищення ДНК досягається за рахунок застосування селективного сортування. Застосовують високоефективну селективну адсорбцію прикладів, що забезпечує унікальні показники чистоти ДНК (OD260/OD280 не менше 1,8). Залишки протеїнів в очищеній ДНК неможливо ідентифікувати за допомогою методів диференціального зафарбовування та наступної флуориметрії. Під час використання DiamondDNA досягається високий ступінь очищення від таких сильних інгібіторів ПЛР, як поліфенолів та полісахаридів. Вміст ДНК у розчині після очищення прямо пропорційний вмісту нуклеїнових кислот у вихідному об'єкті, що підвищує достовірність за використання кількісних методів аналізу (RealTime ПЛР та детекції за кінцевою точкою). На відміну від широко

використовуваних методів та наборів, заснованих на сорбції молекул ДНК на частках оксиду кремнію (у вигляді суспензії або на колонках), очищення ДНК з застосуванням DiamondDNA виключається сильна деградація молекул нуклеїнових кислот. Як результат довжин фрагментів становить більше 20 000 пар нуклеотидів.

Переваги використання набору реагентів DiamondDNA:

- Використання додаткової стадії осадження дозволяє отримувати більш високу якість очищення. У процесі використання DiamondDNA не відбувається безпосередньої взаємодії молекул ДНК з сорбентом, що дозволяє зберегти цілісність подвійної спіралі.

- Випадкове потрапляння сорбенту в ПЛР-суміш не блокує ампліфікацію.

- Використання протеаз є необов'язковим та використовується за виділення ДНК із деградованого матеріалу.

- У наборі відсутні токсичні речовини та заборонені для вільного обігу компонентів.

- Виділена ДНК за допомогою набору DiamondDNA готова для подальшого гібридного аналізу, постановки ПЛР та секвенування.

Слід зазначити, що методи виділення нуклеїнових кислот безперервно удосконалюють у бік зменшення кількості маніпуляцій і в ідеалі мають складатися з однієї або двох процедур. У молекулярній біології застосовують низку удосконалених методів розділення нуклеїнових кислот на фракції із сумарного препарату, які можуть використовуватися для отримання очищених препаратів нуклеїнових кислот та подальшої реакції ампліфікації. Це – хроматографічні методи очищення: звернена, іонообмінна (як адсорбентів використовують ДЕАЕ-целюлозу, ДЕАЕ-сефадекс), розподільна, гель-проникна хроматографія; хроматографія зразка на гелі фосфату кальцію і за спорідненістю на білкових носіях; ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози, фільтрація через гелі агарози, гель-електрофорез.

6.8. Методики аналізу отриманих генетичних даних та їх верифікація

6.8.1. Методи математичної обробки отриманих даних для підтвердження робочої гіпотези

Основною метою використання маркерів у селекції є виявлення, так званих, *локусів кількісних ознак* (Quantitative Trait Loci, QTL), тобто регіонів геному, які статистично вірогідно впливають на мінливість кількісних ознак. Звичайна схема селекції з використанням маркерів (Marker-Assisted Selection, MAS) включає три кроки:

- 1) виявлення одного або декількох QTL;

- 2) ідентифікація відповідного гена (причинної мутації);

3) збільшення частоти сприятливого алеля або методом відбору, або шляхом інтрогресії (відангл.introgression – гібридизація, проникнення генів одного виду у генетичний фонд другого).

Окрім селекції з використанням маркерів (MAS) застосовують також інтрогресію з використанням контрастних маркерів (Marker-AssistedIntrogression, MAI). Вона базується на тандемному відборі в межах програми зворотного схрещування, коли на першому етапі використовують алелі породи-донора, розташовані в межах або біля гена, який детермінує бажану ознаку (здебільшого це стійкість до певних захворювань), а на другому проводиться зворотне схрещування з метою повернути алелі породи-реципієнта.

Приклади генетичних тестів, які використовують на комерційній основі, наведено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

**Комерційні генетичні тести, які використовують у тваринництві,
(Dekkers J.C.M.,2004)**

Категорія ознак	Маркер	Види тварин
1	2	3
Спадкові дефекти	BLAD Citrulinaemia DUMPS CVM Maple syrup urine Mannosidosis RYR	молочна худоба молочна і м`ясна худоба молочна худоба молочна худоба молочна і м`ясна худоба молочна і м`ясна худоба свині
Екстер`єр	SKIT MC1R/MSHR MGF	свині свині, молочна і м`ясна худоба м`ясна худоба
Якість молока	κ-Casein β-lactoglobulin FMO3	молочна худоба молочна худоба молочна худоба
Якість м`яса	RYR RN/PRKAG3	свині свині
Споживання корму	MC4R	свині
Захворювання	Prp F18	вівці свині
Відтворення	Booroola Inverdale Hanna	вівці вівці вівці

1	2	3
Ріст і склад м'яса	MC4R IGF-2 Myostatin Callipyge	свині свині м'ясна худоба вівці
Надій і склад молока	DGAT1 GRH к-Casein	молочна худоба молочна худоба молочна худоба

Така система включає процедури збору та накопичення зразків ДНК, генотипування і аналіз даних з урахуванням фенотипу тварин, а також щоденного прийняття рішень (яких тварин генотипувати або регенотипувати у випадках помилок), яких тварин оцінювати за фенотипом тощо (Meuwissen Th., B.J. Hayes і M.E. Goddard, 2016.).

Для верифікації отриманих даних (від лат.verum – істинний, facere – робити), тобто перевірки теоретичних положень шляхом зіставлення різних груп (контроль, дослід) часто використовують дисперсійний аналіз.

Дисперсійний аналіз є самостійним і важливим розділом біологічної статистики. За допомогою його можна встановити роль окремих чинників у мінливості тієї чи іншої ознаки, розкласти загальну мінливість ознаки на складові частини, обумовлені досліджуваними конкретними чинниками (вік батьків, розмір батьків, порода, рівень годівлі тощо), а також спричинені випадковими, неконтрольованими чинниками (температура, освітлення тощо).

Таким чином, сутність дисперсійного аналізу полягає у вивченні статистичного впливу одного або декількох чинників на результативну (результуючу) ознаку.

Результативна (результуюча) ознака (наприклад, величина надою, багатоплідність, багатоплідність поросят), яку вивчають як результат впливу двох різних чинників:

1. Організованих у дослідженнях – різні породи, належність тварин до певної генетичної групи (маркерної групи), рівень годівлі тощо (\bar{x});
2. Не організованих, тобто випадкових, що не враховують в дослідженнях (\bar{z}).

У зоотехнії поняття «дисперсія» означає наявність різноманітних значень ознаки у різних особин, об'єднаних у групу досліджуваних тварин, а також міру, яка визначає ступінь цього розмаїття (в нашому випадку – генетичну групу).

Дисперсія позначається через С. Під час проведення дисперсійного аналізу в тій чи іншій групі тварин використовують загальну дисперсію.

Загальну дисперсію ознаки (C_y) в досліджуваній групі тварин розчленовують на її складові частини:

а) факторіальну дисперсію (групову дисперсію C_x), спричинену організованими чинниками;

б) випадкову дисперсію (залишкову дисперсію C_z), спричинену іншими неорганізованими в цьому досліді чинниками. При цьому сума факторіальної і випадкової дисперсій завжди дорівнює величині загальної дисперсії:

$$C_x + C_z = C_y$$

Для отримання достовірних даних дисперсійного аналізу під час побудови дисперсійних комплексів (особливо дво- і багатофакторних) необхідно правильно виконати такі операції:

1. Підбір чинників. Чинник – це будь-який прояв ознаки, вплив якого потрібно вивчити на результативну (результуючу) ознаку (жива маса, молочність, багатоплідність тощо).

Під час організації дво- і багатофакторних комплексів вільний вибір чинників для дослідження обмежений вимогою повної незалежності їх між собою, тобто вони не мають корелювати. Не можна брати, наприклад, масу і розмір тварини (обхват грудей і маса тварин), багатоплідність і розмір гнізда тощо. Незалежними між собою можуть бути чинники: стать тварин, порода тварин, належність до маркерної групи, температура і вологість приміщення тощо.

2. Розподіл чинників на градації. Для однофакторних, а також дво- і багатофакторних комплексів вони можуть мати кількісні (кількість стимуляторів у грамах, рівень годівлі +20 % або -20 % до норми тощо) і якісні градації (стать – чоловіча і жіноча; вгодованість у свиней: жирна, м'ясна, беконна; масть – червоно-ряба, світло-палева).

3. Підбір особин. Результати дисперсійного аналізу багато в чому залежать від правильного підбору особин як за кількістю, так і якістю. Підібрані за якістю особини мають відображати генеральну сукупність, для вивчення якої проводять дослідження. А тому за якістю (величиною результативної (результуючої) ознаки) особини мають бути підібрані за принципом випадкової вибірки (вибрані навмання). Порушення цього принципу завжди призводять до неправильних висновків.

Кількісно особини можуть бути розподілені по градаціях чинників різними способами: порівну (1:1), пропорційно (1:2), що полегшує проведення дисперсійного аналізу та нерівномірно (1:1,66), що ускладнює розрахунки.

4. Перетворення значень результативної ознаки. Для полегшення розрахунків можна незручні значення результативної (результуючої) ознаки (багатозначні, дробові) перетворити в зручні (малозначні, що виражаються цілими числами).

а) Всі значення ознаки можна помножити на одне і те саме число:

$$0,30 \times 100 = 30 \text{ або } 0,45 \times 100 = 45;$$

в кінцевий результат необхідно внести поправки (розділити на 100);

б) Всі значення ознаки по градаціях можна розділити на одне й те саме число (на 2, 3 або 4) і внести в кінці відповідні поправки, тобто помножити на те число, на яке було поділено;

в) Від всіх значень результативної ознаки можна відняти одне й те саме число (краще віднімати найменше значення ознаки). Поправку в кінцевому результаті при цьому потрібно вносити лише для середньої арифметичної M , додаючи до них раніше забране число.

5. Техніка розрахунків за дисперсійного аналізу. Розрахунок дисперсійних комплексів проводять за спеціальними робочим формулами. Однак техніка розрахунків для малих і великих груп різна. Для малих груп (вбірок) дисперсії розраховуються простіше, для великих – трохи складніше. Групу в 40–50 варіантів (багатозначних показників) вже вважають великою.

Однофакторний комплекс

Це комплекс, в якому вивчається дія на результативну (результуючу) ознаку одного чинника (рівень протеїнового живлення маток як чинник, багатоплідність як результативна (результуюча) ознака).

Техніка розрахунку однофакторного комплексу для малих груп може бути показана на такому прикладі: вивчити дію білкової добавки тваринного походження на багатоплідність свиноматок, якщо встановлено три градації цього чинника: перша група – 0 %, друга група – (+10 %) і третя група – (+20 %) добавки до добової норми перетравного протеїну. Результативною (результуючою) ознакою було визначено багатоплідність свиноматок за дослідний період. Для кожної градації чинника (0 %; +10 %; +20 %) було вибрано зі збереженням принципу випадковості по дві особини (свиноматки), які за період дослідження показали різну багатоплідність, що виражено в таких числах: перша група 14 і 6; друга – 20 і 16; третя – 10 і 6 поросят. Ці числа можна легко перетворити шляхом віднімання з них мінімальної багатоплідності (6 поросят), внаслідок чого отримані дані (величини результативної (результуючої) ознаки), більш зручні для рахунку (перша група – 8 і 0, друга – 14 і 10 і третя – 4 і 0).

У наведеному прикладі приватні середні (частные средние) отримані в перетвореному вигляді: на 6 одиниць менше дійсних. Щоб відновити фактичне значення результативної (результуючої) ознаки, необхідно до кожної середньої (M) додати величину 6, – $-(4 + 6)$; $(12 + 6)$ тощо.

Після цього отримаємо фактичну середню багатоплідність по градаціях чинника: 10,18 і 8 поросят.

Таким чином, встановлено, що білкова добавка в кількості 10 % до норми чинить позитивний ефект на багатоплідність свиноматок, ніж добавка 20 % до норми. Для остаточного висновку необхідно визначити ступінь або силу впливу чинника на результативну (результуючу) ознаку.

**Техніка розрахунку за дисперсійного аналізуоднофакторного комплексу
для малих вибірок**

Позначення	Показники	Градація чинника			r – число градацій
		0	10	20	
v	Значення результативної ознаки, дати	8; 0	14; 10	4; 0	$\Sigma v = 36$
v^2	Квадрат дат	64; 0	196; 100	16; 0	$\Sigma v^2 = 376$
n	Частоти – кількість свиноматок	2	2	2	$n_x = 6$
Σv	Сума значень результативної ознаки	8	24	4	
$(\Sigma v)^2$	Квадрат суми значень результативної ознаки	64	576	16	
$h = \frac{(\Sigma v)^2}{n}$	Частка від ділення	32	288	8	$\Sigma h = 328$
$M = \frac{\Sigma v}{n}$	Частка від середньої результативної ознаки	4 + (6)	12 + (6)	2 + (6)	$M = 6 + (6)$
M	Середня багатоплідність свиноматок (гол.)	10	18	8	$M = 12$

Для визначення ступеня впливу організованого чинника необхідно знайти відношення факторіальної дисперсії до загальної $(\frac{C_x}{C_y})$. Суть розрахунків, зроблених в цій таблиці, зводиться до обчислення показників ($\Sigma v^2 = 376$; $\Sigma h = 328$), використовуваних у спеціальних робочих формулах: загальної (C_y), факторіальної (C_x) і випадкової дисперсії (C_z).

Для розрахунку загальної, факторіальної і випадкової дисперсії необхідно визначити:

1) допоміжну величину H шляхом зведення в квадрат загальної суми результативних показників і розділити цю величину на кількість особин (n):

$$H = \frac{(\Sigma v)^2}{n} = \frac{(36)^2}{6} = \frac{1296}{6} = 216;$$

2) величину загальної дисперсії результативної (результуючої) ознаки за такою формулою:

$$C_y = \Sigma v^2 - H = 376 - 216 = 160;$$

3) величину випадкової дисперсії:

$$Cz = \Sigma v^2 - \Sigma h = 376 - 328 = 48;$$

4) величину факторіальної дисперсії:

$$Cx = \Sigma h - N = 328 - 216 = 112;$$

5) ступінь впливу організованого чинника на результативну (результуючу) ознаку:

$$\eta^2 = \frac{Cx}{Cy}$$

6) ступінь впливу неорганізованих (випадкових) чинників $\eta^2 = \frac{Cz}{Cy}$

Зведення результатів факторного комплексу дисперсійного аналізу для малих вибірок представлено в табл. 6.5.

Таблиця 6.5

Зведення результатів дисперсійного аналізу для малих вибірок

Показники		x	z	y
$Cy = \Sigma v^2 - N = 376 - 216 = 160$	C	112	48	160
$Cz = \Sigma v^2 - \Sigma h = 376 - 328 = 48$	η^2	0,70	0,30	1,00
$Cx = \Sigma h - N = 328 - 216 = 112$ Перевірка: $Cx + Cz = Cy = 112 + 48 = 160$	%	70	30	100
Число степенів свободи	v	$v_x = l - 1 = 3 - 1 = 2$	$v_z = n - l = 6 - 3 = 3$	$v_y = n - 1 = 6 - 1 = 5$
Корегована дисперсія (девіанта)	σ^2	$\sigma_x^2 = \frac{Cx}{v_x} = \frac{112}{2} = 56$	$\sigma_z^2 = \frac{Cz}{v_z} = \frac{48}{3} = 16$	
Коефіцієнт достовірності	F	$F = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_z^2} = \frac{56}{16} = 3,5$		

Табличні значення F $\left\{ \begin{array}{l} \text{при } 0,95 = 9,6 \\ 0,99 = 30,8 \\ 0,999 = 148,5 \end{array} \right.$

Загальний підсумок цього аналізу можна виразити таким чином:

- вплив організованого чинника (рівень протеїну на багатоплідність свиноматок) – 70 %;
- вплив неорганізованого чинника (всіх інших чинників на плодючість маток) – 30 %;
- вплив усіх чинників – 100 %. Надалі визначаємо число степенів свободи (v). Для Cx воно дорівнює числу класів за фактором l - 1 або:

$$v_x = l - 1 = 3 - 1 = 2.$$

Для залишкової дисперсії C_z число ступенів свободи визначають за різницею між числом спостережень n і числом класів l , тобто:

$$v_y = v_x - v_z = 6 - 3 = 3.$$

Число ступенів свободи для загальної дисперсії дорівнює числу спостережень (n) без одиниці, або:

$$v_y = n - 1 = 6 - 1 = 5.$$

Сума від ступенів свободи має давати їх число для загальної дисперсії, тобто:

$$v_y = v_x + v_z$$

Потім розраховуємо кориговану дисперсію (так звану девіантну – σ^2). Для цього кожен дисперсію (факторіальною і залишковою) ділять на відповідне число ступенів свободи:

$$\sigma_x^2 = \frac{C_x}{v_x} = \frac{112}{2} = 56; \quad \sigma_z^2 = \frac{C_z}{v_z} = \frac{48}{3} = 16$$

Після цього визначають достовірність факторіальної дисперсії. Для визначення достовірності факторіальної дисперсії і впливу чинника мінливості ознаки шляхом ділення факторіальної дисперсії на залишкову обчислюють коефіцієнт достовірності Фішера:

$$F = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_z^2} = \frac{56}{16} = 3,5$$

Далі порівнюють розраховане значення F зі значенням його в таблиці (додаток II). При цьому слід пам'ятати, що по лівій крайній колонці знаходять значення $v_2 = v_z$ (якщо воно у нас дорівнює 3), а по верхній титульного рядка – значення $v_1 = v_x$ (в прикладі воно дорівнює 2). На перетині зазначених рядка і стовпчика знаходять значення табличного F за трьох рівнів ймовірності:

$$0,95 = 9,6;$$

$$0,99 = 30,8;$$

$$0,999 = 148,5.$$

Оскільки F дорівнює 3, 2, вплив досліджуваного чинника на результативну (результуючу) ознаку не достовірний.

Завдання 1.

