

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біомедичної інженерії
Кафедра трансляційної медичної біоінженерії**

«До захисту допущено»
В.о. Завідувач кафедри
Олександр БЕСАРАБ
“ ____ ” _____ 20__ р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою
«Регенеративна та біофармацевтична інженерія»
спеціальності 163 Біомедична інженерія
на тему: «Біоінженерний проєкт виготовлення медичного виробу для
поліланцюгової діагностики збудників бактеріальних інфекцій»**

Виконала:

здобувачка IV курсу, групи БФ-91

Мокроусова Анна

Керівник:

Доцент, доктор філософії

Мотроненко Валентина Василівна

Консультант з «Розробки схеми автоматизації»:

Старший викладач,

Жураковський Ярослав Юрійович

Консультант з «Охорони праці та техніки безпеки»:

Кандидат наук,

Демчук Гліб Вікторович

Рецензент:

Асистент кафедри біобезпеки та здоров'я людини,

Сніцар Євген Вікторович

Засвідчую, що у цьому дипломному проєкті
немає запозичень з праць інших авторів без
відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

№ з/П	Формат	Позначення	Найменування	К-сть листів	Примітка
1	A4		Завдання дипломний проєкт	2	
2	A4	БФ9114.23.30.001 ПЗ	Пояснювальна записка	90	
3	A1	БФ9114.23.30.002 ТС	Технологічна схема	1	
4	A1	БФ9114.23.30.003 АТС	Апаратурна схема	1	
5	A1	БФ9114.23.30.004 СхА	Схема автоматизації	1	

				ДП9114.23.30.001		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Мокроусова А.А.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Мотроненко В.В.				1	1
Консульт.					КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ТМБ Н/контр. Гр.БФ-91	
Н/контр.						
Зав.каф	Бесараб О.Б.					

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту**

**на тему: «Біоінженерний проєкт виготовлення медичного виробу для
поліланцюгової діагностики збудників бактеріальних інфекцій»**

Київ – 2023

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біомедичної інженерії

Кафедра трансляційної медичної інженерії

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 163 Біомедична інженерія

Освітньо-професійна програма «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Бесараб Олександр Борисович

«___»_____20__ р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Мокроусовій Анні

1. Тема проєкту «Біоінженерний проєкт виготовлення медичного виробу для поліланцюгової діагностики збудників бактеріальних інфекцій», керівник проєкту Мотроненко, Валентина, Василівна доцент, доктор філософії затверджені наказом по університету від «31» травня 2023 р., №2106-с

2. Термін подання студентом проєкту «16» червня 2023 р.

3. Вихідні дані до проєкту: бактерії *Mycobacterium tuberculosis*; ампліфікатор CFX96 Touch; автоматична системи очистки нуклеїнових кислот Auto-Pure 32; складові для проведення ПЛР аналізу MasterMix, термостабільна Taq-полімераза, позитивний та негативний контроль; кінцевий продукт тест-система на виявлення резистентного туберкульозу методом ПЛР у реальному часі.

4. Зміст пояснювальної записки: медико-біологічне обґрунтування; технологічна частина; апаратурно-інженерна частина; охорона праці та техніка безпеки.

5. Перелік графічного матеріалу технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1, схема автоматизації очистки деіонізованої води– 1 арк. А1.

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 3.2. Розробка схеми автоматизації	Старший викладач, Жураковський Ярослав Юрійович		
Розділ 4. Охорона праці та техніка безпеки	Кандидат наук, доцент кафедри охорони праці, промислової та цивільної безпеки, Демчук Гліб Вікторович		

7. Дата видачі завдання «03» квітня 2023 р

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1	Аналіз літературних даних. Вступ.	3.04.23 – 8.04.23	
2	Розділ 1. Медико біологічне обґрунтування	9.04.23 – 15.04.23	
3	Розділ 2. Технологічна частина	16.04.23 – 23.04.23	
4	Розділ 3. Апаратурно-інженерна частина	24.04.23 – 18.05.23	
5	Розділ 4. Охорона праці та техніка безпеки	19.05.23 – 24.05.23	
6	Креслення 1. Технологічна схема	25.05.23 – 28.05.23	
7	Креслення 2. Апаратурно-технологічна схема	29.05.23 – 31.05.23	
8	Креслення 3. Схема автоматизації.	1.06.23 – 6.06.23	
9	Оформлення ПЗ та Реферату	9.06.23 – 15.06.23	
10	Подання дипломного проєкту до екзаменаційної комісії.	16.06.23	

Здобувач

Анна МОКРОУСОВА

Керівник

Валентина МОТРОНЕНКО

РЕФЕРАТ

Бакалаврський дипломний проект на тему: «Біоінженерний проект виготовлення медичного виробу для поліланцюгової діагностики збудників бактеріальних інфекцій». Дипломний проект складається з чотирьох розділів, 90 сторінок, містить 8 рисунків, 16 таблиць, було опрацьовано 35 джерел.