Встановити вплив чинника породності на перетравність поживних речовин (результативну (результуючу) ознаку), якщо за принципом випадкової вибірки було відібрано для кожної градації чинника по три особи (підсвинка), що мають такі показники коефіцієнта перетравності протеїну: велика біла порода – 78,33; 76,70; 76,37 %; велика біла × ландрас – 81,20; 82,16; 83,50 %

Таблиця 6.6

**Техніка розрахунку за дисперсійного аналізу однофакторного комплексу
для малих вибірок**

Показники	Порода	
	A ₁ (велика біла)	A ₂ (велика біла × ландрас)
v – значення результативної ознаки	78,33 76,70 76,37	81,20 82,16 83,50
v ² – квадрат значень (дат)	6135,59 5882,89 5832,37	6593,44 6750,26 6972,25
n – об'єм градації	3	3
Σv – сума дат	231,40	246,86
(Σv) ² – квадрат суми дат	53545,96	60939,85
$h = \frac{(\Sigma v)^2}{n}$	17848,65	20313,28
$M = \frac{\Sigma v}{n}$	77,13	82,29

Для обчислення загальної, факторіальної і випадкової дисперсії необхідно визначити:

$$H = \frac{(\Sigma v)^2}{n} = \frac{(478,26)^2}{6} = \frac{228732,62}{6} = 38122,1$$

$$C_y = \Sigma v^2 - H = 38166,80 - 38122,1 = 44,70;$$

$$C_z = \Sigma v^2 - \Sigma h = 38166,80 - 38161,93 = 4,87;$$

$$C_x = \Sigma h - H = 38161,93 - 38122,1 = 39,83;$$

$$C_x + C_z = C_y; C_y = 39,83 + 4,87 = 44,70.$$

Таблиця 6.7

**Зведення результатів дисперсійного аналізу однофакторного комплексу
для малих вибірок**

$H = \frac{(\Sigma v)^2}{n} = \frac{(478,26)^2}{6} = \frac{228732,62}{6} = 38122,1$		Дисперсії		
		x	z	y
$C_y = \Sigma v^2 - H = 38166,80 - 38122,1 = 44,70$	C	39,83	4,87	44,70
$C_z = \Sigma v^2 - \Sigma h = 38166,80 - 38161,93 = 4,87$	η^2	$\frac{C_x}{C_y}$	$\frac{C_z}{C_y}$	$\frac{C_y}{C_y}$
$C_x = \Sigma h - H = 38161,93 - 38122,1 = 39,83$	η^2	0,8911	0,1089	1,00
$C_x + C_z = C_y; C_y = 39,83 + 4,87 = 44,70$	%	89,11	10,89	100
Число степенів свободи	v	$v_x = l-1 = 2-1=1$	$v_z = n-l = 6-2=4$	$v_y = n-1 = 6-1=5$
Корегована дисперсія (девіанта)	σ^2	$\sigma_x^2 = \frac{C_x}{v_x} = \frac{39,83}{1} = 39,83$	$\sigma_z^2 = \frac{C_z}{v_z} = \frac{4,87}{4} = 1,22$	
Коефіцієнт достовірності Табличні значення		$F = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_z^2} = \frac{39,83}{1,22} = 32,64$ 74,1 $P_3 = 0,999$ F21,2 $P_2 = 0,99$ 7,7 $P_2 = 0,95$		

Отже, в цьому прикладі встановлено достовірний вплив чинника на результативну (результуючу) ознаку (за $P > 0,99$).

Двофакторний комплекс

Структура двофакторних комплексів складніша, ніж однофакторних. Для полегшення розрахунків удвофакторних комплексах необхідно, щоб досліджувані чинники були незалежними один від одного, а частоти були пропорційні (градаціям).

Вивчаючи дію більше ніж одного чинника, необхідно враховувати вплив на результативну (результуючу) ознаку не тільки чинника A і чинника B , а й їхній спільний вплив AB на варіюючу ознаку.

Тому дисперсійний аналіз двофакторного комплексу має визначити не тільки S_y, S_x, S_A, S_B, S_Z , але й дисперсію S_{AB} . Показники S_y, S_x, S_z розраховують так само, як і в однофакторному комплексі.

Для розрахунку факторіальної дисперсії S_A і S_B обробка даних ведеться дещо по-новому. Для отримання Σh_A та Σh_B обробляють решітки, розділені для чинників A і B , складаючи підсобні таблиці. У рівномірних і пропорційних комплексах дисперсія спільної дії, чинників обчислюють: $S_{AB} = S_x - S_A - S_B$.

Загальна дисперсія $S_y = \Sigma v^2 - N$.

Факторіальна дисперсія $S_x = \Sigma h - N$.

Дисперсія від чинника A $S_A = \Sigma h_A - N$.

Дисперсія від чинника B $S_B = \Sigma h_B - N$.

Приклад. Визначити дію добавки трав'яного борошна (B) на багатоплідність свиноматок, встановлено дві градації цього чинника (B_1) – перша група 0 %, B_2 – друга група +25 % до добового раціону за поживністю.

Чинник A – порода свиноматок, його градації;

A_1 – велика біла;

A_2 – миргородська.

Для кожної градації чинника було вибрано по дві особини (поросні свиноматки), які за досвідчений період показали таку багатоплідність:

A ₁ – велика біла	B ₁ I група 8 і 11 поросят
	B ₂ II група 9 і 13 поросят
A ₂ – миргородська	B ₁ I група 10 і 15 поросят
	B ₂ II група 11 і 17 поросят

Перший чинник
 A

Другий чинник
 B

Результативна (результуюча)
ознака

Перетворимо числа результативної (результуючої) ознаки шляхом віднімання числа 5 з кожної величини дат, внаслідок чого отримуємо дані більш зручні для розрахунку:

B ₁ – 3; 6	A ₁
B ₂ – 3; 8	
B ₁ – 5; 10	A ₂
B ₂ – 6; 12	

Таблиця 6.8

Техніка розрахунку за дисперсійного аналізу двофакторного комплексу для малих вибірок

Показники	Порода (A)				A = 2 B = 2	Чинники	n	Σv	$(\Sigma v)^2$	$h = \frac{(\Sigma v)^2}{n}$	$M = \frac{\Sigma v}{n}$
	велика біла		миргородська								
	Трав'яне борошно (B)										
	B_1	B_2	B_1	B_2							
v	6; 6	4; 8	5; 10	6; 12	$\Sigma v = 54$	A_1	4	21	441	110	5 (+5)
v^2	9; 36	16; 64	25; 100	36; 144	<u>$(\Sigma v)^2 = 430$</u>	A_2	4	33	1089	272	8 (+5)
n	2	2	2	2	<u>$H = \frac{(54)^2}{8} = 365$</u>		8	54		<u>$\Sigma h_A = \frac{(\Sigma v)^2}{n} = 382$</u>	
Σv	9	12	15	18		B_1	4	24	576	144	6 (+5)
$(\Sigma v)^2$	81	144	225	324		A_2	4	30	900	225	7 (+5)
$h = \frac{(\Sigma v)^2}{n}$	40*	72	112	162	<u>$\Sigma h = 386^{**}$</u>		8	54		<u>$\Sigma h_B = 369$</u>	

*81/2 = 40,5 – заокруглюємо до 40 для простішого розрахунку

** Результати п'яти величин (підкреслені) будуть використані в розрахункових формулах дисперсійного аналізу.

**Зведення результатів дисперсійного аналізу двофакторного комплексу
для малих вибірок**

Показники	Літерні позначення	Дія чинника породи А	Дія чинників трав'яного борошна В	Спільна дія обох чинників АВ	Дисперсія		
					х факторіальна	з випадкова	у загальна
$C_y = \Sigma v^2 - H = 430 - 365 = 65$							
$C_z = \Sigma v^2 - \Sigma h = 430 - 386 = 44$							
$C_x = \Sigma h - H = 386 - 365 = 21$	С	17	4	0	21	44	65
$C_A = \Sigma h_A - H = 382 - 365 = 17$							
$C_B = \Sigma h_B - H$	η^2	0,26	0,06	0,00	0,32	0,68	1,00
$C_{AB} = C_x - C_A - C_B = 21 - 17 - 4 = 0$	η^2	$\frac{C_A}{C_y}$	$\frac{C_B}{C_y}$	$\frac{C_{AB}}{C_y}$	$\frac{C_x}{C_y}$	$\frac{C_z}{C_y}$	$\frac{C_y}{C_y}$

Знайти ступінь впливу чинника А, В, АВ і відношення факторіальної дисперсії до загальної.

Загальний підсумок цього аналізу можна виразити таким чином: вплив породи – 26 %; вплив добавок трав'яного борошна – 6 %; вплив поєднань порід з добавкою трав'яного борошна – 0 %; сумарна дія організованих чинників – 32 %; вплив неорганізованих чинників – 68 %. Вплив усіх чинників – 100 %.

Знайти ступінь впливу чинника А, В, АВ і відношення факторіальної дисперсії до загальної, тобто сумарний (загальний) вплив організованих у досвіді чинників на багатоплідність.

Глава 7. СЕНСОРНИЙ АНАЛІЗ

7.1. Вступ до сенсорного аналізу/Р. де Флавіз, О. Тітлова, Л. Федотова, І. Нейковчена/

7.1.1. Застосування сенсорного аналізу в сучасних харчових технологіях

У сучасних умовах посилення конкуренції на продовольчому ринку сенсорний аналіз стає дуже важливим і незамінним інструментом не тільки для контролю якості, але і для маркетингу. Органолептичні ознаки харчового продукту вважають важливими чинниками з початку процесу індустріалізації харчових продуктів через їх вплив на його загальну якість.

Відповідно до ISO 5492: 2008 «Сенсорний аналіз – визначення» сенсорний аналіз – це наука, що займається оцінюванням органолептичних ознак продукту за допомогою органів чуття (зору, запаху, смаку, дотику та слуху). Так, його використовують для характеристики та вимірювання зовнішнього вигляду, аромату, смакових та фактурних характеристик, а також звукових характеристик (в окремих випадках) харчових продуктів. Крім того, чотири змінні впливають на сенсорну оцінку: їжа, люди, середовище тестування та застосовані методи тестування.

Сенсорний аналіз можна використовувати для різних цілей. Деякі питання сенсорного аналізу мають на меті описати характеристики продукту та / або виміряти будь-які відмінності між продуктами. Інші питання сенсорного аналізу мають на меті описати прийнятність продукту. Наприклад: «Який смак цього продукту?», «Які три найважливіші текстурні ознаки ви сприймаєте в цьому продукті?», «Які сенсорні відмінності між продуктом А і В?», «Вам подобається цей продукт?», «Наскільки вам сподобався цей товар за шкалою від 1 до 9?», «Чи прийнятний цей продукт?», «Що вам найбільше подобається в цьому продукті?», «Чи кращий продукт А порівняно з продуктом В?», «Якому з трьох продуктів А, В або С ви надаєте перевагу?».

З огляду на зазначені цілі, цілями сенсорного аналізу в сучасних харчових технологіях є такі:

- 1) виявити сенсорні відмінності між продуктами;
- 2) описати якісно та кількісно сенсорні ознаки харчових продуктів у контролі якості, розробці продукції, дослідженні ринку, комунікації;
- 3) оцінити сенсорні якості їжі: відсутність дефектів та відповідність заданим стандартам;
- 4) вивчити емоційні реакції споживачів на їжу: прийняття їжі та уподобання;
- 5) вивчити взаємозв'язок між органолептичними властивостями та емоційними реакціями споживачів на їжу (оптимізація, диференціація, інноваційність);

б) вивчити взаємозв'язок між хіміко-фізичним складом та сенсорними властивостями їжі (зокрема вплив робочих умов на обробку їжі).

Сенсорний аналіз – це природнича наука. Вимірювання харчових сенсорних ознак слід проводити ретельно у повній відповідності до стандартизованих методологій. У цьому випадку сенсорна інформація може забезпечити чудове уявлення про світ. В іншому випадку, коли вимірювання зроблені погано, вони більше заплутують, ніж несуть потрібну інформацію.

Під час проведення сенсорного аналізу мають дотримувати ретельний контроль, зокрема дотримання процедури презентації зразків, усунення суб'єктивності та упередженості, застосування методів, які вимагають від учасників дискусії продемонструвати свої здібності, а не поклатися на звіти. Недотримання будь-якого з цих елементів управління зменшує значення зібраних сенсорних даних. З іншого боку, визначення відповідного контролю та забезпечення їх наявності призведе до достовірних даних про їжу, яку жоден прилад не може виміряти, тобто якість їжі.

7.1.2. Основні визначення і терміни

Всі визначення та терміни сенсорного аналізу наведені тут відповідно до ISO 5492: 2008 «Сенсорний аналіз – визначення».

Загальна термінологія містить такі визначення:

- сенсорний – стосуються використання почуттів, тобто досвіду людини;
- властивість – відчутна характеристика;
- органолептичний – стосується властивостей, які сприймаються органами чуття, тобто до властивостей товару;
- сенсорний оцінювач – будь-яка людина, яка бере участь у сенсорному тесті. Є дві можливості: простий оцінювач – це людина, яка не відповідає жодному конкретному критерію, і ініційований оцінювач, який вже брав участь у сенсорному тесті;
- вибраний оцінювач – оцінювач, обраний за його вміння проводити сенсорний тест;
- експерт – в загальному розумінні людина, яка за допомогою знань чи досвіду має компетенцію висловлювати думки в галузях, щодо яких проводять консультації;
- експертний сенсорний оцінювач – вибраний оцінювач з продемонстрованою сенсорною чутливістю, той, який навчався в цій галузі, та з досвідом сенсорного тестування, який здатний робити послідовні та повторювані сенсорні оцінки різних продуктів;
- сенсорна панель – група оцінювачів, що беруть участь у сенсорному тесті;
- панельне навчання – серія сеансів, на яких оцінювачі орієнтуються на завдання, які слід виконати сенсорною панеллю для оцінювання конкретного

продукту (продуктів), що може містити відповідні характеристики продукту, стандартні шкали рейтингу, методи оцінювання та термінологію;

- панельний консенсус – згода між оцінювачами щодо термінології та інтенсивності характеристик товару;

- споживач – особа, яка використовує товар;

- дегустатор – вибраний оцінювач або експерт, який оцінює органолептичні ознаки харчового продукту, головним чином за допомогою роту;

- дегустація – сенсорна оцінка харчового продукту в роті;

- продукт – їстівна речовина, яку можна оцінити сенсорним аналізом;

- зразок, зразок продукту – зразок або аликвота товару, представлений для оцінювання;

- тестовий зразок – зразок досліджуваного матеріалу;

- тестова частина – частина досліджуваного зразка, яка безпосередньо перевіряється оцінювачем;

- контрольна точка – вибране значення (одного або декількох продуктів або його ознак), щодо якого оцінюють зразки;

- контрольний зразок – зразок досліджуваного матеріалу, обраний як еталон, з яким порівнюють всі інші зразки;

- гедонічний – стосується того, подобається чи не подобається;

- прийнятність – ступінь, до якого вимірювана речовина подобається чи не подобається, загальний або для певних сенсорних ознак;

- надання переваги – вибір, визначений оцінювачем, одного стимулу чи продукту над іншими у визначеному наборі на основі гедонічних критеріїв;

- відраза – почуття огиди, спровокованої подразником;

- розрізнення – акт якісної та / або кількісної диференціації двох або більше стимулів;

- розрізнявальна здатність – чутливість, гострота, здатність сприймати кількісні та / або якісні відмінності;

- апетит – фізіологічний та психологічний стан, виражений бажанням їсти та / або пити;

- апетитний – здатний збудити апетит людини;

- смакові якості – якість продукту, що робить його приємним їсти чи пити;

- психофізика – вивчення зв'язків між вимірюваними стимулами та відповідними сенсорними реакціями;

- ольфактометрія – вимірювання реакції оцінювачів на нюхові подразники (відносять до оцінювачів);

- ольфактометр – апарат, що використовують для подання нюхових подразників оцінювачам у відтворюваних умовах;

- одориметрія – вимірювання властивостей запаху речовин (відносять до продуктів);

- odourant– речовина, летючі речовини якої можуть сприйматися органом нюху (зокрема нерви);
- якість – сукупність ознак та характеристик товару, процесу чи послуги, що наділяють його здатністю задовольняти потреби;
- коефіцієнт якості – одна ознака або характеристика, обрана серед інших для оцінювання загальної якості товару;
- ставлення – схильність відповідати заданим способом до класу предметів чи ідей;
- жування – акт жування, подрібнення та обрізання зубами.

Термінологія, що стосується органів чуття, органолептичних ознак та методів звертається до ISO 5492: 2008 «Сенсорний аналіз – визначення».

Наразі існує 39 стандартів ISO для сенсорного аналізу. Вони охоплюють усі необхідні моменти щодо лексики, організації тестових кабінетів, учасників тестування, методики тощо. Повний перелік їх представлений нижче. Однак його весь час переглядають та доповнюють (див. Перелік ISO, що розроблено нижче).

Стандарти ISO у сенсорному аналізі:

1. ISO 5492: 2008 Сенсорний аналіз –Визначення.
2. ISO 20613: 2019 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки щодо застосування сенсорного аналізу в контролі якості.
3. ISO 8586: 2012 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки щодо відбору, навчання та моніторингу відібраних оцінювачів та експертних сенсорних оцінювачів.
4. ISO 11037: 2011 Сенсорний аналіз –Вказівки щодо сенсорної оцінки кольору продуктів.
5. ISO 8589: 2007 Сенсорний аналіз – Загальне керівництво для проектування приміщень для випробувань.
6. ISO 3591: 1977 Сенсорний аналіз – Прилад – Скло для дегустації вина.
7. ISO 16657: 2006 Сенсорний аналіз – Прилад – Скло для дегустації оливкової олії.
8. ISO 13300-1: 2006 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки для персоналу лабораторії сенсорної оцінки – Частина 1: Обов'язки персоналу.
9. ISO 13300-2: 2006 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки для персоналу лабораторії сенсорної оцінки – Частина 2: Набір та навчання керівників панелей.
10. ISO 6658: 2017 Сенсорний аналіз – Методологія – Загальні вказівки.
11. ISO 11132: 2012 Сенсорний аналіз – Методологія – Керівні принципи моніторингу працездатності кількісної сенсорної панелі.
12. ISO 8588: 2017 Сенсорний аналіз – Методологія – тест «А»–«не А».
13. ISO 4120: 2004 Сенсорний аналіз – Методологія – Тест на трикутник.
14. ISO 10399: 2017 Сенсорний аналіз – Методологія –Duo-trio тест.
15. ISO 5495: 2005 Сенсорний аналіз – Методологія – Тест на парне порівняння.