Резистентний туберкульоз є серйозною глобальною проблемою в галузі громадського здоров'я, оскільки він ускладнює лікування туберкульозу і сприяє поширенню інфекції. За оцінками вчених у звіті, станом на 2021 рік, кількість людей, які хворіють на туберкульоз, становить приблизно 10,6 мільйона осіб.

Використання полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі є потужним інструментом для виявлення та кількісної оцінки генетичного матеріалу, зокрема ДНК бактерій *Mycobacterium tuberculosis*, що спричиняють туберкульоз. Використання ПЛР в реальному часі дозволяє швидко виявляти і ідентифікувати резистентність до антибіотиків, що є критичним для успішного лікування туберкульозу. Та це є суттєвою перевагою цього методу порівняно з іншими методами діагностики даного захворювання.

У проекті Була розроблена технологія для виготовлення тест-системи, яка призначена для діагностики резистентного туберкульозу. Ця технологія включає найсучасніші методи виділення ДНК та ампліфікації у реальному часі, що дозволяють з високою точністю та специфічністю виявляти збудників інфекції. Крім того, було підібрано необхідне устаткування розроблено апаратурну схему проведення аналізів. Проект доповнює схема автоматизації частини виробництва, для його поліпшення, а також створений теоретичний план лабораторних приміщень для проведення всіх стадій виготовлення тест-систем, та проведення їх аналіз, з точки зору охорони праці та пожежної безпеки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ; ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ МЕТОДОМ МАГНІТНИХ ЧАСТОК; *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*; ДЕІОНІЗОВАНА ВОДА; RT-PCR.

ABSTRACT

The bachelor's degree project on the topic: "Bioengineering project of manufacturing a medical device for poly chain diagnostics of bacterial infections". The diploma project consists of four chapters, 90 pages, contains 8 figures, 16 tables, and 35 sources.

Resistant tuberculosis is a serious global public health problem, as it complicates the treatment of tuberculosis and contributes to the spread of the infection. The report estimates that as of 2021, the number of people with TB is approximately 10.6 million.

The use of real-time polymerase chain reaction is a powerful tool for detecting and quantifying genetic material, including the DNA of the *Mycobacterium tuberculosis* bacteria that cause tuberculosis. The use of real-time PCR allows for the rapid detection and identification of antibiotic resistance, which is critical for the successful treatment of tuberculosis. This is a significant advantage of this method compared to other methods of diagnosing the disease.

The project developed a technology for manufacturing a test system designed to diagnose resistant tuberculosis. This technology includes state-of-the-art DNA extraction and real-time amplification methods that allow for high accuracy and specificity in detecting infectious agents. In addition, the necessary equipment was selected and a hardware scheme for analyzing was developed. The project is complemented by an automation scheme for part of the production to improve it, as well as a theoretical plan of laboratory facilities for all stages of manufacturing test systems and their analysis from the point of view of labor protection and fire safety.

KEYWORDS: REAL-TIME PCR; NUCLEIC ACID EXTRACTION BY MAGNETIC PARTICLE METHOD; MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS; DEIONIZED WATER; RT-PCR.

ЗМІСТ

ЗМІСТ	9
Перелік умовних позначень та термінів	11
Вступ.....	12
Розділ 1. Медико-біологічне обґрунтування.....	14
1.1. Медико-біологічне обґрунтування.....	14
1.2. Характеристика біомедичного продукту та обґрунтування складу	17
1.3. Біологічні основи отримання біомедичного продукту	21
1.3.1. Проведення аналізу на туберкульоз, методом ПЛР в реальному часі	21
1.3.2. Обладнання виділення ДНК з мокротиння за допомогою системи очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32	22
1.3.3. Обладнання для проведення RT-qPCR Ампліфікатор CFX96 Touch.....	24
Розділ 2. Технологічна частина	29
2.1. Обґрунтування вибору технології виготовлення.....	30
2.1.1. Проведення аналізу на туберкульоз методом ПЛР в реальному часі	30
2.1.2. Попередня обробка зразку.	31
2.1.3. Очистка ДНК	32
2.1.4. Власне RT-qPCR.....	33
2.2. Опис технології виготовлення	35
2.3. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів.....	48
2.4. Матеріальний баланс	51

					БФ9114.23.30.001. ПЗ			
Вим	Лист	№ докум.	Підпис					
Розробив	Мокроусова А.А				«Біоінженерний проект виготовлення медичного виробу для поліклінічної діагностики збудників бактеріальних інфекцій»	Літ.	Лист	Листів
Перевірів	Мотроненко В.В.						7	90
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБМІ БМ-42		
Н. Контр.	Мотроненко В.В							
Затвердив	Бесараб О.Б.							

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

dATP – дезоксиаденозин трифосфат.

dCTP – дезоксицитидинтрифосфат.

dGTP – дезоксигуанозинтрифосфат.

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфати.

dTTP – дезокситимидинтрифосфат.

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*.

RT-PCR (real-time PCR qPCR або RT-PCR, RT-qPCR) – reverse transcription polymerase chain reaction; полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі.

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

Мкл – мікро літри

НК – нуклеїнова кислота

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція.

ПЛР-ПДРФ – PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism; Поліморфізм довжини фрагментів ПЛР-рестрикції.

РНК – рибонуклеїнова кислота

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						11
Изм.	Лист	№ докум.	Місц.	Підпис	Дата	

ВСТУП

Актуальність проекту:

Резистентний туберкульоз є серйозною глобальною проблемою в галузі громадського здоров'я, оскільки він викликає ускладнення в лікуванні туберкульозу та збільшує ризик поширення інфекції. За підрахунками вчених у звіті зазначено, що близько 10,6 мільйона осіб на даний момент перебувають у стані туберкульозу, проте їхнє захворювання не було діагностовано, або офіційно не повідомляється національним органам влади станом на 2021 рік. В Україні ця цифра на 2021 рік 4,1 мільйона осіб, деякі з яких теж не є офіційно зареєстровані.

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі є потужним інструментом для виявлення та квантифікації генетичного матеріалу, такого як ДНК бактерій *Mycobacterium tuberculosis*, що спричиняють туберкульоз. Використання ПЛР в реальному часі дозволяє швидко виявляти та ідентифікувати резистентність до антибіотиків, що є критичним для успішного лікування туберкульозу.

Останні роки були свідками появи нових лікарських засобів та розробки нових рекомендацій щодо діагностики та лікування резистентного туберкульозу. Тест-системи на визначення резистентного туберкульозу методом ПЛР в реальному часі відіграють важливу роль у забезпеченні швидкої та точної діагностики, а також відбору ефективного лікування для індивідуальних пацієнтів.

Крім того, зростає значення молекулярно-генетичних методів у медицині загалом, а також зростає доступність та швидкість аналізу генетичного матеріалу. Це робить тест-системи на основі ПЛР в реальному часі ще більш привабливими для діагностики та моніторингу резистентного туберкульозу.

Отже, актуальність роботи по виготовленню тест-систем на визначення резистентного туберкульозу методом ПЛР в реальному часі залишається високою з огляду на серйозність проблеми резистентного туберкульозу та зростаючий інтерес до молекулярно-генетичних методів у медицині.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						12
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Пі	Дата	

Мета проектування:

Розробити біоінженерний проект виготовлення медичного виробу для поліланцюгової діагностики збудників бактеріальних інфекцій *Mycobacterium tuberculosis*.

Завдання дослідження

1. Визначити перевагу RT-PCR як метод діагностики на туберкульоз, порівняно з іншими типами діагностики даного захворювання.
2. Обґрунтувати вибір технології та склад кінцевого продукту для тест-систем на резистентний туберкульоз.
3. Виявити необхідність в виготовленні тест-систем на резистентний туберкульозу в Києві, для точного складання матеріальних розрахунків потреби в даному типі діагностики.
4. Окреслити технологію проведення аналізу на туберкульоз, його переваги та недоліки для пацієнтів та підприємств.
5. Розробити апаратурну схему та розглянути можливість автоматизації частини виробництва тест-систем на резистентний туберкульоз викликаний бактеріями *Mycobacterium tuberculosis*.
6. Розробити приміщення в яких має відбуватися виготовлення складових тест-системи на резистентний туберкульоз, і продумати їх устаткування та параметри із точки зору охорони праці.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						13
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. МЕДИКО-БІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1. Медико-біологічне обґрунтування

В сучасному світі важливим є чітко та швидко визначати яке захворювання у людини. А найефективнішим способом є перевірка по ДНК або РНК бо вони є специфічними для кожного виду. Тому тест-система типу ПЛР є однією з найточнішими результатами. А з сучасними його технологіями проведення, даний спосіб діагностики став не лише найефективнішим, але й найшвидшим, хоча і може уступати по вартості більш примітивним методам діагностики. Галузі використання даного методу майже необмежені, від перевірки наявності ДНК в зразку, до виявлення мутацій, або відмінностей в різних штаммах вірусів, чи різновидах бактерій. Однією з головних проблем, які можна вирішити використовуючи ПЛР в реальному часі, для діагностики туберкульозу, викликані мікроорганізмами *Mycobacterium tuberculosis*, це перевірки резистентності даної бактерії. А отже даний метод, який досить легко під-коригувати змінюючи деякі компоненти для поліпшення реакції та дитекції, можна використовувати ще довго і навряд чи знайдеться спосіб більш специфічний. Хоча можуть виникати і проблеми, адже однакові нуклеотидні послідовності можуть бути в різних збудниках. Тому важливим вибирати максимально специфічні частини генному.