16. ISO 8587: 2006 Сенсорний аналіз – Методологія – Рейтинг.
17. ISO 13299: 2016 Сенсорний аналіз – Методологія – Загальні вказівки щодо встановлення сенсорного профілю.
18. ISO 11036: 1994 Сенсорний аналіз – Методологія – Текстурний профіль.
19. ISO 16820: 2004 Сенсорний аналіз – Методологія – Послідовний аналіз.
20. ISO 29842: 2011 Сенсорний аналіз – Методологія – Дизайн збалансованих неповних блоків.
21. ISO 13302: 2003 Сенсорний аналіз – Методи оцінки модифікацій смаку харчових продуктів завдяки упаковці.
22. ISO 13301: 2018 Сенсорний аналіз – Методологія – Загальні вказівки щодо вимірювання порогів виявлення запаху, аромату та смаку за допомогою триальтернативної процедури відбору зразків за заздалегідь встановленого критерію (3-AFC).
23. ISO 5496: 2006 Сенсорний аналіз – Методологія – Ініціація та навчання оцінювачів щодо виявлення та розпізнавання запахів.
24. ISO 11056: 1999 Сенсорний аналіз – Методологія – Метод оцінки величини.
25. ISO 5497: 1982 Сенсорний аналіз – Методологія – Вказівки щодо підготовки зразків, для яких прямий сенсорний аналіз неможливий.
26. ISO 11136: 2014 Сенсорний аналіз – Методологія – Загальні вказівки щодо проведення гедонічних випробувань із споживачами в контрольованій зоні.
27. ISO 3972: 2011 Сенсорний аналіз – Методологія – Метод дослідження чутливості смаку.
28. ISO 16779: 2015 Сенсорний аналіз – Оцінка (визначення та перевірка) терміну придатності харчових продуктів.
29. ISO 4121: 2003 Сенсорний аналіз – керівництво щодо використання шкали кількісних відповідей.
30. ISO 11035: 1994 Сенсорний аналіз – Ідентифікація та вибір дескрипторів для встановлення сенсорного профілю за допомогою багатовимірного підходу.
31. ISO 22308: 2005 Коркові пробки – Сенсорний аналіз.
32. ISO 707: 2008 Молоко та молочні продукти – Керівництво щодо відбору проб.
33. ISO 22935-1: 2009 Молоко та молочні продукти – Сенсорний аналіз – Частина 1: Загальні вказівки щодо набору, відбору, навчання та моніторингу оцінювачів.
34. ISO 22935-2: 2009 Молоко та молочні продукти – Сенсорний аналіз – Частина 2: Рекомендовані методи сенсорної оцінки.
35. ISO 22935-3: 2009 Молоко та молочні продукти – Сенсорний аналіз – Частина 3: Керівництво щодо методу оцінки відповідності специфікаціям продукту щодо сенсорних властивостей шляхом виставлення балів.
36. ISO 18794: 2018 Кава – Сенсорний аналіз – Визначення.

37. ISO 6668: 2008 Зелена кава — Підготовка зразків для використання в сенсорному аналізі.

38. ISO 7304-1: 2016 Пшенична тверда манна крупа та харчові макаронні вироби — Оцінка якості приготування макаронних виробів за допомогою сенсорного аналізу – Частина 1: Довідковий метод.

39. ISO 7304-2: 2008 Аліментарні макаронні вироби з манної крупи пшениці твердих сортів – Оцінка якості варіння за допомогою сенсорного аналізу – Частина 2: Рутинний метод.

Зараз знаходиться на стадії розробки:

1. Сенсорний аналіз ISO / FDIS 16820 – Методологія – Послідовний аналіз (раніше ISO 16820: 2004).

2. Сенсорний аналіз ISO / CD 11132 – Методологія – Керівні принципи моніторингу працездатності кількісної сенсорної панелі (раніше ISO 11132: 2012).

3. ISO / DIS 11036 Сенсорний аналіз – Методологія – Текстурний профіль (раніше ISO 11036: 1994).

4. Сенсорний аналіз ISO / DIS 8586 – Загальні вказівки щодо відбору, навчання та моніторингу відібраних оцінювачів та експертних сенсорних оцінювачів (раніше ISO 8586: 2012).

5. Сенсорний аналіз ISO / DIS 4120 – Методологія – Тест на трикутник (раніше ISO 4120: 2004).

6. ISO / DIS 11056 Сенсорний аналіз – Методологія – Метод оцінки величини (раніше ISO 11056: 1999, ISO 11056: 1999 / Amd 1: 2013, ISO 11056: 1999 / Amd 2: 2015).

7. ISO / AWI 22308-1 Коркова кора, обрана в якості продукту для пляшок – Частина 1: Сенсорний аналіз (раніше ISO 22308: 2005).

7.2. Сенсорні ознаки та їх сприйняття

Люди– це головний інструмент сенсорного аналізу, оскільки вони використовують свої чуття для оцінювання сенсорних властивостей (ознак) харчових продуктів. Ось чому так важливо мати відібраних оцінювачів та підготовлену комісію. Це важливо для контролю якості, оскільки сенсорний аналіз може допомогти у відповіді на різні запитання:

- Визначте, чому саме надають споживачі переваги та причини, чому їм подобається саме цей продукт.
- Швидке вимірювання кількісно вимірюваними властивостями якості продукції.
- Інші аналітичні методи іноді не можуть виявити конкретний дефект на відміну від сенсорного аналізу.
- Люди – найкращий інструмент для виявлення віддушок на низьких рівнях і єдиний для вимірювання вподобань.

- Забезпечення економічно ефективних нових або навіть інноваційних продуктів.

- Моніторинг обробки та зміни рецептури.

Сенсорне оцінювання – це наукова дисципліна, яку використовують для викликання, вимірювання, аналізу та інтерпретації реакцій на сенсорні ознаки харчових продуктів та матеріалів, таких як зовнішній вигляд, аромат, смак, текстура та звук, як вони сприймаються почуттями людини – зором, нюхом, смаком, дотиком і слухом. Для розуміння сили сенсорної оцінки слід розвивати розуміння основної психології та фізіології органів чуття. Це розуміння почуттів допоможе в подальшому розумінні продуктів, які тестують.

Структура сенсорної системи людини представлена на рис. 1.

Є п'ять органів чуття, що складають нашу чуттєву систему і допомагають взаємодіяти із зовнішнім світом: очі, вуха, ніс, шкіра та язик. Іноді вестибулярна система, завдяки якій ми усвідомлюємо своє розміщення в просторі, збереження рівноваги, відчуття ваги і положення, додається до цього списку як шостий орган почуття. Ці органи сприймають інформацію із зовнішнього світу, а потім перетворюють її на нервовий імпульс, який потрапляє в мозок для аналізу та формування реакції. Кожному органу чуття відповідає певна ділянка кори головного мозку, яка обробляє імпульси.

Зір. Колір – це зорове сприйняття, що виникає внаслідок стимуляції сітківки ока світлом (довжини хвиль між 380 і 760 нм).

Колір і зовнішній вигляд – це перші ознаки, які часто впливали на якість продуктів, а також прозорість напоїв. Важливість кольору також демонструється в таких продуктах харчування, як вино, оливкова олія та щербет, в яких колір впливає на сприйняття інших ознак завдяки асоціації з їх кольором. Дійсно, люди часто очікують, що жовтий напій має аромат лимона, а червона полуниця має бути солодкою на смак.

Чинники, що впливають на сприйняття зором, охоплюють: інтенсивність джерела світла, розподіл довжини хвилі у джерелі світла, характеристики поглинання чи пропускання світла, характеристики поверхні та форму виробу, відбиття, текстуру чи поверхню виробу. Фізіологічні чинники охоплюють стан адаптації, чутливість ока до конкретної довжини хвилі та недостатність кольорового зору.

Для отримання надійних результатів тестування дегустаторів слід перевірити на відсутність недоліків у кольоровому зорі. Це можна зробити за допомогою різних тестів (див. Розділ 3.2). Крім того, слід визначити стандарти візуальної оцінки (пам'ять, фізичні кольорові таблички або модельні вироби). Умови освітлення для оцінювання конкретного продукту мають бути заздалегідь визначені – зразки мають бути оцінені під одним і тим самим джерелом світла. В іншому випадку може виникнути метамерна відповідність, коли пара зразків може збігтися за одних умов освітлення, але не відповідати один одному в більшості інших умов.

Звук. Звукові хвилі виробляються вібраціями, що стискаються разом або завдяки молекулам, розносяться в повітрі. Звук можна описати за частотою та амплітудою. Його вимірюють частотою (Гц) – кількість циклів, які звукова хвиля може виконати за одну секунду. Частота відповідає висоті звуку. Амплітуда – це максимальний тиск, створюваний звуковими хвилями. Амплітуда часто вимірюється у децибелах і відповідає сприйняттю гучності.

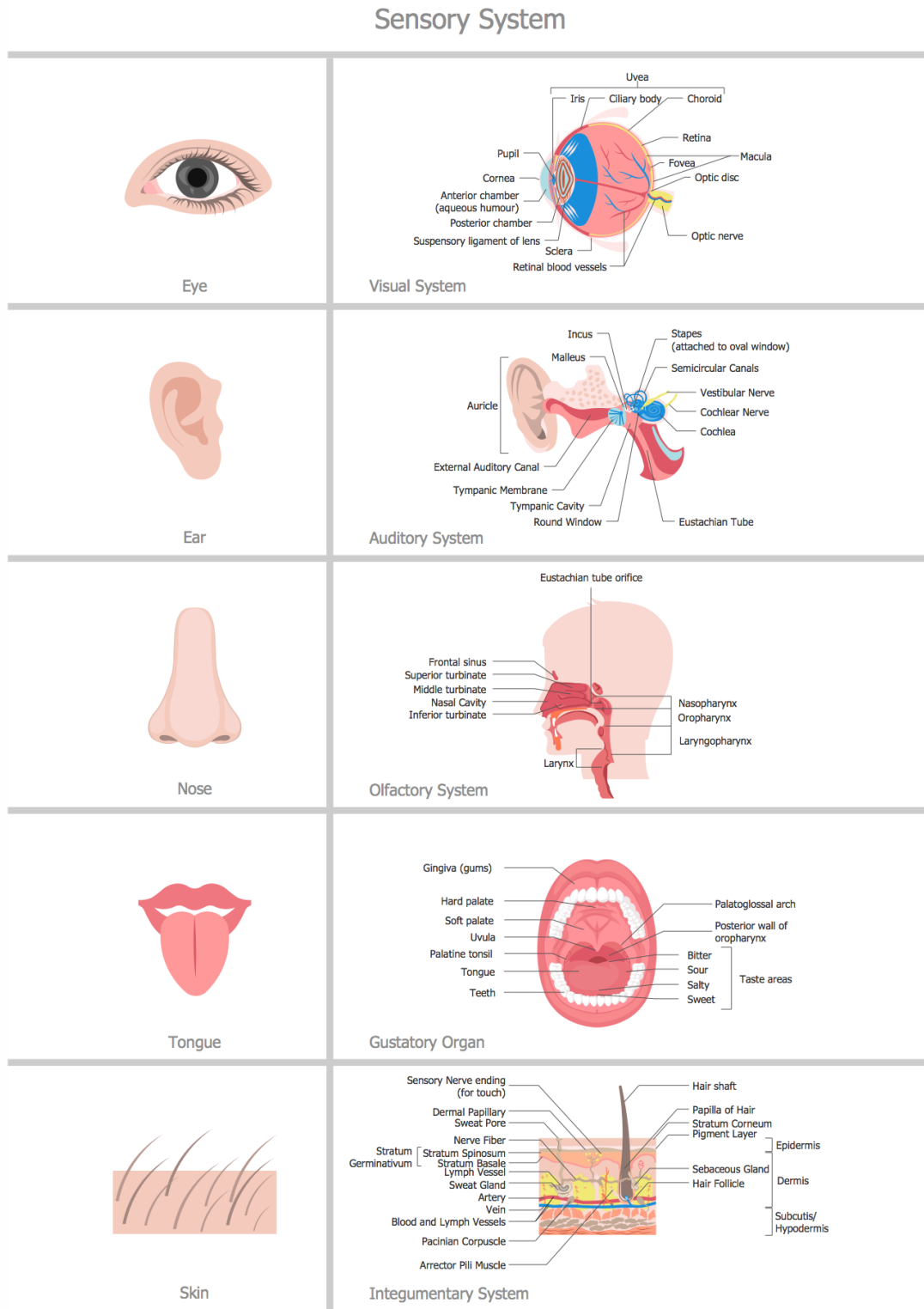


Рис. 1. Будова сенсорної системи людини
 (джерело: <https://www.conceptdraw.com/solution-park/health-human-anatomy>)

Звукові хвилі вражають барабанну перетинку, що викликає її вібрацію. Потім ця вібрація передається через середнє вухо до заповненої рідиною вушної раковини у внутрішньому вусі. У внутрішньому вусі вібрація підхоплюється сенсорними клітинами, які потім направляють її до мозку через слуховий нерв.

До чинників, що впливають на сприйняття звуку, належать: порушення слуху, глухота, глухота нерва та взаємодія з іншими органами чуття.

Звук – це важливий атрибут під час оцінювання якості, наприклад, таких продуктів, як шоколад.

Аромат і запах. Нюх дуже складний. Аромат – це хімічне відчуття, яке стимулюється хімічними властивостями молекул запаху. Для того, щоб людина відчувала аромат і смак, ці молекули мають дістатися до нюхової цибулини, щоб взаємодіяти з нюховими клітинами нюхової слизової оболонки. Запахи виявляються у повітрі, що вдихається, яке несе молекули запаху. Ось чому, щоб пахнути, молекули мають бути летучими. Повітря з летучими молекулами запаху контактує з крихітними рецепторами запаху високо в носовій порожнині. Ці рецептори посилають інформацію спочатку нервів запаху, а потім передають її мозку. Конкретна реакція з молекулою запаху досі залишається невідомою. Термін «запах» – це поєднання досвіду, що охоплює відчуття зору, запаху, температури, болю, тиску та текстури. За визначенням, запах заснований на судженнях людини.

Чинники, що впливають на чутливість до запаху, долучають взаємодію з іншими почуттями людини, такими як смак і зір. Колір іноді може викликати сприйняття запаху, коли його немає в реальності, а також посилення сприйняття або навіть спотворене сприйняття. Запахи піддаються адаптації. Інші чинники, що впливають на чутливість запаху, включають: стать, вік, куріння та нюхові розлади (гіпосмія, гіперсомнія, аносмія та дисомія).

Смак. Відчуття смаку – це хімічне відчуття. Його виявляють смакові клітини, розташовані на передній і задній частині язика і з боків в роті. Ці рецепторні клітини, або смакові рецептори, зв'язуються з молекулами їжі або напоїв, що вживаються, і передають сигнали мозку. Загально визнано, що люди могли розрізняти п'ять-шість основних смаків: солоний, солодкий, гіркий, кислий, умам і жирний. Чинники, що впливають на смакову чутливість, мстять: вік, куріння, в'язкість продуктів, розлади смаку (агезузія, гіпогеузія, гіпергеузія, дисгеузія) та температура.

Тактильні відчуття. Це відчуття на шкірі (зокрема язик). Шкіра людини є найбільшою сенсорною системою, яка містить численні рецептори. Ці рецептори мають вільні нервові закінчення, за допомогою яких люди відчують дотик, тиск, жар, холод і біль. Більшість відчуттів на шкірі – це поєднання відчуттів. Більше того, не всі частини шкіри однаково чутливі до тиску, дотику, температури тощо. Почуття дотику допомагає у прийнятті рішень і допомагає нам уникнути болю. Хоча цей орган чуття часто недооцінюється в сенсорній оцінці, тактильні

ознаки відіграють важливу роль в оцінці продуктів, які ми споживаємо. Наприклад, гарячий шоколад, крижаний лимонад тощо.

Текстура. Текстуру визначають як «суму загальної кінестетики (відчуття м'язів) та шкірних відчуттів, отриманих від мануального та орального маніпулювання». Вона охоплює почуття рота, жувальні властивості, залишкові властивості і навіть зорові та слухові властивості продуктів.

Фаза першого укусу або початкова фаза долучає оцінювання механічних характеристик твердості, руйнування та в'язкості. Крім того, оцінюються також початкові геометричні характеристики.

Друга, фаза жування, охоплює оцінювання механічних характеристик клейкості, жувальності та клейкості, а також геометричних характеристик, що спостерігаються під час жування.

Третя, залишкова фаза, долучає оцінювання змін, спричинених механічними та геометричними характеристиками під час жування. Відчуття їжі пов'язане з іншими відчуттями, які виникають одночасно під час «нормального» прийому їжі.

Всі органи чуття разом відіграють ключову роль у розвитку смаку продуктів, оскільки вони допомагають людям сприймати атрибути продуктів і напоїв: колір, аромат і запах, відчуття в руці чи роті, звук і, нарешті, смак.

7.3.Вимоги до лабораторій сенсорного аналізу. Національне та міжнародне визнання

Інформація, надана в цьому розділі, повністю відповідає ISO 8589: 2007 Сенсорний аналіз –загальні вказівки щодо проектування кабінетів для випробувань.

Цей Міжнародний стандарт надає загальні вказівки щодо дизайну приміщень для випробувань, призначених для сенсорного аналізу продуктів. У ньому описано вимоги до створення залу для випробувань, що містить тестовий майданчик, приміщення для підготовки та кабінет, із зазначенням тих, що є необхідними, або тих, які є просто бажаними.

Цей Міжнародний стандарт не специфічний для будь-якого продукту або типу випробування. Як продовольчі, так і непродовольчі продукти можуть бути оцінені в таких тестових приміщеннях. Однак адаптація випробувальних кабінетів може знадобитися для кожного спеціалізованого використання.

Більше того, хоча багато загальних принципів схожі, цей Міжнародний стандарт не стосується приміщень для випробувань для спеціалізованої оцінки харчових продуктів, які перевіряються або перебувають під контролем якості безпосередньо на підприємстві.