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (real-time PCR) має декілька переваг і недоліків, які варто враховувати при його використанні:

Переваги ПЛР в реальному часі:

1. Кількісний аналіз: ПЛР в реальному часі дозволяє точно визначати кількість початкової ДНК або РНК у зразку. Це особливо корисно при виявленні і кількісному аналізі генетичних варіантів, вірусних навантажень або генів, пов'язаних з патологічними станами.
2. Висока чутливість: ПЛР в реальному часі може виявити навіть невеликі кількості генетичного матеріалу, що дозволяє виявляти рідкісні або слабо виявлені послідовності.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 14
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

3. Швидкість та ефективність: Реальний PCR проводиться в реальному часі, що дозволяє отримати результати швидко, без необхідності додаткових кроків, таких як електрофорез.
4. Мінімізація контамінації: В реальному часі PCR використовує запечатані реакційні системи, що допомагає уникнути контамінації зовнішніми ДНК або РНК. [21]

Недоліки ПЛР в реальному часі:

1. Вартість: Використання спеціалізованого обладнання та реагентів для ПЛР в реальному часі може бути вартим.
2. Операторські помилки: Вимірювання та аналіз флуоресцентного сигналу в реальному часі вимагає досвіду та правильного калібрування обладнання для отримання точних результатів.
3. Оптимізація: Для успішного використання ПЛР в реальному часі потрібно оптимізувати реакційні умов та протоколи, щоб досягти найкращої ефективності та надійності.
4. Вплив інгібіторів: Присутність інгібіторів в зразку може впливати на ефективність реакції ПЛР в реальному часі та точність отриманих результатів.

Враховуючи ці переваги та недоліки, ПЛР в реальному часі залишається потужним інструментом для кількісного аналізу генетичного матеріалу та застосування в різних галузях, включаючи медицину, науку та діагностику хвороб. Зважаючи на це RT-PCR є досить поширеним тестом в Україні та світі, проте як було зазначено всі виробники тримають в таємниці точний склад та концентрації своїх наборів для проведення ПЛР в реальному часі. Тому порівняти їх один з одним є неможливим. З огляду на це порівняння буде проводитись між діагностичними лабораторіями які проводять дану діагностику на туберкульоз. Для аналізу будуть наведені аналоги даної послуги, в різних лабораторіях України (див табл. 1.1.).

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 15
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 1.1. – Аналоги тест-системи на туберкульоз

Назва продукту	Виробник	Склад + та -
ПЛР. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (туберкульоз), якісне визначення (кров, плазма, ліквор) [23]	ТОВ «СІ ЕС ДІ ЛАБ»	Якісний аналіз, вартість 790 грн. Термін виконання 3 робочі дні
Туберкульоз, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , ДНК методом ПЛР – якісн . [32]	Лабораторія ДІЛА	Виявлення не лише <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , але й нетуберкульозних мікобактерій (НТМБ, non – tuberculosis). Вартість 955 грн
Аналіз на ПЛР Туберкульоз (плазвальна рідина), якісне дослідження. [22]	Лабораторія IQlab	Вартість 420 грн, термін виконання 5 робочих днів. Висока ефективність.
Та інші		

Майже 70% всіх лабораторій в країні мають послугу на виявлення туберкульозу методом ПЛР та головними їх недоліками є: або висока вартість дослідження, або довгий період дослідження. А діагностика методом RT-PCR. Як мінімум скорочує час виконання процедури, середній час від забору до отримання результатів в лабораторії може складати – 5 годин 30 хвилин. В цей час входить забір аналізу 15 хв. Час перевезення 1 годину, очікування відправки 1 год. 30 хв очікування перед перевезенням, виділення НК 40 хв, власне RT-PCR 1 год 50 хв, і з цього видно, що час до отримання результатів аналізу може бути скорочений мінімум до двох робочих днів, а то і до одного робочого дня. Також слід зазначити що чим біль стабільні та точні набори тим вони мають більший попи на ринку. І хоча зараз Українські тест-системи на виявлення резистентного туберкульозу майже не можуть перевершити аналоги європейського виробництва, проте не є гіршими за них. Тому системи, що зможуть швидко та ефективно виявляти *Mycobacterium tuberculosis* є доцільним.