У різних країнах цей Стандарт перекладається національними мовами, а національне введення дається на початку. У деяких країнах Східної Європи все ще може бути ситуація, коли міжнародні стандарти не перекладені на

національні мови через брак часу та ресурсів. Однак у всіх областях діє інструкція – якщо існує Міжнародний стандарт ISO, керуйтеся ним, якщо немає національного стандарту.

7.3.1. Оформлення кімнат для випробувань

Звичайні кабінети для сенсорного аналізу продуктів складаються з:

- сектора для випробувань, де роботу можна виконувати як окремо у кабінках для випробувань, так і в групах;
- сектора підготовки зразків;
- кабінету;
- кімнати для переодягання та туалету;
- місця для зберігання запасів;
- місця для зберігання зразків;
- кімнати відпочинку для дегустаторів.

Мінімальні вимоги – це:

- сектор для випробувань, де роботу можна виконувати як окремо у кабінках для випробувань, так і в групах;
- сектор підготовки зразків.

Кімната для випробувань має бути доступною для дегустаторів і не має розташовуватися в районах з великим потоком людей, якщо не будуть вжиті заходи щодо зменшення шуму та відволікаючих чинників. Також необхідно вжити заходів для забезпечення доступу цього місця для людей з обмеженими можливостями.

Бажано, але необов'язково мати приміщення для дегустаторів, де вони могли б зібратися разом або відпочити перед тим, як увійти в робочу область. Ці приміщення мають бути облаштовані так, щоб їх можна було легко прибрати та підтримувати чистоту.

Отже, основними принципами, якими слід керуватися під час оформлення приміщень для сенсорного аналізу продуктів, є:

- сенсорну оцінкумають проводити у відомих та контрольованих умовах з мінімумом відволікаючих чинників;
- кабінет для випробувань має сприяти зменшенню впливу психологічних чинників та фізичних умов, властивих людині.

ISO 8589: 2007 Сенсорний аналіз – Загальне керівництво для проектування приміщень для випробувань містить 4 приклади конструкцій тестових приміщень.

7.3.1.1.Оформлення сектора для випробувань

Загальні вимоги

Місце розташування. Сектор випробувань мають розташовувати біля сектора підготовки зразків для легкого подання зразків. Однак вони мають бути окремими для запобігання різним типам перешкод (наприклад, шуму та запаху). Тестувальники не мають входити в тестовий сектор або залишати його через сектор підготовки зразків, оскільки це може призвести до відхилень у результатах тесту.

Температура та відносна вологість. Температуру та відносну вологість у секторі для дослідження необхідно контролювати. Рівень температури повітря та відносна вологість мають бути комфортними для дегустаторів, за умови, що випробування продукту не потребує незвичних умов.

Шум. Рівень шуму має бути мінімальним під час тесту, оскільки це також може відволікати дегустаторів. Бажано, щоб приміщення було звуконепроникним, а підлога мінімізувала шум, пов'язаний з ходьбою або переміщенням предметів.

Запахи. Сектор для випробувань не повинен мати запахів. Цього можна досягти, встановивши кондиціонер з фільтрами з активованим вугіллям, або створивши легкий позитивний тиск, щоб зменшити потік повітря з інших областей. Більше того, сектор для тестувань має бути обладнаний матеріалами, які легко мити та не накопичують запахів. Меблі, килими, стільці тощо не повинні мати запахів, які можуть впливати на оцінку. Мийні засоби, які використовують для очищення, не мають залишати запахів у тестовому секторі.

Інтер'єр. Кольори стін та меблів у тестовому секторі мають бути нейтральними, щоб не викликати зміни кольору зразків. Рекомендовані кольори – матові, а не чисто білі або нейтральні світло-сірі відтінки.

Освітлення. Джерело, тип та рівень освітлення мають велике значення в сенсорній оцінці. Слід звернути увагу на загальне освітлення всіх зон та, якщо можливо, на освітлення кожної кабінки. Освітлення тестового сектору має бути рівномірним, контрольованим та без тіней.

Оцінюючи колір виробів або матеріалів, спеціальне освітлення має велике значення. Більше того, спеціальні освітлювальні прилади для маскуванню кольорової чи візуальної різниці можуть знадобитися в деяких випадках, коли необхідно уникнути їх впливу на результати тесту. Пристрої, які можна використовувати, містять: реостат для регулювання інтенсивності світла; джерела кольорового світла; кольорові фільтри; чорний колір; монохроматичні джерела, такі як натрієві лампи.

Кабінки для випробувань

Загальні вимоги. Під час оцінювання за допомогою різних методів сенсорного аналізу дегустаторам пропонують зробити самостійні індивідуальні

висновки щодо продуктів, які аналізують. Щоб уникнути можливості впливу інших дегустаторів, а також з метою мінімізації впливу інших відволікаючих чинників, використовують окремі кабінки.

Установлення кабінок. Можна використовувати як постійні, так і тимчасові портативні кабінки. На сьогодні всі кабінки обладнано віконцями для подання зразків. Такі віконця мають забезпечувати вільний прохід зразків без особливих труднощів і зачинятися розсувними дверима або кришками. Вікна мають бути розроблені таким чином, щоб тестувальники не бачили підготовки зразків або кодування.

Розетки мають бути передбачені та зручно розміщені у кабінці для використання електрообладнання. Під час використання комп'ютерної техніки необхідно розташувати компоненти так, щоб не відволікати дегустаторів від сенсорної оцінки. Також корисно пронумерувати кабінки або якось позначити їх для легкої ідентифікації та розміщення дегустаторів.

Положення та розмір. Робоча площа кожної тестової кабінки має бути достатньо великою для того, щоб розмістити:

- зразки;
- інструменти;
- плювальницю;
- раковину;
- ополіскувач;
- бланки для відповідей та ручку або пристрій для внесення відповідей до комп'ютера.

У робочому просторі також має бути передбачено достатньо місця для заповнення бланків відповідей або для розміщення комп'ютерного обладнання для передачі реакцій тестувальників.

Робоча область має бути не менше 0,9 м завширшки і не менше 0,6 м завглибшки. Якщо потрібне додаткове обладнання, може знадобитися збільшити розмір кабінки. Більше того, робоча площа кабінок для тестування повинна мати відповідну висоту, щоб зручно перевіряти зразки.

Бічні перегородки між кабінками мають виходити за межі робочого столу, щоб частково захвати дегустаторів – 0,3 м вважається достатнім. Для забезпечення повної ізоляції дегустаторів перегородки можна розмістити від підлоги до стелі. Однак їх конструкція має забезпечувати належну вентиляцію та очищення. Також дозволено підвісні перегородки.

Якщо це передбачено місцевим законодавством, принаймні одна кабінка має бути спроектована такою шириною та висотою, щоб її можна було використовувати для роботи дегустатора з інвалідним візком.

Колір кабінок. Інтер'єр кабінки загального призначення має бути матово-сірого кольору з коефіцієнтом яскравості близько 15 %. Якщо необхідно порівнювати переважно світлі кольори та відтінки майже білого кольору, внутрішню частину кабінки можна пофарбувати, щоб забезпечити коефіцієнт

яскравості 30 % або більше, щоб зменшити контраст яскравості з тестовим кольором.

Вказівки щодо освітлення такі самі, як і для приміщень для випробувань.

Сектор для групової роботи

Загальні вимоги. Для обговорення між дегустаторами та оператором слід передбачити сектор групової роботи. Цей сектор можна використовувати під час початкових навчальних занять та в будь-який час, коли необхідне обговорення між дегустаторами.

Цей сектор має бути достатньо великим, щоб розмістити стіл із зручними кріслами для всіх дегустаторів, які одночасно виконують тести. Стіл повинен мати достатньо місця, щоб на його можна було поставити:

- лоток або інший пристрій, в якому мають бути форми відповідей та зразки для кожного дегустатора;
- додаткові матеріали, такі як еталонні зразки, якщо їх використовують, а також ручки, олівці або чашки;
- комп'ютер (за потреби).

Для передачі зразків корисно передбачити рухомий відділ у центрі столу. Також стіл може бути оснащений знімними панелями, які розділяють дегустаторів для індивідуальної роботи. Для запису моментів обговорення мають бути передбачені дошка та крейда / маркери або план.

Вказівки щодо освітлення такі самі, як і для приміщень для випробувань.

7.3.1.2. Оформлення сектора підготовки зразків

Загальні вимоги. Лабораторію (або кухню) для підготовки зразків мають розташовувати в безпосередній близькості від випробувального сектора, але, як уже було сказано, щоб дегустатори не проходили через неї до тестового сектора.

Сектор підготовки проб мають добре провітрювати, щоб видалити запахи кухні та зовнішні запахи. Матеріали, підібрані для підлоги, стін, стелі та меблів, мають легко оброблятися, не мати запаху і бути непроникними для запахів.

Обладнання

Обладнання сектора підготовки зразків залежить від асортименту продуктів, з якими працюватимуть.

Основними елементами є:

- робоча поверхня;
- мийка або інше обладнання, необхідне для миття зразків;
- обладнання, зокрема електричне, для зберігання, підготовки, контролю та подання зразків (наприклад, контейнери, посуд, різні пристрої тощо) у задовільному робочому стані, відкалібровані для тестування;
- мийні засоби;
- контейнер для сміття.

Ємності для приготування і зберігання зразків, а також посуд і ножі, що використовують для приготування зразків, мають бути виготовлені з матеріалів, які не надають продуктам сторонніх запахів або смаку і запобігають фальсифікації та забрудненню зразків.

7.3.1.3. Офіс

Загальні вимоги. Офіс – це робоча зона, де обробляють документацію, пов'язану з виконанням сенсорної оцінки. Потрібно, щоб офіс був відокремлений від тестового сектора, але примикав до нього.

Розмір. Слід забезпечити достатньо місця для планування тестів, розробки форм відповідей, сортування та декодування форм відповідей, статистичного аналізу даних, письмових звітів та, якщо необхідно, для зустрічей з клієнтами для обговорення тестів та результатів.

Обладнання. Залежно від специфіки завдання, яке потрібно виконати в офісі, він може бути обладнаний таким обладнанням: письмовим столом, шафою для зберігання, шафою для книг, стільцями, телефоном, калькулятором та комп'ютером для статистичного аналізу даних.

В офісі також можуть розміститися засоби фотокопіювання та зберігання документації.

ISO 8589: 2007 Сенсорний аналіз – Загальне керівництво для проектування приміщень для випробувань містить приклади конструкції тестового сектора, конструкції стендів, конструкції вікон кабінки та приклади розміщення різних кабінки.

7.3.2. Вибір панелей та навчання

Інформація, надана в цьому розділі, цілком відповідає ISO 8586: 2012 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки щодо відбору, навчання та моніторингу відібраних оцінювачів та експертних сенсорних оцінювачів.

Враховуючи, що панель сенсорного аналізу є справжнім «вимірювальним приладом», результати аналізу залежать від кожного її члена. Ось чому залучення осіб, які бажають брати участь у роботі панелі, потрібно проводити обережно і вважати справжнім інструментом, це стосується і часу, і грошей. Не кожна людина має здатність проводити сенсорне оцінювання. Більше того, навіть якщо людина продемонструвала здатність брати участь у сенсорному оцінюванні, подальші тренінги слід проводити для різних видів продуктів.

Сенсорну оцінку можуть проводити три типи оцінювачів:

1. Сенсорні оцінювачі – будь-які люди, які беруть участь у сенсорному тесті. Це можуть бути «наївні оцінювачі», які не мають відповідати жодним точним критеріям, або «ознайомлені оцінювачі», які вже брали участь у сенсорних тестах.

2. Вибрані оцінювачі вибираються за їх здатністю проводити сенсорний тест.

3. Експертні сенсорні оцінювачі – відібрані оцінювачі з продемонстрованою сенсорною чутливістю та навчанням і досвідом сенсорного тестування, які здатні робити послідовні та повторювані сенсорні оцінки різних продуктів.

Будь-яку людину перед участю у сенсорних тестах має бути оцінено за спеціальною процедурою. Перш за все, завжди потрібно проводити попередній відбір кандидатів на етапі набору, щоб усунути тих, хто не придатний для сенсорного аналізу. Однак остаточний відбір можна зробити лише після відбору та навчання. Методи відбору та навчання, які слід використовувати, залежать від завдань, які мають бути поставлені перед «відібраними оцінювачами» та «експертними сенсорними оцінювачами». Відповідно до ISO 8586: 2012 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки щодо відбору, навчання та моніторингу відібраних.

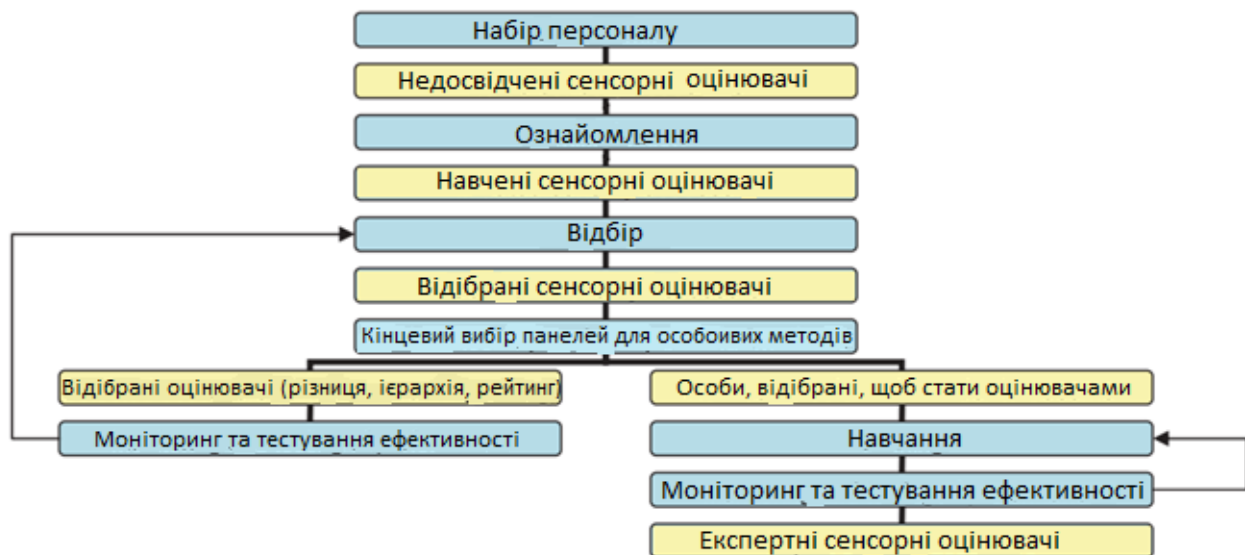


Рис. 2. Процес відбору, навчання та моніторингу відібраних оцінювачів та експертних сенсорних оцінювачів (дані ISO 8586: 2012 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки щодо відбору, навчання та моніторингу відібраних оцінювачів та експертних сенсорних оцінювачів)

Отже, рекомендована процедура передбачає:

- набір та попереднє оцінювання наївних оцінювачів;
- ознайомлення наївних оцінювачів, які мають стати ознайомленими оцінювачами;
- відбір ознайомлених оцінювачів з метою визначення їх здатності виконувати конкретні тести, вони потім стануть відібраними оцінювачами;
- можливе навчання відібраних оцінювачів, щоб вони стали експертними сенсорними оцінювачами.

Точні процедури набору та ознайомлення і характер тестів у подальших кроках залежать від завдань, призначених для роботи групи.

Сенсорні оцінювачі працюють як панель, якою керує її керівник. У певних випадках (особливо для описового сенсорного аналізу) панель може бути розділена на спеціалізовані підгрупи. У разі роботи групи експертних сенсорних оцінювачів керівник групи відповідає за загальний моніторинг групи та їх навчання. Експертні сенсорні оцінювачі не несуть відповідальності за вибір використаних тестів, представлення зразків або інтерпретацію результатів. Ці питання є відповідальністю керівника групи, який також вирішує, скільки інформації подається панелі. У разі роботи групи обраних оцінювачів, їх результативність слід регулярно контролювати, щоб гарантувати, що критерії, за якими їх було відібрано на початку, продовжують виконуватись.

7.3.2.1. Підбір оцінювачів

Загальні. Наступні загальні характеристики бажані для учасників навчання:

- вони мають бути мотивовані та зацікавлені в подальшому розвитку своїх сенсорних навичок;
- вони будуть готові брати участь у заходах.

Набір персоналу. Під час цього етапу необхідно відповісти на такі питання:

1. Звідки люди дізнаються про набір у групу?
2. Скільки людей буде обрано?
3. Як обиратимуть людей?

Існує 2 види набору:

- *внутрішній* – коли організації набирають персонал зі своїх підрозділів;
- *зовнішні* – коли організації набирають людей ззовні.

Більше того, може бути організовано змішану панель, що складається з внутрішніх та зовнішніх оцінювачів.

Існують переваги та недоліки обох видів добору персоналу. Для внутрішнього добору головна перевага полягає в тому, що люди доступні постійно, і не потрібно платити їм додаткові гроші за сенсорні тести. Однак на їх судження впливають знання про продукт. Ще одна перевага полягає в тому, що у випадку внутрішнього набору забезпечується краща конфіденційність, що важливо для науково-дослідної роботи. З іншого боку, замінити кандидатів важче, а вибір людей – менший. Більше того, організації можуть зіткнутися з недостатністю персоналу під час сенсорних тестів.

Серед переваг зовнішнього набору – більш широкий вибір, подальша пропозиція нових людей, набагато простіший вибір (без ризику образити людей, якщо вони непридатні), легка доступність.

З іншого боку, недоліками є:

- великі витрати;
- висока ефективність лише у міських громадах;

- оскільки необхідно, щоб люди були доступними, іноді виникає непропорційна кількість пенсіонерів, безробітних жінок чи студентів;

- після оплати за відбір та навчання завжди є ризик, що люди підуть.

Кількість обраних осіб. Досвід показує, що приблизно половина людей усувається під час процедур відбору через різні причини. Отже, кількість осіб, яких наймають, змінюється залежно від:

- фінансових засобів та набір в організації;
- видів та періодичності тестів, що проводять;
- чи потрібно інтерпретувати результати статистично чи ні?

Бажано, щоб у панелі було не менше 10 обраних оцінювачів. Отже, загальновизнано, що для одержання групи з такої кількості осіб слід набирати від 40 до 60 осіб та обирати, як мінімум, 20 осіб.