Згідно з даними Центру громадського здоров'я, в Україні в 2022 році було зареєстровано 18 510 нових випадків туберкульозу, включаючи рецидиви. Це

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 16
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

становить 45,1 випадків на 100 000 населення, що на 2,5% більше, ніж у 2021 році, коли було 18 241 випадок або 44,0 на 100 000 населення. Захворюваність на туберкульоз серед дітей віком до 14 років залишилася на рівні 2021 року і становила 7,4 випадків на 100 000 дитячого населення (450 випадків). У підлітків віком від 15 до 17 років захворюваність на туберкульоз зменшилася на 17,6% з 12,5 до 10,3 випадків на 100 000 осіб (127 випадків). Захворюваність на активний туберкульоз у поєднанні з ВІЛ-інфекцією зменшилася з 6,5 до 6,1 випадків на 100 000 населення порівняно з 2021 роком (2 490 випадків). Кількість працівників закладів охорони здоров'я, які захворіли на туберкульоз, знизилася до 148 осіб в 2022 році (у 2021 році було 152 випадки). [31, 33, 34] І хоча статистика показує, що відсоток захворюваності зменшується Україна все ще входить в ТОП-20 країн в світі по захворюваності на туберкульоз, а відсоток одужуючих досить не високий, тому є дуже перспективним розробка тестів системи на резистентний туберкульоз. Дивлячись на статистику кількість потенційних споживачів приблизно 19 631 осіб по всій Україні. Якщо взяти одну окрему лабораторію наприклад в Києві то можна підрахувати з статистики та населення Києва на 2022 рік 1331, 4 осіб, але можна додати ще принаймні 1000 з огляду на те, що лікуватись часто їдуть в великі міста. Тоді отримаємо 2332 потенційних споживачів. З точки зору економіки не можна вважати, що всі споживачі прийдуть до тебе в лабораторію, або замовлять набори саме у тебе, тому можна взяти половину від цієї суми 1116 споживачів, а отже, наборів на рік.

Звісно відгадати чи буде спалах хвороби ми не можемо, і точно не можемо знати скільки з потенційних споживачів можуть скористатись саме запропонованою тест-системою тому розрахунки дуже приблизні та теоретичні, для більш точного аналізу потрібно провести опитування до дослідження якими саме тест-системами най частіше перевіряють захворювання на туберкульоз.

1.2. Характеристика біомедичного продукту та обґрунтування складу

Всі наведені, в цьому розділі, компоненти для набору для ПЛР у реальному

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 17
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

часі є необхідними, а випускається зазвичай у формі набору, з інструкцією, по постановці, та прикладу температурної програми, на яку треба налаштувати ампліфікатор. В набір входить як мінімум:

- Буфер для ПЛР MasterMix.
- Термостабільна Taq-полімераза, або інша полімераза яку використовує виробник
- Позитивний контроль, що містить синтетичний фрагмент цільової ДНК.
- Негативний контроль, який повністю позбавлений ДНК людний, та шуканого фрагменту.
- Інструкція по застосуванню.
- Прописана програма для налаштування ампліфікатора.

Формат упаковки може бути різним, головне щоб воно було герметично запаковано, для збереження цілісності, та зберігатися має при температурі - 20°C або при перевезенні в термо боксах або коробках.

Для створення набору для діагностики методом RT-PCR треба підготувати Буфер, або як його називають в деяких лабораторіях MasterMix концентрація та його склад частково є комерційною темницею, і вони відрізняються в кожного виробника, тому буде описаний так, щоб не порушувати її. Позитивний та негативний контролі, а також Taq-полімераза.

Отже MasterMix для RT-PCR є дуже важливим, адже кожна його складова конче необхідна. Основою його є система з гліцерину та солей, або Буфер. Його основна функція стабілізувати всі компоненти, підтримувати оптимальний рівень рН, та зберігати їх в робочому стані. Друга складова MasterMix це dNTP так би мовити цегла для ампліфікації.

Існує чотири типи dNTP, або дезоксинуклеотидтрифосфату, кожен з яких використовує різні основи ДНК: аденін (dATP), цитозин (dCTP), гуанін (dGTP) і тимін (dTTP). Використання dNTP під час фази подовження забезпечує одинарні основи, готові до вбудовування в ДНК і подвоєння її, наче будівельні блоки.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 18
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Основними характеристиками якими має володіти розчин dNTP – це чистота принаймні 99% відсутність ДНК людини та *Escherichia Coli*. Зберігати їх слід в замороженому стані або при температурі -20°C. Оскільки dNTP досить легко втрачають свою стабільність до їхнього буферу підходять досить ретельно головними його критеріями має бути: стабільність, певна рН, та чистота вихідних матеріалів, адже якщо вони розваляться або навпаки склеються подовження ДНК в ПЛР не відбудеться і дослід буде провальним. [2, 30]

Оскільки метою методу є синтез нової ДНК, dNTP забезпечує нуклеотидами "розпакований" ланцюг, використовуючи шаблон з одного боку. Це перетворює один ланцюг ДНК на два, і процес може тривати в геометричній прогресії, поки реагенти залишаються присутніми до кінцевої стадії утримування. [2]

Третя складова буферу це праймера, реверс, форвард, та проба, їх нуклеотидні послідовності є комерційною таємницею, але вони мають чітко відповідати, тому специфічному фрагменту, за яким можна визначити шуканий мікроорганізм або вірус. І тут дуже важливим є реверс адже він ціляється до 3' кінця та з нього починається елонгація. [17] Майже всі праймера бояться світла і швидко розпадаються, що може призвести до не достовірних реакцій на ПЛР або навіть повної їх відсутності. Саме для уникнень таких помилок є контролю позитивний та негативний.

Праймери для ПЛР – це короткі фрагменти одноланцюгової ДНК, зазвичай близько 20-30 нуклеотидів завдовжки. У кожній реакції ПЛР використовуються два праймери, і вони сконструйовані так, щоб фланкувати цільову ділянку (яку необхідно скопіювати). Таким чином, праймери являють собою послідовності, які зв'язуються з ланцюгами матричної ДНК точно по краях копійованої ділянки. Праймери зв'язуються з матрицею, утворюючи пари комплементарних основ. [24]

Четверта складова та не менш важлива є хлорид магнію, що є каталізатором для роботи Taq-полімерази. Хлорид магнію має відповідати стандарту ГОСТ 4209-77 ГОСТ 7759-73, і не мати додаткових домішок, адже най головніше в виробі набору для ПЛР це чистота та стабільність. [35]

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 19
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Тaq-полімераза є невід'ємною складовою, без якої неможлива ампліфікація, оскільки саме вона відповідає за додавання комплементарних пар. [16]

Тaq-полімераза є стійкою до високих температур і виникає у термофільних бактерій *Escherichia coli*. Її основна роль полягає у застосуванні в технології полімеразованої ланцюгової реакції (ПЛР), де вона автоматизує процес ампліфікації конкретних послідовностей ДНК. Завдяки ПЛР можна отримати мільярди копій ДНК-молекул, що дозволяє отримати значну кількість специфічних генів для подальшого використання в різних сферах. [16, 9]

Тaq-полімераза належить до родини ДНК-полімераз, відомої як родина А, яка використовується в ПЛР, а також родина В. Родина А включає Tth і Tma ДНК-полімерази, а також Таq, і має екзонуклеазну активність 5'-3', але зазвичай не має 3'-5' екзонуклеазної активності. На відміну від цього, ДНК-полімерази родини В, такі як Pfu, Kod і Tli, мають високу точність за рахунок 3'-5' екзонуклеазної активності, але не мають 5'-3' екзонуклеазної активності. Це дозволяє їм видаляти неправильно вбудовані нуклеотиди під час синтезу ДНК, забезпечуючи більшу точність порівняно з полімеразами родини А.

Тaq-полімераза проявляє значну ферментативну активність при 37°C, але оптимальна температура для її роботи знаходиться близько 72°C. Швидкість вбудовування нуклеотидів становить від двох до чотирьох кілобаз на хвилину. [9]

Проте робота при такій високій температурі може спричиняти неспецифічну ампліфікацію, яка виникає на початковій стадії ПЛР-реакції через помилкове зв'язування олігодезоксинуклеотидних праймерів з неспецифічними місцями на шаблонній ДНК перед першим етапом денатурації при 93-95°C. Це питання можна уникнути або зменшити, використовуючи термолабільний інгібітор, який блокує активність Таq-полімерази до її теплової інактивації. Таким чином, Таq-полімераза стає активною лише після руйнування інгібітора під час початкової денатурації ПЛР-реакції. Цей метод інгібування Таq-полімерази за допомогою антитіл дозволяє зберігати змішану реакційну суміш для ПЛР при кімнатній температурі, тим самим зменшуючи

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 20
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

неспецифічну ампліфікацію, що виникає внаслідок неправильного праймування.

Тaq-полімераза відділяють та зберігають окремо бо вона все ще не дуже стабільна, і потребує специфічних норм зберігання, тому її не можна додавати в основний буфер – MasterMix.