7.3.2.2. Довідкова інформація та попередній вибір

Довідкова інформація зазвичай отримується з анкет, заповнених кандидатами, а також шляхом опитування кандидатів особами, які мають досвід сенсорного аналізу.

Загальні критерії. Серед загальних критеріїв відбору кандидатів є такі:

1. *Доступність.* Кандидати повинні мати час пройти як навчання, так і оцінювання.

2. *Ставлення до продуктів харчування.* Кандидати не мають дуже не любити певні продукти та напої (особливо для сенсорної оцінки), а також культурні та будь-які інші заборони на споживання продуктів.

3. *Знання та схильність.* Початкові чуттєві сприйняття кандидатів мають бути інтерпретовані та виражені, вимагаючи певних фізичних та інтелектуальних здібностей, зокрема, здатності до концентрації уваги та здатності не бути під впливом зовнішніх чинників.

4. *Уміння спілкуватися та описувати.* Ця здатність є надзвичайно важливою для кандидатів, обраних для описового аналізу, оскільки передбачає необхідність опису їх відчуттів, сприйнятих під час оцінювання. Бажано, щоб кандидати мали достатню сенсорну пам'ять і вміли описувати словами характеристики продукту.

Здоров'я. Кандидати повинні мати міцне здоров'я. У них не має бути хронічних захворювань, які можуть впливати на органи чуття, а також алергії. Кандидати не повинні приймати ліки, які можуть послабити сенсорне сприйняття і, отже, зробити їх судження недостовірними. Також корисно з'ясувати, чи мають кандидати зубні протези, оскільки це може вплинути на деякі типи оцінювання щодо текстури та смаку виробів. Застуда або тимчасові стани (наприклад, вагітність) не мають бути причиною для відмови від кандидата.

Важливі психологічні критерії:

- інтерес та мотивація;

- усвідомлення відповідальності та вміння зосереджуватися;
- вміння приймати судження;
- бажання співпрацювати.

Інші чинники. Крім вищезазначеної інформації, під час набору кандидатів можна отримати також таку інформацію: ім'я, прізвище, вікова група, стать, національність, освіта, поточна робота та досвід проведення сенсорного аналізу. Також можна зазначити, курить чи ні кандидат. Однак куріння, як правило, не має бути причиною відмови від кандидата.

7.3.2.3. Скринінг

Тести, які можуть бути використані для відбору кандидатів, розділені на три групи:

- а) тести, спрямовані на виявлення недотримання основних вимог;
- б) тести, спрямовані на визначення розвитку органів чуття;
- в) тести, спрямовані на виявлення здатності кандидата описати та передати почуття.

Мета цих тестів – ознайомлення кандидатів із методами та матеріалами, які використовують під час сенсорного аналізу.

Кольоровий зір. Кандидати з аномаліями кольорового зору не підходять для проведення тестів, що містять оцінювання кольору. Випробування на кольоровий зір може бути проведений за допомогою ефективного тесту, такого як тест Ісіхара або тест зору Фарнсворт-Манселл 100 HueColor.

Втрата смаку і запаху. Доцільно перевірити чутливість кандидатів до речовин, які можуть міститись у невеликій кількості в продуктах, щоб виявити втрату смаку, запаху або можливу відсутність чутливості. Зразки речовин готують для дегустації за смаком і запахом з концентраціями, що значно перевищують порогові значення.

Приклади речовин, які можна використовувати:

- смаки: солодкий, кислий, гіркий, солоний, умамі, в'яжучий, металевий тощо;
- запахи: лимон, ваніль, чебрець, квітковий тощо.

Методика випробування, а також речовини та їх концентрація для приготування розчинів детально описані в INO 8586: 2012 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки щодо відбору, навчання та моніторингу відібраних оцінювачів та експертних сенсорних оцінювачів.

7.3.2.4. Навчання

Навчання необхідне для надання оцінювачам базових знань про процедури, що виконують під час сенсорного аналізу, та розвитку їх здатності до ідентифікації, розпізнавання та опису стимулів, а також для того, щоб оцінювачі

могли використовувати досвід таким чином, щоб вільно володіти цими методами для конкретних продуктів.

Кількість оцінювачів, які проходять навчання, має бути в 1,5–2 рази більше, ніж потрібно для остаточного формування панелі. Для забезпечення правильного підходу до сенсорного аналізу все навчання мають проводити за відповідних умов відповідно до рекомендацій, викладених у ISO 6658: 2017 Сенсорний аналіз – Методологія – Загальні вказівки.

Оцінювачам озвучують, що вони завжди мають бути об'єктивними та нехтувати своїми вподобаннями чи не вподобаннями. Більше того, вони не мають використовувати ароматизовану косметику до або під час тестів, і утримуватися від куріння або контакту з курцями або сильних смаків і запахів принаймні за 60 хвилин до тесту. В іншому випадку вони можуть принести зовнішні запахи в приміщення для випробувань, які можуть впливати на результати тесту.

Навчання сприйняттю кольору, смаку, запаху та текстури охоплює шість типів тестів.

1. Тести на визначення подразника. Ці випробування базуються на методі трикутника (див. Розділ 4). Під час одного сеансу досліджують лише одну речовину. Кожному кандидату надають два зразки досліджуваної речовини та один зразок води чи іншої нейтральної речовини / або один зразок досліджуваної речовини і два зразки води чи іншої нейтральної речовини. Концентрація досліджуваної речовини має бути вищою за пороговий рівень. Неможливість виявити відмінності після декількох повторних тестів свідчить про непридатність кандидата проводити тести такого типу.

2. Тести на визначення різного рівня інтенсивності подразника. Ці тести базуються на методах, що використовують шкали та категорії (див. Розділ 4). Тести проводять за допомогою подразників на смак, запах (лише в дуже малих концентраціях), дотику (у роті та руці) та кольорового зору. У кожному тесті кандидатам випадковим чином дають чотири зразки досліджуваної речовини різної концентрації, які кандидати мають розміщувати в порядку посилення інтенсивності стимулу. Випадковий порядок має бути однаковим для всіх кандидатів, щоб під час порівняння результатів було очевидно, що вони не залежать від порядку ознайомлення зі зразками. Задовільний результат у цьому тесті можна визначити лише на основі конкретних концентрацій.

3. Уміння описувати відчуття. Ці тести спрямовані на перевірку здатності кандидатів описувати свої відчуття. Рекомендується провести два тести: один, який базується на сприйнятті запахів, інший – на дотик.

4. Опис запаху. Кандидатам дають від 5 до 10 зразків різних нюхових подразників, переважно пов'язаних з продуктами, які будуть проаналізовані далі. Набір має складатися з декількох легко впізнаваних зразків, а решта має бути менш впізнаваною. Інтенсивність має значно перевищувати поріг

сприйняття, але не надто перевищувати концентрацію в тих продуктах, які будуть додатково проаналізовані. Задовільний результат у цьому тесті можна визначити лише на основі конкретних речовин.

5. Тест на опис текстури. Кандидати отримують набори зразків у визначеному порядку та мають описувати їх текстуру. Зразки твердих продуктів мають бути представлені у вигляді блоків однакового розміру, а рідкі речовини – у непрозорій тарі. Задовільний результат у цьому тесті можна визначити лише на основі використаних речовин.

6. Розпізнавання відмінностей у текстурі. Використовуваний метод: рейтинговий тест (див. Розділ 4). Задовільний результат у цьому тесті – принаймні 80 % зразків розташовані правильно.

Підготовка до виявлення та розпізнавання смаків та запахів. На цьому етапі використовують тест на виявлення ідентичних речовин, тест на парне порівняння, тест на трикутник та *duo-trio методи* відповідно до ISO 6658: 2017 Сенсорний аналіз – Методологія – Загальні вказівки. Крім того, ідентифікаційні тести використовують для розвитку чутливості оцінювачів до запахів. Спочатку стимул надається у вигляді водних розчинів відповідних речовин, але, коли оцінювачі набувають досвіду, вони можуть приступити до тестування справжніх продуктів і напоїв. Спотворення зовнішнього вигляду зразка (наприклад, за допомогою кольорового освітлення) є особливо корисним для того, щоб підкреслити необхідність бути об'єктивними за спроби виявити відмінності в інших характеристиках.

Підготовка до використання шкал. На цьому етапі оцінювачів знайомлять з оціночною, класифікаційною, інтервальною та шкалою співвідношення, залежно від того, яку шкалу використовуватимуть. Для визначення відповідних значень під час тестування зразків використовують різні процедури оцінювання. Найчастіше спочатку тестують водні розчини, потім справжні продукти харчування та напої зі змішаними подразниками, які можуть змінюватися незалежно один від одного.

Учасники тренінгу мають знати, як складаються описи (профілі). Для цього їм потрібно запропонувати зразки простих продуктів і попросити скласти список слів для опису характеристик цих продуктів таким чином, що дозволить диференціювати зразки. Визначення розробляють індивідуально, тоді після обговорення розробляють загальний перелік визначень щонайменше з 10 найменувань. Цей список використовують далі для складання описів продуктів, спочатку вибираючи терміни, відповідні кожному зразку, а потім оцінюючи їх інтенсивність, використовуючи різні шкали, згадані вище.

Вся теоретична підготовка, описана вище, чергується з практичними завданнями, щоб оцінювачі могли розширити свій досвід. Після базової підготовки оцінювачі можуть бути навчені оцінювати реальний продукт.

Формування панелей проводять для певних типів тестів з кандидатів, які демонструють успіх у відповідних тестах. Кандидати, які мають право на один

тип тесту, не мають бути придатними для іншого, а кандидати, виключені з кількості оцінювачів в одному тесті, не мають автоматично бути виключені з проведення інших.

Навчання експертів, які вже мають знання про фізіологію смаку і запаху, спрямоване на вдосконалення сенсорних знань і, особливо, запам'ятовування дескрипторів сенсорного профілю та їх значень інтенсивності, а також набуття навичок створення якісних профілів сенсорних продуктів (повторюваність, надійність, відмінні особливості).

Тренування зазвичай охоплює:

- розвиток сенсорної пам'яті;
- семантичне та мотивоване вивчення сенсорних дескрипторів;
- розробка словників дескриптора;
- навчання в умовах сертифікації.

Усі методології зазначених випробувань детально описано в ISO 8586: 2012 Сенсорний аналіз – Загальні вказівки щодо відбору, навчання та моніторингу відібраних оцінювачів та експертних сенсорних оцінювачів.

7.3.3. Процедури обслуговування

Загальна інформація про матеріал, який підлягає випробуванню, пристрій для його вибору та відбір проб представлений в ISO 6658: 2017 Сенсорний аналіз – Методологія – Загальні вказівки. Більше того, кожен ISO з методології сенсорного аналізу містить короткі інструкції щодо цієї теми.

Згідно з прийнятими правилами, відбір проб для тестування мають проводити відповідно до стандартів сенсорного аналізу продукту або продуктів, які підлягають випробуванню. За відсутності таких стандартів слід керуватися правилами вибірки цього товару або домовлятися між зацікавленими сторонами.

Методи підготовки та подання зразків мають відповідати конкретному виду продукту та конкретній меті його випробування. Куштувати продукти потрібно в тих самих умовах, в яких їх зазвичай вживають, за винятком випадків, коли дегустатори просять зосередитися на деяких особливих випадках. Наприклад, продукт, який зазвичай вживають у гарячому вигляді, слід готувати звичайним способом і випробовувати гарячим, а продукт, який зазвичай споживають шматками, не має бути однорідним (гомогенізованим), оскільки необхідно зберегти притаманні йому властивості текстури. Однак необхідно забезпечити, щоб частини зразків, оцінені кожним дегустатором, були максимально однаковими.

Дегустатори не мають робити висновків щодо природи зразків, ґрунтуючись на тому, як їх забезпечують цими зразками. Зразки мають готувати однаково (однакові контейнери, однакові кількості продукту, однаковий

зовнішній вигляд, однакові температурні умови тощо). Температуру зразків слід контролювати і підтримувати постійною.

Оцінюючи зовнішній вигляд зразків, необхідно створити певні умови освітлення. Коли лише визначають різницю в запаху та смаку, зовнішній вигляд кольору можна частково згладити, створивши умови освітлення, завдяки чому кольорові відмінності зводять до мінімуму.

Тара, де розміщено продукт, не має впливати на його характеристики або продуктивність наступного випробування. Це можуть бути керамічні або скляні ємності, які легко чистити і промивати, а також одноразові пластикові або паперові контейнери. Вони не мають містити хімічних речовин, що викликають утворення кольорових плям. Зокрема, контейнери слід мити лише мийними засобами, без запаху та безбарвного кольору, і промивати водою. Полімерні та паперові ємності, включаючи термоізоляцію (для гарячих чи охолоджених зразків), не повинні мати запаху і повинні бути безбарвними. Прилади має вибирати керівник панелі відповідно до характеру продукту, який підлягає аналізу, кількості проб тощо, і жодним чином не мають впливати на результати випробувань.

Під час проведення сліпої дегустації із зразків слід вилучати виробничу тару, етикетки, тобто всю інформацію про виробника. Контейнери, що містять перевірені зразки, мають бути кодовані, використовуючи трицифрові числа, вибрані навмання. Кодування має бути різним для кожного тесту. Значення коду мають бути відомі лише організатору тесту, який не бере участі у роботі як дегустатор.

Зразки одного виду продукту збирають у серії. Порядок випробування продуктів в одній серії встановлюють відповідно до ступеня збільшення інтенсивності запаху або кількості приправ, або через збільшення масової частки складових елементів, таких як жир, сіль, цукор, етиловий спирт тощо. Перш за все, продукти зі слабким запахом, потім – помірним, далі – сильно вираженим. Цієї самої процедури потрібно дотримуватися і під час оцінювання смаку: спочатку перевіряють менш солоні та гострі зразки.

Під час сенсорного аналізу важливим чинником є кількість проб, оцінених на панелі за один сеанс. Краще проаналізувати невелику кількість зразків залежно від виду продукції.

Також слід обговорити проблему притуплення смаку, переваги полоскання рота та стандартні інтервали між тестуванням різних проб. Тестування різних зразків має забезпечувати відновлення гостроти сприйняття, але не має бути занадто довгим, щоб тестувальники не втрачали здатності порівнювати та розрізняти проби.

Дегустаторам дозволено використовувати засоби для нейтралізації запаху та смаку в роті між тестуванням зразків або періодами випробувань. Однак необхідно забезпечити, щоб ці продукти не впливали на смак і запах

оцінюваного продукту. Між періодами випробувань допускають газовану або негазовану воду, а також свіжі продукти (наприклад, несолоне печиво).

Залежно від властивостей продукту, після оцінювання п'яти-восьми зразків робиться перерва мінімум на 15 хвилин для відновлення сенсорних здібностей.

7.4. Основні сенсорні випробування

За сенсорного оцінювання органолептичних характеристик харчових продуктів застосовують різні методики залежно від мети тестів та інформації, яку вони бажають отримати.

Насамперед можна відрізнити лабораторні тести (або аналітичні тести) від аналогічних для споживачів. Першу групу можна додатково підрозділити на три категорії, як показано на рис. 1. За допомогою якісних дискримінантних тестів можна оцінити наявність чи відсутності відмінностей між двома продуктами, за допомогою якісно-кількісних дискримінаційних тестів для отримання інформації, що стосується існуючої різниці між декількома зразками або категорією, до якої належить вибірка. За допомогою описових тестів можна виявити та кількісно оцінити сенсорні ознаки (дескриптори), які найкраще характеризують їжу. Відмінність між трьома групами виявляє своє обґрунтування, а також в типі інформації, яку можна отримати, а також у різній складності кожного тесту, а отже, і в різному ступені підготовки та чисельності панелі.

Лабораторне дослідження		
Якісні дискримінантні випробування	Якісно-кількісні дискримінантні дослідження	Описові дослідження
1. Тест на відмінності в парі 2. Метод трикутника 3. Duo-trio тест	1. Класифікаційне випробування 2. Тест кваліфікації діапазону 3. Тест множин (тест множник Лагранжа)	1. Квадратний дискримінантний аналіз 2. Профіль смаку 3. Текстурний профіль
Споживчі тести		
1. Тест на прийнятність 2. Тест на перевагу 3. Гедоністичний тест		

Рис. 1. Класифікація основних сенсорних тестів

7.4.1. Якісні дискримінаційні тести

Ряд опитувань, проведених у США та Англії, показав, що якісні дискримінаційні тести є найбільш широко використовуваним сенсорним методом у харчовій сфері. Широке використання цих методів пояснюється простотою експериментальної процедури, швидкістю проведення тестів та простотою інтерпретації результатів. Якісні дискримінантні тести

використовують з певною метою, а саме для того, щоб оцінити, чи можна визначити, що два зразки відрізняються із заздалегідь визначеними рівнями статистичної ймовірності.

Питання, які насправді ставлять дегустаторам:

- 1) Який зразок відрізняється?
- 2) Який найкращий зразок?
- 3) Який улюблений зразок?

Продукти, що підлягають оцінюванню за допомогою цих методів, мають відрізнятися лише першою ознакою, що розглядається. Якщо, наприклад, два зразки мають бути оцінені за консистенцією, вони повинні мати однаковий вигляд, однакову форму, той самий колір тощо, і вони мають бути представлені в одній кількості.

Якісні дискримінаційні тести використовують як у фазі відбору та навчання панелі, так і в оцінюванні продуктів.

Існує три основні якісні дискримінаційні методи:

- 1) Тест на відмінності в парі.
- 2) Метод трикутника.
- 3) Duo-trio тест.

7.4.1.1. Тест на відмінності в парі

Підготовка та виконання тесту

Метою тесту порівняння в парах є оцінювання наявності чи відсутності відмінностей між двома зразками та / або встановлення переваги на основі глобальної оцінки або відповідно до сенсорної ознаки. Цей тест також використовують для відбору та навчання дегустаторів.