Всі компоненти для проведення ПЛР аналізу – знаходяться в рідкому агрегатному стані, крім хлориду магнію, який продається у вигляді гранул. А оскільки солі, що використовуються в MasterMix являються комерційною таємницею ми не можемо знати їх хімічні властивості, а отже і сам MasterMix хоч і є безперечно рідким, але його хімічний стан відомий лише його виробникам.

1.3. Біологічні основи отримання біомедичного продукту

1.3.1. Проведення аналізу на туберкульоз, методом ПЛР в реальному часі

Метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (real-time PCR, qPCR або RT-PCR, RT-qPCR) є молекулярно-діагностичним аналізом, який використовується для виявлення та кількісної оцінки ДНК або РНК в зразку. Цей метод дозволяє збільшувати кількість ДНК або РНК до значної кількості копій за допомогою спеціальних пристроїв, ампліфікаторів. Вони дозволяють одночасно визначати кількість ампліфікованої ДНК або РНК, що забезпечує швидке і точне виявлення присутності та кількості конкретної послідовності в зразку.

Цей метод широко використовується в медицині для діагностики вірусних та бактеріальних інфекцій, а також для туберкульозу. Для повного циклу RT-PCR діагностики потрібне не лише ампліфікаційне обладнання, але і спеціальне обладнання для виділення ДНК, яке є складним процесом, що вимагає відповідного обладнання.

При проведенні RT-PCR для виявлення туберкульозу, найпростіше взяти зразок мокротиння, якщо це можливо. Для виділення ДНК використовують такі реагенти, як лізуючий розчин, муколітики, магнітні частинки та протеаза. Для самої полімеразної реакції використовують буферний розчин (магній, ДНТП, праймери - реверс та форвард проба), деіонізовану воду та полімераза.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 21
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

1.3.2. Обладнання виділення ДНК з мокротиння за допомогою системи очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32

Для виділення ДНК або РНК можна використовувати різні методи її очистки. В даній роботі ми розглянемо, один з най економічно вигідніших методів, який використовує систему для очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32. Хоча більшість таких систем не відрізняються по методам очистки, вони мають різні характеристики економічні та власні. Даний прилад має наступні характеристики.

- Пропускна здатність: 1 – 32
- Робочий об'єм: 50 – 1000 мкл
- Принцип роботи: магнітні кульки
- Ефективність виділення: >95%
- СтабільністьCV: < 5%
- Рівень використання кульок: >95%
- Температура лізису ~ 120°C
- Температура елюції ~ 120°C
- Розмішування% методика може редагуватись
- Інтерфейс: 7” сенсорний дисплей, 3 кнопки швидкого доступу та мишка
- Вбудовані програми: до 100 протоколів можуть зберігатись
- Робота з протоколом: функції: Новий / Редагувати / Стерти / Зберегти
- Комунікація: USB, SD card
- Підсвітка: Є
- Деконтамінація: УФ-лампа
- Витяжка: вентилятор
- Зберігання даних: на вбудовану SD-карту
- Макс. спожив. потужність: 450 Вт
- Розміри: 40 см x 47 см x 45 см

Вага: 25 кг [27]

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						22
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		



*Рисунок 1.1. Принципова будова Системи для очищення нуклеїнової кислоти
Auto-Pure 32*

1 – корпус приладу; 2 – екран керування приладом; 3 – кнопки керування; 4 – дверцята до камери, де проводиться очищення.

Також для роботи приладу необхідні гребінці, що ставляться в пази у верхній частині камери, та глибокі планшети в лунках яких поміщаються реагенти та проходить реакція.

Принцип роботи даного приладу базується на основі магнітної сепарації [21]

Магнітне сепарування використовується для розділення неоднорідних сипких систем, визначаючи їх компоненти за їх магнітними властивостями. Цей метод використовується для вилучення металоманітних домішок з цих систем. [1]

Метод ґрунтується на додаванні змішаної біологічної проби до магнітних частинок, які мають на своєму поверхні спеціальні покриття з різним афінітетом до нуклеїнових кислот. Після цього, за допомогою магнітного поля, магнітні частинки з нуклеїновими кислотами притягуються до магнітного відокремлювача, розташованого поряд з реакційною сумішшю. Після вимкнення магнітного поля, магнітні частинки з нуклеїновими кислотами відділяються від інших компонентів реакційної суміші і можуть бути промиті та використані для подальших досліджень або аналізу. [21, 4]

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 23
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Цей метод має кілька переваг, таких як висока чистота та виходу продукту, швидкість і простота процедури, відсутність впливу на структуру і активність нуклеїнових кислот, а також можливість автоматизації та використання на велику кількість зразків. Однак, важливо зазначити, що вартість магнітних частинок може бути високою, а також є деякі обмеження щодо розміру та типу нуклеїнових кислот, які можуть бути виділені за допомогою цього методу. [21]

Процес роботи з цим типом обладнання можна описати наступним чином (див. рис. 1.2):

1. Лізис: Додається лізуючий буфер для руйнування клітин та вивільнення нуклеїнових кислот.