На практиці готують однакову кількість зразків двох продуктів (продукт А та продукт В) для порівняння. Кожен зразок ідентифікують кодом. Кодування може бути різним для двох продуктів (наприклад, продукт А: 376 та продукт В: 914) і однаковим для всіх дегустаторів, або, що краще, різними для двох продуктів та для дегустаторів. У цьому випадку для підготовки зразків незамінним є використання картки типу, показаної на рис. 2, на якій потім будуть записані відповіді дегустаторів, на картці зазначено, крім прогресивної ідентифікації, номер дегустатора, порядок подачі двох зразків. Насправді важливо забезпечити, щоб половина панелі оцінювала зразок А, а друга половина спочатку оцінювала зразок В. У разі повторення тесту порядок має бути скасовано, щоб кожен дегустатор оцінив обидва зразки А і В.

Тест на відмінності в парі					
Продукт:		Дата:Та			
Зразок А:					
Зразок В:					
Дегустатор	Порядок	Коди	Правильна відповідь	Надана відповідь	Точна відповідь
1	А В/.....
2	В А/.....
3	А В/.....
4	В А/.....
5	А В/.....
6	В А/.....
7	В А/.....
8	В А/.....
9	В А/.....
10	В А/.....
11	А В/.....
12	В А/.....
13	А В/.....
14	В А/.....
15	А В/.....
16	В А/.....
17	А В/.....
18	В А/.....
19	А В/.....
20	В А/.....
21	А В/.....
22	В А/.....
23	А В/.....
24	В А/.....
Кількість точних відповідей:					
Результат:					

Рис. 2. Загальна карта тесту відмінності в парі

Для спрощення підготовки зразків та уникнення можливих помилок доцільно, перш за все, кодувати контейнери, в яких будуть представлені зразки. Вибір послідовності трьох цифр, що складають код, може відбуватися через таблицю випадкових чисел, починаючи з випадкової позиції, а потім проходячи у певному напрямку (ліворуч, праворуч, вгору чи донизу) та складаючи тризначні числа (табл. 5). Потім закодовані контейнери ділять на дві рівні групи: перша група отримує зразок А, друга зразок В. Зашифровані зразки розподіляють дегустаторам таким чином: зразки А спочатку розподіляють, а потім зразки В даються за порядком дегустації, вказаним для кожного дегустатора в загальній вкладці тесту (рис. 2). При цьому коди, присвоєні кожному зразку для різних дегустаторів, записують у третю колонку. У цій самій вкладці подано три інші стовпці, перший для вказівки правильної відповіді, другий для вказівки наданої відповіді і третій для виявлення дегустаторів, які надали правильну відповідь.

Таблиця випадкових чисел				
2217686584	6895239235	8702225751	6109439606	5824820347
1936275946	1379933755	3977327709	8552053062	4783516274
1677230277	0961872521	2806242593	1671135978	2305474725
7843767161	2044903264	9767639961	4638039322	6981219021
0328282608	7337320405	6930160905	8869582899	3507447547
9322536439	0710637635	8703047988	0813138551	5534577269
7876585474	9238709692	5206797945	8263182744	6966921909
2368352600	9953936128	5270054834	5665056186	9092107080
1539257099	9386527765	1533590528	2287260747	8696982906
5871963024	1846233427	8513992444	4918097949	7416322302
5735273372	2453639409	4110764791	4404954966	3960045981
4850865448	2206347252	8221156520	3329947111	1591291203
6196489503	0716393366	9856105679	7721302712	9049222362
3693894126	2970836351	9974205236	8709411509	9860160303
1887004231	5790120207	2347371731	5408018863	3941889210
8856532759	3335726747	7734554570	0818273890	1695867075
0972958429	4941310670	4238064518	6484733165	5253379715
1296881731	6519690283	6075869068	2464193551	5661873912
8594572416	9209843876	2200276985	2981947870	2194479012
3864435998	9877876807	9151676244	4098059378	2332654118
5344094272	0041867979	6847220020	3555315151	0083632255
4076662684	5799999037	3663320858	3740136897	8764810783
0217791805	1259525702	2207904703	2814113079	2069224098
9517820653	3151109646	9206880777	5611508169	4023725139
3576224292	9611834480	3468354877	3342409060	7396539786
2629135641	8547046608	3472575913	8243804615	3826617004
7780207582	7282329990	6395737663	8973449905	4867264318
4640664452	9136744353	3082135400	7845639835	5503366768
3756081809	7753844647	3191189558	2416741153	4410138557
6165616866	3727473919	8483700748	5321400671	9506798854
9343696407	3418045235	5627092486	6185538345	1990709900
2196601299	1120994518	4813935534	1837794990	6597382046
9520479797	2737832871	0006414174	4589093984	5157115249
9786217873	1065819259	5876171497	0476621617	1795704580
6992063413	5971741732	2755102419	2371821374	6352520141
0431172156	3373991987	2672392767	5377576893	6061972261
6106980391	8714774396	4300659850	4560330107	9899465047
8593858688	7287086240	1606108920	2321347497	7638032963
2174324745	7396079452	0965907747	2576161933	5305705330
1569538280	7996235310	6539071629	4533024370	0287404145
0289080449	2021146886	8763939517	1129019580	3514973533
8718158979	8543017273	0861745169	8974398215	9451334167
9883719422	5997509952	6852850840	8780616531	9151803244
1008582166	7268492931	8985844606	5973198523	6509297563
4790561008	8802842783	4229722319	6656456579	2071532025
2285616890	4964928544	1640128988	5014498106	0182774512
6780437933	1283114116	2558196870	7702540052	5343371526
2762509672	7944614015	1453406539	2731585028	1139033425
3378808715	3830063821	1447470726	5496875332	4036409676
1313926699	4724495774	3225436117	1097116984	9963223298

Кожному дегустатору подають разом з двома оцінюваними зразками картку з інструкціями щодо проведення тесту, на якій записують відповіді, та картки, на яких показано приклади тестування (рис. 3).

Тест на відмінності в парі	
Продукт: сухе печиво	Дата: 3 травня 1990 р.
Ім'я: Маріо Россі	Ідентифікаційний номер: 1
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">Представлено 2 зразки, позначені такими кодами:</div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin: 10px 0;"> 319 118 </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">Скуштуйте 2 зразки і вкажіть, який зразок солодший. Ретельно промийте рот між зразками.</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Я визначив, що зразок найсолодший.</div>	

Рис. 3. Картка для виконання тесту

Керівнику панелі корисно усно вказати способи виконання тесту, наприклад:

- оцініть спочатку зовнішній вигляд зразка, потім понюхайте його і, нарешті, покуштуйте;
- виплюнути або проковтнути зразок після дегустації та ретельно промити рот. За необхідності жуйте невеликий шматочок сухаря чи яблука чи чогось іншого, щоб усунути відчуття, які залишені першим зразком, знову прополощіть рот і, лише усунувши смак попереднього зразка, скуштуйте другий зразок;
- скуштуйте обидва зразки один раз або обмежену кількість разів, укажіть на картці відповідь, уникаючи повторної проби зразків: ця процедура спричиняє, особливо за деяких зразків, швидку втому відчуттів і, отже, меншу здатність до дискримінації;
- все одно надайте відповідь, навіть якщо вам не вдається виявити різницю або висловити перевагу;
- не соромтесь написати коментарі на картці.

Важливо також не повідомляти членам панелі про проблему, через яку необхідно було проводити дегустацію, або повідомляти їх таким чином, щоб ця інформація не вплинула на їхню відповідь.

Наприкінці сесії є добрим правилом інформувати дегустаторів про причину, через яку було проведено тестування, про характер відмінностей між

зразками, а також про вагомість чи не важливість їхньої відповіді; це робиться з метою мотивувати їх до роботи. Якщо знання цієї інформації певним чином може вплинути на відповіді до тестів, які будуть проведені пізніше, потрібно не представляти результати, а запевнити дегустаторів, що їх проінформують про результати якнайшвидше.

Обробка результатів

Після збору бланків відповіді кожного дегустатора відображають у загальній таблиці (рис. 2). У випадку оцінювання відмінностей між зразками або кількості дегустаторів, які вказали зразок А або зразок В, у разі оцінювання переваг або виявлення зразка, який має певну ознаку з більшою чи меншою інтенсивністю, обчислюється кількість людей, які надали правильну відповідь.

Таблиця 2

Значення тесту на відмінності в парі ($p = 1/2$) (односторонній тест)

Кількість відповідей	Мінімальна кількість правильних відповідей для встановлення суттєвої різниці			Кількість відповідей	Мінімальна кількість правильних відповідей для встановлення суттєвої різниці		
	$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)		$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)
7	7	7	—	53	33	36	39
8	7	8	—	54	34	36	39
9	8	9	—	55	35	37	40
10	9	10	10	56	35	38	40
11	9	10	11	57	36	38	41
12	10	11	12	58	36	39	42
13	10	12	13	59	37	39	42
14	11	12	13	60	37	40	43
15	12	13	14	61	38	41	43
16	12	14	15	62	38	41	44
17	13	14	16	63	39	42	45
18	13	15	16	64	40	42	45
19	14	15	17	65	40	43	46
20	15	16	18	66	41	43	46
21	15	17	18	67	41	44	47
22	16	17	19	68	42	45	48
23	16	18	20	69	42	45	48
24	17	19	20	70	43	46	49
25	18	19	21	71	43	46	49
26	18	20	22	72	44	47	50
27	19	20	22	73	45	47	51
28	19	21	23	74	45	48	51
29	20	22	24	75	46	49	52
30	20	22	24	76	46	49	52
31	21	23	25	77	47	50	53
32	22	24	26	78	47	50	54
33	22	24	26	79	48	51	54
34	23	25	27	80	48	51	55
35	23	25	27	81	49	52	55
36	24	26	28	82	49	52	56
37	24	27	29	83	50	53	56
38	25	27	29	84	51	54	57
39	26	28	30	85	51	54	58
40	26	28	31	86	52	55	58
41	27	29	31	87	52	55	59
42	27	29	32	88	53	56	59
43	28	30	32	89	53	56	60
44	28	31	33	90	54	57	61
45	29	31	34	91	54	58	61
46	30	32	34	92	55	58	62
47	30	32	35	93	55	59	62
48	31	33	36	94	56	59	63
49	31	34	36	95	57	60	63
50	32	34	37	96	57	60	64
51	32	35	37	97	58	61	65
52	33	35	38	98	58	61	65

Таблиця 2 дозволяє оцінити, чи було виокремлено відмінності між двома зразками випадковим чином чи їх, навпаки, можна вважати істотними. У таблиці, яку відносять лише до односторонніх тестів, показано три чіткі колонки для трьох різних рівнів значущості.

Рівень похибки 5 % ($\alpha = 0,05$) означає, що два порівняні зразки були правильно ідентифіковані як результат випадку один раз із двадцяти (існує 5 % ймовірність відмови без будь-якого статистичного обґрунтування нульової гіпотези, яка зазначає рівність між двома зразками). Ця концепція виражається тим, що людина впевнена з 95 % вірогідністю ($P = 95\%$), що обидва зразки є різними. У випадку похибки 1 % існує ймовірність отримання 1 % правильної відповіді виключно завдяки випадку.

Використання таблиць дуже просте. Виходячи з кількості відповідей або кількості суджень (кількість дегустаторів, помножених на кількість відповідей), мінімальна кількість точних (або відповідних) відповідей повідомляється для встановлення статистично значущої різниці (або переваг) між двома зразками. Якщо кількість правильних чи узгоджених відповідей, отриманих у тесті, дорівнює або перевищує табличне значення, справедливо констатувати, або існують суттєві відмінності між двома продуктами, або те, що один із двох продуктів має характеристику зі статистично більшою (або нижчою) інтенсивністю для певного рівня значущості (відкидаючи таким чином нульову гіпотезу).

7.4.1.2. Метод трикутника

Підготовка випробування та його проведення

Метод трикутника – це найбільш широко застосовуваний дискримінаційний якісний метод як під час відбору та навчання дегустаторів, так і для оцінювання харчових продуктів. Для проведення цього тесту кожному члену панелі подають три зразки з різним кодуванням, два однакових та один такий, що відрізняється. Дегустатор повинен буде визначити відмінний зразок. Для підготовки зразків, які підлягають випробуванню, можна буде використовувати карту такого типу, як показано на рис. 4, аналогічно тим, що використовують для тесту порівняння в парах.

На додаток до ідентифікаційного номера дегустатора картка показує порядок, в якому три зразки будуть подані кожному члену панелі. Насправді важливо, щоб дегустатори оцінювали три зразки з різним порядком, а половина панелі отримувала зразок А як єдиний зразок, а інша половина – зразок В як єдиний. Якщо тест потрібно повторити з тими самими дегустаторами, доцільно буде змінити порядок, у якому зразки представлені у другому тесті. Цей порядок походить, як зазначено на аркуші, із послідовності випадкових комбінацій. Вибір кодів для кожного зразка можна зробити на основі таблиці випадкових чисел, як повідомлялося раніше.

Метод трикутника						
Продукт:				Дата:		
Зразок А:						
Зразок В:						
Дегустатор	Порядок проби	Коди	Правильна відповідь	Надана відповідь	Точна відповідь	
1	А А В	----/----/----	
2	В А А	----/----/----	
3	А В А	----/----/----	
4	В В А	----/----/----	
5	А В В	----/----/----	
6	В А В	----/----/----	
7	А А В	----/----/----	
8	В А В	----/----/----	
9	А В А	----/----/----	
10	В В А	----/----/----	
11	В А А	----/----/----	
12	А В А	----/----/----	
13	А В В	----/----/----	
14	А А В	----/----/----	
15	А В В	----/----/----	
16	В В А	----/----/----	
17	В А А	----/----/----	
18	А В А	----/----/----	
19	А В В	----/----/----	
20	В В А	----/----/----	
Кількість точних відповідей:						
Результат:						

Рис. 4. Загальна картка методу трикутника

Для того, щоб уникнути помилок під час розподілу двох продуктів (зразок А та зразок В) у раніше кодованих контейнерах, необхідно наповнювати їх окремо, сформувавши дегустаційні тріади та повідомити у третьому стовпці загального тестового аркуша зразки кодів, що надаються кожному дегустатору. На розгляд комісії будуть винесені три зразки із формою, яка показана на рис. 3, але з 3 кодами, а також там буде таке речення: «2 зразки однакові, а один відрізняється; вкажіть, який із них відрізняється».

Також у цьому випадку корисно усно вказати методи виконання тесту, аналогічно тому, що повідомлялося для тесту порівняння в парах, на які робиться посилання для отримання більш детальної інформації.

Обробка результатів

Після збору карток відповіді кожного дегустатора відображають у загальній таблиці (п'ята колонка), порівнюючи правильні відповіді з наданими, оцінюється кількість правильних відповідей дегустаторів загалом. Ця кількість

порівнюється зі значенням, повідомленим у табл. 3 щодо кількості дегустаторів, які провели тест, або кількості суджень (кількість дегустаторів на кількість відповідей) для різних рівнів значущості. Якщо загальна кількість правильних відповідей дорівнює або перевищує значення, показане в таблиці, можна констатувати, що два досліджувані продукти статистично відрізняються. Таблиця 3 відрізняється від тієї, що стосується тесту порівняння в парах, оскільки за методу трикутника вірогідність отримання правильної відповіді навмання становить 33,3 % ($p = 1/3$).

Таблиця 3

Значення методу трикутника ($p = 1/3$)

Кількість відповідей	Мінімальна кількість правильних відповідей для встановлення суттєвої різниці			Кількість відповідей	Мінімальна кількість правильних відповідей для встановлення суттєвої різниці		
	$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)		$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)
5	4	5	—	53	24	27	29
6	5	6	—	54	25	27	30
7	5	6	7	55	25	27	30
8	6	7	8	56	25	28	31
9	6	7	8	57	26	28	31
10	7	8	9	58	26	29	31
11	7	8	9	59	27	29	32
12	8	9	10	60	27	29	32
13	8	9	11	61	27	30	33
14	9	10	11	62	28	30	33
15	9	10	12	63	28	31	34
16	9	11	12	64	29	31	34
17	10	11	13	65	29	32	34
18	10	12	13	66	29	32	35
19	11	12	14	67	30	32	35
20	11	13	14	68	30	33	36
21	12	13	15	69	30	33	36
22	12	13	15	70	31	34	37
23	12	14	16	71	31	34	37
24	13	14	16	72	32	34	37
25	13	15	17	73	32	35	38
26	14	15	17	74	32	35	38
27	14	16	18	75	33	35	39
28	14	16	18	76	33	36	39
29	15	17	19	77	33	36	39
30	15	17	19	78	34	37	40
31	16	17	19	79	34	37	40
32	16	18	20	80	35	37	40
33	16	18	20	81	35	38	41
34	17	19	21	82	35	38	42
35	17	19	21	83	36	39	42
36	18	20	22	84	36	39	42
37	18	20	22	85	36	39	43
38	18	20	23	86	37	40	43
39	19	21	23	87	37	40	44
40	19	21	24	88	38	41	44
41	20	22	24	89	38	41	44
42	20	22	24	90	38	41	45
43	20	23	25	91	39	42	45
44	21	23	25	92	39	42	46
45	21	23	26	93	39	43	46
46	22	24	26	94	40	43	46
47	22	24	27	95	40	43	47
48	22	25	27	96	41	44	47
49	23	25	28	97	41	44	47
50	23	25	28	98	41	45	48
51	24	26	28	99	42	45	48
52	24	26	29	100	42	45	49

Розширення методу трикутника

Часто недостатньо встановити наявність чи відсутність різниці між двома зразками, але необхідно, за допомогою одного і того самого тесту отримати

інформацію, що стосується сутності різниці, або думки дегустаторів стосовно переваги того чи іншого зразка. У цьому випадку слід відповісти на питання, пов'язані з ідентифікацією зразка, крім низки інших питань. Для статистичного опрацювання другої частини тесту враховують лише відповіді дегустаторів, які правильно визначили зразок, який відрізняється. Також у цьому випадку ми порівнюємо кількість відповідей, які вказують, що цьому зразку вони надають перевагу, або в нього є певна характеристика з більшою (або меншою) інтенсивністю.

Таблиця 4

**Значення тесту на відмінності в парі ($p = 1/2$)
(двосторонній / білатеральний тест)**

Кількість відповідей	Мінімальна кількість правильних відповідей для встановлення суттєвої різниці			Кількість відповід ей	Мінімальна кількість правильних відповідей для встановлення суттєвої різниці		
	$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)		$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)
7	7	—	—	53	35	37	39
8	8	8	—	54	35	37	40
9	8	9	—	55	36	38	41
10	9	10	—	56	36	39	41
11	10	11	11	57	37	39	42
12	10	11	12	58	37	40	42
13	11	12	13	59	38	40	43
14	12	13	14	60	39	41	44
15	12	13	14	61	39	41	44
16	13	14	15	62	40	42	45
17	13	15	16	63	40	43	45
18	14	15	17	64	41	43	46
19	15	16	17	65	41	44	47
20	15	17	18	66	42	44	47
21	16	17	19	67	42	45	48
22	17	18	19	68	43	46	48
23	17	19	20	69	44	46	49
24	18	19	21	70	44	47	50
25	18	20	21	71	45	47	50
26	19	20	22	72	45	48	51
27	20	21	23	73	46	48	51
28	20	22	23	74	46	49	52
29	21	22	24	75	47	50	53
30	21	23	25	76	48	50	53
31	22	24	25	77	48	51	54
32	23	24	26	78	49	51	54
33	23	25	27	79	49	52	55
34	24	25	27	80	50	52	56
35	24	26	28	81	50	53	56
36	25	27	29	82	51	54	57
37	25	27	29	83	51	54	57
38	26	28	30	84	52	55	58
39	27	28	31	85	53	55	59
40	27	29	31	86	53	56	59
41	28	30	32	87	54	56	60
42	28	30	32	88	54	57	60
43	29	31	33	89	55	58	61
44	29	31	34	90	55	58	61
45	30	32	34	91	56	59	62
46	31	33	35	92	56	59	63
47	31	33	36	93	57	60	63
48	32	34	36	94	57	60	64
49	32	34	37	95	58	61	64
50	33	35	37	96	59	62	65
51	33	36	38	97	59	62	66
52	34	36	39	98	60	63	66

Використовують ті самі таблиці (таблиці 2 і 4), які раніше були представлені для порівняльного тесту в парах, розраховані на ймовірність 1/2, оскільки у другій частині тесту вибір або порівняння проводять між двома вибірками. Також

у цьому випадку слід розрізняти односторонні тести та двосторонні тести. Якщо це стосується оцінювання вподобань, тест, як правило, є двостороннім: фактично дегустатори можуть надати перевагу 2 зразкам. Вибираючи продукт, виходячи з інтенсивності певної характеристики, тест представляється одностороннім, коли є відома різниця між двома порівняними зразками, як, наприклад, у випадку розчинів з різною концентрацією, які використовують для відбору дегустаторів. Навпаки, тест буде двостороннім, якщо різниця між двома продуктами невідома; саме тест надасть нам інформацію про відмінності.

7.4.1.3. Duo-trio тест

Дуо-тріо тест використовують як у фазі відбору та тренувань панелі, так і під час аналізу харчових продуктів. Він показаний під час оцінювання продуктів, які мають гострий смак або неприємний післясмак, оскільки цей тест вимагає більш обмеженої кількості дегустацій, ніж метод трикутника.

Під час duo-trio тесту кожен дегустатор має оцінити три зразки, два однакові і один той, що відрізняється: один з двох однакових зразків позначають літерою R і являє собою еталонний зразок. Дегустатор має визначити, який із двох закодованих зразків збігається з еталонним зразком.

Для підготовки та кодування зразків, що підлягають duo-trio тесту, можна використовувати загальну форму, таку, як і для попередніх випробувань.

Для статистичної обробки результатів використовують табл. 2, оскільки, як і під час тесту на порівняння в парах, ймовірність ідентифікації зразка навімання як еталонного становить 50 %.

Також у цьому випадку, крім ідентифікації еталонного зразка, можна поставити дегустатору інші питання, що стосуються як уподобань, так і наявності у вибірці деяких особливостей, присутніх з більшою чи меншою інтенсивністю. Таблиці 2 або 4 використовують для статистичної обробки цієї другої частини тесту залежно від того, є тест одностороннім або двостороннім.

7.4.2. Дискримінаційні якісні та кількісні тести

Деякі методи сенсорного аналізу дозволяють оцінити одну або кілька характеристик харчового продукту з посиланням на шкалу вимірювання. Основними шкалами є: порядкові, шкали з інтервалом і шкали відношення. Якщо продукти, що підлягають оцінюванню, впорядковані на основі зростаючої або спадаючої інтенсивності конкретної властивості (класифікаційне випробування), використовують порядкові шкали. Коли судження дегустатора формулюють за шкалою, що характеризується однією або кількома опорними точками, використовують два інші типи шкал. У тесті інтервальної класифікації шкала складається зі серії категорій, кожна з яких визначає конкретну інтенсивність розглянутої ознаки або рівень уподобання певного товару. Тест на штампування,

в якому використовують шкалу взаємозв'язків, натомість передбачає вимірювання характеристик товару стосовно одного або декількох референтних продуктів.

7.4.2.1. Класифікаційне випробування

За допомогою цього тесту члени панелі мають упорядкувати певну кількість зразків на основі зростаючої або зменшуваної інтенсивності конкретного атрибута (колір, консистенція, інтенсивність аромату тощо). Різні зразки також можна розташувати відповідно до їх ступеня прийнятності (вподобань). Серед зразків, що підлягають випробуванню, можна долучити один контрольний або стандартний, щоб отримати впорядкування інших зразків із посиланням на зразок із відомими характеристиками. На відміну від описаних вище випробувань, у класифікаційному випробуванні одночасно порівнюють більше двох зразків. Ця швидка сенсорна процедура дозволяє одночасно оцінювати кілька зразків, і отримані результати легко піддаються обробці, але надають інформацію про порядок інтенсивності конкретної ознаки, не допускаючи жодної кількісної оцінки відмінностей, що існують між зразками.

Класифікаційне випробування використовується для відбору панелі (випробування, проведені з чотирма основними ароматами), на попередній фазі відбору більшої групи, деякі зразки підлягають більш глибоким випробуванням і, нарешті, у випробуваннях на вподобання, що проводять з великою групою дегустаторів або споживачів.

Для виконання тесту панелі потрібно замовити певну кількість зразків на основі зростаючої або зменшуваної інтенсивності заданої характеристики (рис. 5). Тест можна організувати за допомогою картки, яка показує порядок, в якому продукти подають різним дегустаторам та коди, присвоєні кожному зразку (рис. 6). Наступні приклади показують кілька оціночних таблиць, які використовують для класифікації зразків.

Тест на впорядкування
Продукт: Дата:
Ім'я: Код дегустатора:
П'ять представлених зразків ідентифікуються наступними кодами:
Впорядкуйте п'ять зразків на основі ваших уподобань [зростаючої чи зменшуваної інтенсивності певної характеристики]. Для цього напишіть код зразка, який вам більше подобається, у полі з позначкою «1» – код продукту, який подобається найменше, «5» – подобається найбільше. Помістіть інші зразки у проміжні поля.
Порядок уподобання 1 2 3 4 5 [порядок інтенсивності]
Код

Рис. 5. Картка для класифікаційного випробування

Тест на впорядкування			
Продукт:	Дата:		
Зразок А:			
Зразок В:			
Зразок С:			
Зразок D:			
Зразок E:			
Зразок код для різних зразків			
	1	2	3
A	937		
B	130		
C	725		
D	418		
E	512		
дегустатор,	порядок проби,	код зразка	
1	BCDAE		
2	CDAEB		
3	BACDE		

Рис. 6 Загальна картка для підготовки випробування на впорядкування

Швидка, навіть неповна, обробка результатів передбачає обчислення для кожного зразка загального бала (сума балів, наданих усіма дегустаторами) та їх порівняння зі значеннями, отриманими з таблиць, розроблених Крамером (таблиці 5–6 99 % суттєвий рівень і таблиці 7–8 95 % суттєвий рівень).

Загальні бали, необхідні для 99 % значущості (стор. 1)

Кількість відповідей	Кількість разків або обробок								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	3-19
3	—	—	—	—	—	—	—	—	4-29
	—	—	—	4-14	4-17	4-20	5-22	5-25	6-27
4	—	—	—	5-19	5-23	5-27	6-30	6-34	6-38
	—	—	5-15	6-18	6-22	7-25	8-28	8-32	9-35
5	—	—	6-19	7-23	7-28	8-32	8-37	9-41	9-46
	—	6-14	7-18	8-22	9-26	10-30	11-34	12-38	13-42
6	—	7-17	8-22	9-27	9-33	10-38	11-43	12-48	13-53
	—	8-16	9-21	10-26	12-30	13-35	14-40	16-44	17-49
7	—	8-20	10-25	11-31	12-37	13-43	14-49	15-55	16-61
	8-13	9-19	11-24	12-30	14-35	16-40	18-45	19-51	21-56
8	9-15	10-22	11-29	13-35	14-42	16-48	17-55	19-61	20-68
	9-15	11-21	13-27	15-33	17-39	19-45	21-51	23-57	25-63
9	10-17	12-24	13-32	15-39	17-46	19-53	21-60	22-68	24-75
	10-17	12-24	15-30	17-37	20-43	22-50	25-56	27-63	30-69
10	11-19	13-27	15-35	18-42	20-50	22-58	24-66	26-74	28-82
	11-19	14-26	17-33	20-40	23-47	25-55	28-62	31-69	34-76
11	12-21	12-29	17-38	20-46	22-55	25-63	27-72	30-80	32-89
	13-20	16-28	19-36	22-44	25-52	29-59	32-67	35-75	39-82
12	14-22	17-31	19-41	22-50	25-59	28-68	31-77	33-87	36-96
	14-22	18-30	21-39	25-47	28-56	32-64	36-72	39-81	43-89
13	15-24	18-34	21-44	25-53	28-63	31-73	34-83	37-93	40-103
	15-24	19-33	23-42	27-51	31-60	35-69	39-78	44-86	48-95
14	16-26	20-36	24-46	27-57	31-67	34-78	38-88	41-99	45-109
	17-25	21-35	25-45	30-54	34-64	39-73	43-83	48-92	52-102
15	18-27	22-38	26-49	30-60	34-71	37-83	41-94	45-105	49-116
	18-27	23-37	28-47	32-58	37-68	42-78	47-88	52-98	57-108
16	19-29	23-41	28-52	32-64	36-76	41-87	45-99	49-111	53-123
	19-29	25-39	30-50	35-61	40-72	46-82	51-93	56-104	61-115
17	20-31	25-43	30-55	35-67	39-80	44-92	49-104	53-117	58-129
	21-30	26-42	32-53	38-64	43-76	49-87	55-98	60-110	66-121
18	22-32	27-45	32-58	37-71	42-84	47-97	52-110	57-123	62-136
	22-32	28-44	34-56	40-68	46-80	52-92	59-103	65-115	71-127
19	23-34	29-47	34-61	40-74	45-88	50-102	56-115	61-129	67-142
	24-33	30-46	36-59	43-71	49-84	56-96	62-109	69-121	76-133
20	24-36	30-50	36-64	42-78	48-92	54-106	60-120	65-135	71-149
	25-35	32-48	38-62	45-75	52-88	59-101	66-114	73-127	80-140

Загальні бали, необхідні для 99 % значущості (стор. 2)

Кількість відповідей	Кількість зразків або обробок								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
21	26-37	32-52	38-67	45-81	51-96	57-111	63-126	69-141	75-156
	26-37	33-51	41-64	48-78	55-92	63-105	70-119	73-127	80-140
22	27-39	34-54	40-70	47-85	54-100	60-116	67-131	74-146	80-162
	28-38	35-53	43-67	51-81	58-96	66-110	74-124	82-138	90-152
23	28-41	36-56	43-72	50-88	57-104	64-120	71-136	78-152	85-168
	29-40	37-55	45-70	53-85	62-99	70-114	78-129	86-144	95-158
24	30-42	37-59	45-75	52-92	60-108	67-125	75-141	82-158	89-175
	30-42	39-57	47-73	56-88	65-103	73-119	82-134	91-149	99-165
25	31-44	39-61	47-78	55-95	63-112	71-129	78-147	86-164	94-181
	32-43	41-59	50-75	59-91	68-107	77-123	86-139	95-155	104-171
26	33-45	41-63	49-81	57-99	66-116	74-134	82-152	90-170	98-188
	33-45	42-62	52-78	61-95	71-111	80-128	90-144	100-160	109-177
27	34-47	43-65	51-84	60-102	69-120	77-139	86-157	94-176	103-194
	35-46	44-64	54-81	64-98	74-115	84-132	94-149	104-166	114-183
28	35-49	44-68	54-86	63-105	72-124	81-143	90-162	99-181	108-200
	36-48	46-66	56-84	67-101	77-119	88-136	98-154	108-172	119-189
29	37-50	46-70	56-89	65-109	75-128	84-148	94-167	103-187	112-207
	37-50	48-68	59-86	69-105	80-123	91-141	102-159	113-177	124-195
30	38-52	48-72	58-92	68-112	78-132	88-152	97-173	107-193	117-213
	39-51	50-70	61-89	72-108	83-127	95-145	106-164	117-183	129-201
31	39-54	50-74	60-95	71-115	81-136	91-157	101-178	112-198	122-219
	40-53	51-73	63-92	75-111	86-131	98-150	110-169	122-188	133-208
32	41-55	52-76	62-98	73-119	84-140	95-161	105-183	116-204	126-226
	41-55	53-75	65-95	77-115	90-134	102-154	114-174	126-194	138-214
33	42-57	53-79	65-100	76-122	87-144	98-166	109-188	120-210	131-232
	43-56	55-77	68-97	80-118	93-138	105-159	118-179	131-199	143-220
34	44-58	55-81	67-103	78-126	90-148	102-170	113-193	124-216	136-238
	44-58	57-79	70-100	83-121	96-142	109-163	122-184	135-205	148-226
35	45-60	57-83	69-106	81-129	93-152	105-175	117-198	129-221	141-244
	46-59	59-81	72-103	86-124	99-146	113-167	126-189	140-210	153-232
36	46-62	59-85	71-109	84-132	96-156	109-179	121-203	133-227	145-251
	47-61	61-83	74-106	88-128	102-150	116-172	130-194	144-216	158-238
37	48-63	61-87	74-111	86-136	99-160	112-184	125-208	137-233	150-257
	48-63	63-85	77-108	91-131	105-154	120-176	134-199	149-221	163-244
38	49-65	62-90	76-114	89-139	102-164	116-188	129-213	142-238	155-263
	50-64	64-88	79-111	94-134	109-157	123-181	138-204	153-227	168-250
39	51-66	64-92	78-117	92-142	105-168	119-193	133-218	146-244	160-269
	51-66	66-90	81-114	97-137	112-161	127-185	142-209	158-232	173-256
40	52-68	66-94	80-120	94-146	109-171	123-197	137-223	150-250	164-276
	53-67	68-92	84-116	99-141	115-165	131-189	146-214	162-238	178-262

Загальні бали, необхідні для 95 % значущості (стор. 1)

Кількість відповідей	Кількість зразків								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	3-9	3-11	3-13	4-14	4-16	4-18
3	—	—	—	4-14	4-17	4-20	4-23	5-25	5-28
	—	4-8	4-11	5-13	6-15	6-18	7-20	8-22	8-25
4	—	5-11	5-15	6-18	6-22	7-25	7-29	8-32	8-36
	—	5-11	6-14	7-17	8-20	9-23	10-26	11-29	13-31
5	—	6-14	7-18	8-22	9-26	9-31	10-35	11-39	12-43
	6-9	7-13	8-17	10-20	11-24	13-27	14-31	15-35	17-38
6	7-11	8-16	9-21	10-26	11-31	12-36	13-41	14-46	15-51
	7-11	9-15	11-19	12-24	14-28	16-32	18-36	20-40	21-45
7	8-13	10-18	11-24	12-30	14-35	15-41	17-46	18-52	19-58
	8-13	10-18	13-22	15-27	17-32	19-37	22-41	24-46	26-51
8	9-15	11-21	13-27	15-33	17-39	18-46	20-52	22-58	24-64
	10-14	12-20	15-25	17-31	20-36	23-41	25-47	28-52	31-57
9	11-16	13-23	15-30	17-37	19-44	22-50	24-57	26-64	28-71
	11-16	14-22	17-28	20-34	23-40	26-46	29-52	32-58	35-64
10	12-18	15-25	17-33	20-40	22-48	25-55	27-63	30-70	32-78
	12-18	16-24	19-31	23-37	26-44	30-50	33-57	37-63	40-70
11	13-20	16-28	19-36	22-44	25-52	28-60	31-68	34-76	36-85
	14-19	18-26	21-34	25-41	29-48	33-55	37-62	41-69	45-76
12	15-21	18-30	21-39	25-47	28-56	31-65	34-74	38-82	41-91
	15-21	19-29	24-36	28-44	32-52	37-59	41-67	45-75	50-82
13	16-23	20-32	24-41	27-51	31-60	35-69	38-79	42-88	45-98
	17-22	21-31	26-39	31-47	35-56	40-64	45-72	50-80	54-89
14	17-25	22-34	26-44	30-54	34-64	38-74	42-84	46-94	50-104
	18-24	23-33	28-42	33-51	38-60	44-68	49-77	54-86	59-95
15	19-26	23-37	28-47	32-58	37-68	41-79	46-89	50-100	54-111
	19-26	25-35	30-45	36-54	42-63	47-73	53-82	59-91	64-101
16	20-28	25-39	30-50	35-61	40-72	45-83	49-95	54-106	59-117
	21-27	27-37	33-47	39-57	45-67	51-77	57-87	63-97	69-107
17	22-29	27-41	32-53	38-64	43-76	48-88	53-100	58-112	63-124
	22-29	28-40	35-50	41-61	48-71	54-82	61-92	67-103	74-113
18	23-31	29-43	34-56	40-68	46-80	51-93	57-105	62-118	68-130
	24-30	30-42	37-53	44-64	51-75	58-86	65-97	72-108	79-119
19	24-33	30-46	37-58	43-71	49-84	55-97	61-110	67-123	73-136
	25-32	32-44	39-56	47-67	54-79	62-90	69-102	76-114	84-125
20	26-34	32-48	39-61	45-75	52-88	58-102	65-115	71-129	77-143
	26-34	34-46	42-58	50-70	57-83	65-95	73-107	81-119	89-131

Загальні бали, необхідні для 95 % значущості (стор. 2)

Кількість відповідей	Кількість зразків								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
21	27-36	34-50	41-64	48-78	55-92	62-106	68-121	75-135	82-149
	28-35	36-48	44-61	52-74	61-86	69-99	77-112	86-124	94-137
22	28-38	36-52	43-67	51-81	58-96	65-111	72-126	80-140	87-155
	29-37	38-50	46-64	55-77	64-90	73-103	81-117	90-130	99-143
23	30-39	38-54	46-69	53-85	61-100	69-115	76-131	84-146	91-162
	31-38	40-52	49-66	58-80	67-94	76-108	85-122	95-135	104-149
24	31-41	40-56	48-72	56-88	64-104	72-120	80-136	88-152	96-168
	32-40	41-55	51-69	61-83	70-98	80-112	90-126	99-141	109-155
25	33-42	41-59	50-75	59-91	67-108	76-124	84-141	92-158	101-174
	33-42	43-57	53-72	63-87	73-102	84-116	94-131	104-146	114-161
26	34-44	43-61	52-78	61-95	70-112	79-129	88-146	97-163	106-180
	35-43	45-59	56-74	66-90	77-105	87-121	98-136	108-152	119-167
27	35-46	45-63	55-80	64-98	73-116	83-133	92-151	101-169	110-187
	36-45	47-61	58-77	69-93	80-109	91-125	102-141	113-157	124-173
28	37-47	47-65	57-83	67-101	76-120	86-138	96-156	106-174	115-193
	38-46	49-63	60-80	72-96	83-113	95-129	106-146	118-162	129-179
29	38-49	49-67	59-86	69-105	80-123	90-142	100-161	110-180	120-199
	39-48	51-65	63-82	74-100	86-117	98-134	110-151	122-168	134-185
30	40-50	51-69	61-89	72-108	83-127	93-147	104-166	114-186	125-205
	41-49	53-67	65-85	77-103	90-120	102-138	114-156	127-173	139-191
31	41-52	52-72	64-91	75-111	86-131	97-151	108-171	119-191	130-211
	42-51	55-69	67-88	80-106	93-124	106-142	119-160	131-179	144-197
32	42-54	54-74	66-94	77-115	89-135	100-156	112-176	123-197	134-218
	43-53	56-72	70-90	83-109	96-128	109-147	123-165	136-184	149-203
33	44-55	56-76	68-97	80-118	92-139	104-160	116-181	128-202	139-224
	45-54	58-74	72-93	86-112	99-132	113-151	127-170	141-189	154-209
34	45-57	58-78	70-100	83-121	95-143	108-164	120-186	132-208	144-230
	46-56	60-76	74-96	88-116	103-135	117-155	131-175	145-195	159-215
35	47-58	60-80	73-102	86-124	98-147	111-169	124-191	136-214	149-236
	48-57	62-78	77-98	91-119	106-139	121-159	135-180	150-200	165-220
36	48-60	62-82	75-105	88-128	102-150	115-173	128-196	141-219	154-242
	49-59	64-80	79-101	94-122	109-143	124-164	139-185	155-205	170-226
37	50-61	63-85	77-108	91-131	105-154	118-178	132-201	145-225	159-248
	51-60	66-82	81-104	97-125	112-147	128-168	144-189	159-211	175-232
38	51-63	65-87	80-110	94-134	108-158	122-182	136-206	150-230	164-254
	52-62	68-84	84-106	100-128	116-150	132-172	148-194	164-216	180-238
39	52-65	67-89	82-113	97-137	111-162	126-186	140-211	154-236	169-260
	53-64	70-86	86-109	102-132	119-154	135-177	152-199	168-222	185-244
40	54-66	69-91	84-116	99-141	114-166	129-191	144-216	159-241	173-267
	55-65	72-82	88-112	105-135	122-158	139-181	156-204	173-227	190-250

Критичні відмінності під час порівняння декількох пар зразків(стор. 1)

Кількість відповідей	Кількість зразків													
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
5	0,01	9	12	16	19	23	26	29	33	37	40	44	47	51
	0,05	8	11	14	17	20	23	26	30	34	37	40	43	47
6	0,01	10	14	17	21	25	29	33	37	41	45	49	53	57
	0,05	9	12	15	19	22	26	29	33	37	41	43	48	52
7	0,01	11	15	19	23	27	31	36	40	44	49	53	58	62
	0,05	9	13	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56
8	0,01	12	16	20	25	29	34	38	43	47	52	57	62	67
	0,05	10	14	17	21	25	30	34	38	42	47	51	56	60
9	0,01	12	17	22	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71
	0,05	10	14	18	23	27	31	36	40	45	50	54	59	64
10	0,01	13	18	23	28	33	38	43	49	54	59	65	70	75
	0,05	11	15	19	24	28	33	38	43	47	52	57	62	67
11	0,01	14	19	24	29	35	40	46	51	57	62	68	74	78
	0,05	11	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	71
12	0,01	14	20	25	31	36	42	48	54	59	65	71	77	83
	0,05	12	16	21	26	31	36	41	47	52	58	63	68	74
13	0,01	15	21	26	32	38	44	50	56	62	68	74	80	87
	0,05	12	17	22	27	32	38	43	49	54	60	65	71	77
14	0,01	16	21	27	33	39	45	52	58	64	71	77	84	90
	0,05	13	17	23	28	34	39	45	50	56	62	68	74	80
15	0,01	16	22	28	34	41	47	54	60	67	73	80	87	94
	0,05	13	18	24	29	35	40	46	52	58	64	70	76	83
16	0,01	16	23	29	36	42	49	56	62	69	76	83	90	97
	0,05	13	18	24	30	36	42	48	54	60	67	73	79	86
17	0,01	17	23	30	37	43	50	57	64	71	79	86	93	100
	0,05	14	19	25	31	37	43	50	56	62	69	75	82	88
18	0,01	17	24	31	38	45	52	59	66	74	81	85	96	103
	0,05	14	20	26	32	38	45	51	57	64	71	77	84	91
19	0,01	18	25	32	39	46	53	61	68	76	83	91	98	106
	0,05	14	20	27	33	39	46	52	59	66	73	80	86	93
20	0,01	18	25	33	40	47	55	62	70	78	85	93	101	109
	0,05	15	21	27	34	40	47	54	61	68	75	82	89	96
21	0,01	19	26	33	41	48	56	64	72	79	87	95	104	112
	0,05	15	21	28	35	41	48	55	62	69	76	84	91	98
22	0,01	19	27	34	42	49	57	65	73	81	89	98	106	114
	0,05	16	22	29	35	42	49	56	64	71	78	86	93	101

Критичні відмінності під час порівняння декількох пар зразків(стор. 2)

Кількість відповідей	Кількість зразків													
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
23	0,01	20	27	35	43	51	59	67	75	83	91	100	108	117
	0,05	16	22	29	36	43	50	58	65	72	80	88	95	103
24	0,01	20	28	36	44	52	60	68	76	85	93	102	111	119
	0,05	16	23	30	37	44	51	59	66	74	82	89	97	105
25	0,01	21	28	36	44	53	61	70	78	87	95	104	113	122
	0,05	17	23	31	38	45	52	60	68	75	83	91	99	107
26	0,01	21	29	37	45	54	62	71	80	88	97	106	115	124
	0,05	17	24	31	38	46	54	61	69	77	85	93	101	109
27	0,01	21	30	38	46	55	63	72	81	90	99	108	117	127
	0,05	17	24	32	39	47	55	62	70	78	87	95	103	111
28	0,01	22	30	39	47	56	65	74	83	92	101	110	120	129
	0,05	18	25	32	40	48	56	64	72	80	88	97	105	113
29	0,01	22	31	39	48	57	66	75	84	93	103	112	122	131
	0,05	18	25	33	41	49	57	65	73	81	90	98	107	116
30	0,01	23	31	40	49	58	67	76	86	95	104	114	124	133
	0,05	18	26	33	41	49	58	66	74	83	91	100	109	117
31	0,01	23	32	41	50	59	68	77	87	97	106	116	126	136
	0,05	18	26	34	42	50	58	67	75	84	93	102	110	119
32	0,01	23	32	41	50	60	69	79	88	98	108	118	128	138
	0,05	19	27	35	43	51	59	68	77	85	94	103	112	121
33	0,01	24	33	42	51	61	70	80	90	100	110	120	130	140
	0,05	19	27	35	43	52	60	69	78	87	96	105	114	123
34	0,01	24	33	42	52	61	71	81	91	101	111	121	132	142
	0,05	19	27	36	44	53	61	70	79	88	97	106	116	125
35	0,01	24	34	43	53	62	72	82	92	103	113	123	134	144
	0,05	20	28	36	45	53	62	71	80	89	99	108	117	127
36	0,01	25	34	44	53	63	73	83	94	104	114	125	136	146
	0,05	20	28	37	45	54	63	72	81	91	100	109	119	129
37	0,01	25	35	44	54	64	74	85	95	105	116	127	137	148
	0,05	20	29	37	46	55	64	73	82	92	101	111	121	130
38	0,01	25	35	45	55	65	75	86	96	107	118	128	139	150
	0,05	20	29	38	46	56	65	74	84	93	103	112	122	132
39	0,01	26	35	45	56	66	76	87	98	108	119	130	141	152
	0,05	21	29	38	47	56	66	75	85	94	104	114	124	134
40	0,01	26	36	46	56	67	77	88	99	110	121	132	143	154
	0,05	21	30	39	48	57	66	76	86	95	105	115	125	136

У таблицях для кожної комбінованої кількості зразків та кількості відповідей є дві пари чисел. Перша пара вказує інтервал, поза яким має бути знайдено загальний бал щонайменше однієї вибірки, щоб зробити висновок про істотну різницю між вибірками. Другу пару використовують для ідентифікації того, який зразок (або які зразки) відрізняється від інших. Після цього встановлення, порівнюючи бали різних зразків з першою парою чисел, у яких є суттєві відмінності, ми порівнюємо кожну оцінку з другою парою чисел. Якщо оцінка зразка нижча за перше число пари, це означає, що цей зразок значно відрізняється від інших (наприклад, тому що він менш солодкий або тому що йому надали менше переваги), якщо число вище за другий номер пари, результат буде подібний, але прямо протилежний (наприклад, тому, що він солодший чи приємніший). За допомогою цього методу можна класифікувати зразки не більше ніж на 3 категорії: ті, у кого бал нижчий за перше число пари, ті, оцінка яких знаходиться в парі, і, нарешті, ті зразки, які мають бал вище ніж друге число пари. У межах кожної групи неможливо отримати інформацію про відмінність між різними зразками. За методом, запропонованим Неменієм і Данном-Рункіним (метод багаторазового порівняння між сумами балів), можна зробити пряме порівняння між загальними балами кожного зразка, обчисливши різницю між кожною парою балів та порівнянням цих відмінностей із табличними значеннями, залежно від кількості порівняних зразків та кількості дегустаторів. Інший метод обробки результатів передбачає використання аналізу розбіжності після перетворення позицій кожного зразка в бал за допомогою спеціальної таблиці.

7.4.2.2. Тест з класифікації діапазону

Це один з найбільш часто використовуваних методів для виділення та кількісної оцінки відмінностей між двома або більше продуктами або встановлення рівня задоволення від них. Це тест, який можна провести як з обраними дегустаторами, так і зі звичайними споживачами. Цей метод дозволяє оцінити інтенсивність певної характеристики, або прийнятність харчового продукту, використовуючи шкали інтервалів. Кожна точка на шкалі визначає інтенсивність певної характеристики або рівень задоволення, виражений щодо різних оцінюваних продуктів (гедоністично-словесні шкали). Числа можуть бути пов'язані з кожним інтервалом шкали, щоб сприяти вибору дегустаторів та обробці результатів. Деякі приклади інтервальних шкал показані на рис. 7. Загалом шкали утворюють через низку змінних інтервалів від 5 до 11 (частіше 7–9). Не доцільно використовувати величину шкали зі занадто малою кількістю інтервалів, щоб обмежити, так званий, кінцевий ефект або спотворення балів у крайніх межах шкали, що пояснюється небажанням дегустаторів призначати занадто високі або занадто низькі бали. Під час оцінювання результатів використовують стандартні статистичні методи, такі як тест t-

Studenta або аналіз розбіжностей, щоб виділити, чи є істотні відмінності між властивостями або балами, присвоєними різним зразками. Ці процедури обробки припускають, що точки шкали ділять її на проміжки з однаковим діапазоном, тобто, наприклад, різницю у прийнятності. Між двома перерахованими продуктами 1 і 2 є тим самим, що і між двома переліченими продуктами 8 і 9. Незважаючи на ці наближення, метод інтервальної класифікації вважається одним з найнадійніших методів вимірювання як уподобань, так і прийнятності продуктів, а також кількісної оцінки інтенсивності конкретної характеристики товару.

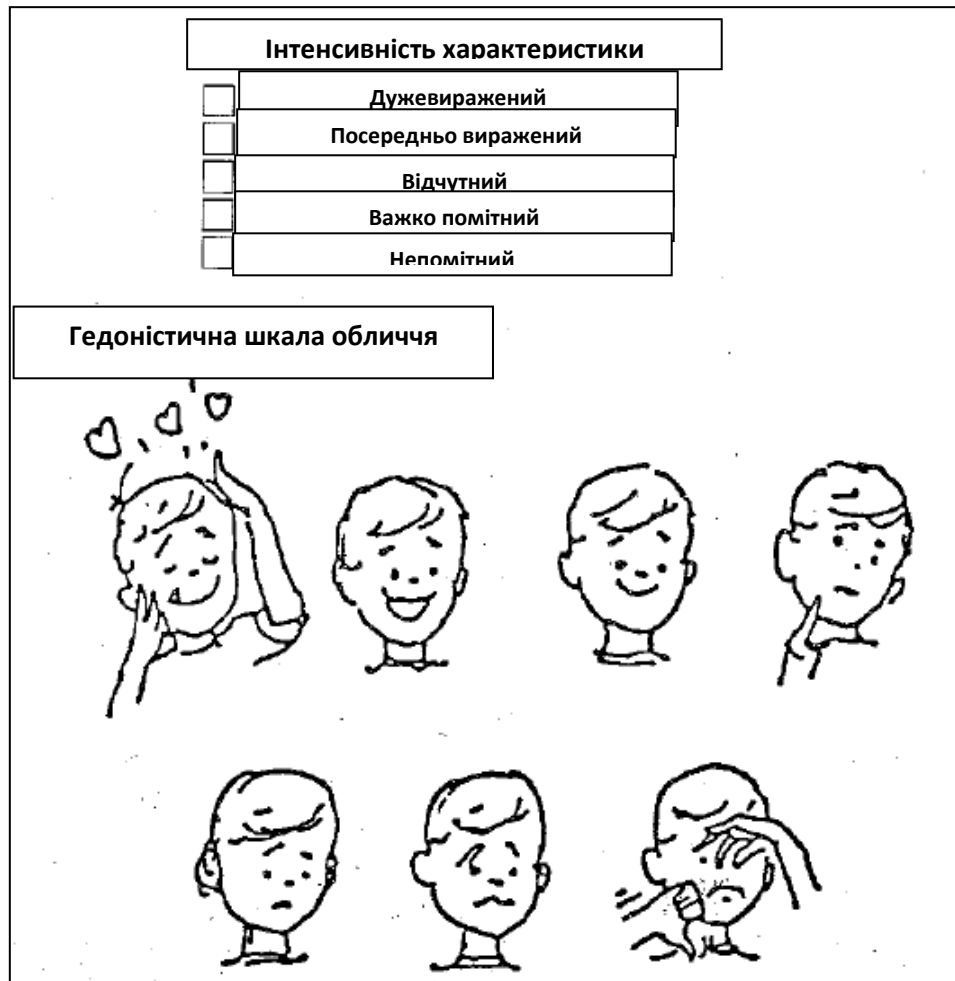


Рис. 7. Приклади словесних та графічних інтервальних шкал

7.4.2.3. Тест множителів (шкали відгуків)

Інтервальна шкала лише надає інформацію про різниці в інтенсивності між ознаками двох або більше харчових продуктів, але не надає жодної інформації щодо взаємозв'язків між вищезазначеними ознаками. Наприклад, твердість, оцінювана 8, з інтервальною шкалою – це чотири інтервали від оцінюваної твердості 4, але це не означає, що продукт, який оцінюється 8, має твердість удвічі більшу, ніж його було оцінено.

З іншого боку, шкалами відношення ми оцінюємо інтенсивність певної характеристики порівняно з еталонною. Припустимо, ви хочете оцінити інтенсивність солодкого смаку апельсинового соку (зразок А) порівняно з інтенсивністю еталонного соку (зразок R). Питання, яке буде сформульовано для дегустаторів, буде таким: «У скільки разів більше (або менше) солодким є зразок А порівняно зі зразком R»? Щоб відповісти на запитання такого типу, дегустатор має бути належним чином навчений використовувати відношення.

У попередньому прикладі використовували відкриту шкалу, як альтернативу можна розмежувати шкалу двома протиставленими матеріалами, що мають мінімальну та максимальну інтенсивність характеристики, що оцінюється. Для порівняння двох еталонних зразків оцінюється відносна інтенсивність органолептичної характеристики невідомого зразка. Відповідь дається на прямому відрізку (шкала вимірювання), намалювавши лінію, перпендикулярну до шкали в точці, яка з точки зору відстані від кінців являє собою оцінку інтенсивності невідомої характеристики відносно точок відліку. У цьому випадку дегустатор отримує, крім зразка, що підлягає оцінюванню, два протиставлені зразки: один з них, якому присвоєно бал 1, має мінімальну інтенсивність оцінюваної характеристики, інший, якому присвоєно оцінку 9, представлено характеристику з максимальною інтенсивністю. Дегустатор має встановити, в якій точці на проміжку слід використовувати вертикальну секцію, використовуючи процедуру одночасного порівняння з двома протиставленими матеріалами. Потім буде поставлене таке запитання: «Чи слід оцінювати інтенсивність характеристики зразка посередині між іншими двома»? Якщо так, то він поставить позначку на значенні 5 і так далі. Використовувані шкали можна розділити на декілька рівних інтервалів (структурованих шкал), або вони можуть бути неструктурованими, коли визначені лише крайні точки.

Результати обробляють за допомогою тесту t-Studentабо, коли невідомих зразків більше двох, то за допомогою аналізу розбіжностей та тесту Дункана.