2. Абсорбція: Додаються магнітні частинки, які здатні зв'язувати нуклеїнові кислоти на своїй поверхні.

3. Промивання: Проводиться повторне промивання для видалення залишків клітинного матеріалу, білків та солей.

4. Елюювання: Магнітні частинки переносяться в спеціальний розчин для елюції, що сприяє звільненню нуклеїнових кислот і переходу їх у буферний розчин.

5. Рекультивація: Магнітні частинки видаляються, і зразок готовий для подальших досліджень або аналізу. [4]

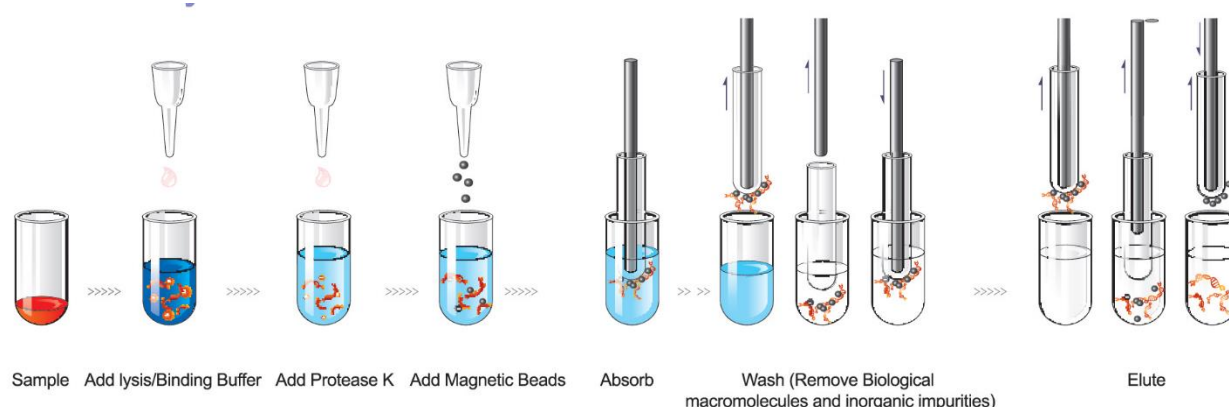


Рисунок 1.2. Порядок роботи системи очищення нуклеїнових кислот

1.3.3. Обладнання для проведення RT-qPCR Ампліфікатор CFX96 Touch

Для цього етапу використовують ампліфікаторі в дані роботі ті, що здатні у

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						24
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

режимі реального часу зчитувати кількість ДНК у зразках.

Ми розглянемо ампліфікатор виробництва США CFX96 Touch. Його технічні характеристики.

- Відкрита система: можливість використання тест-систем різних виробників
- Сумісність з роботизованими станціями пробоподготовки забезпечується автоматичним завантаженням приладу
- Програмне забезпечення CFX Manager TM може відправляти повідомлення про завершення реакції з прикріпленим файлом з отриманими даними на Ваш e-mail
- Формат блоку: 96 зразків / 384 зразка
- Тип пробірок: 96-ямковий планшет або пробірки по 0,2 мл (окремо або в стрипах) / 384-ямковий планшет
- Кількість каналів: 6
- Обсяг реакційної суміші 10-50 мкл
- Максимальна швидкість нагріву / охолодження: 5 °C / сек
- Діапазон температур: 0-100 °C: температурна точність: ± 0.2 °C; температурна однорідність: ± 0.4 °C через 10 сек після старту при 90 °C
- Середня швидкість: 3.3 °C / сек
- Діапазон градієнта: 30-100 °C
- Програмований нагрівання / охолодження реакційного модуля елементами Пельтьє: є
- Тип детекції флюоресценції: 6 високочутливих фотодіодів з фільтрами
- Тип порушення флюоресценції: 6 світлодіодів з фільтрами
- Діапазон збудження флюоресценції: 450-684 нм
- Діапазон детекції флюоресценції: 515-730 нм
- Реєстрація FRET: є
- Розміри (Д.Ш.В): 13.18.14 см

Вага: 21.4 кг [12]

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 25
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

На рисунку 1.3. представлена основна структура ампліфікатора CFX96 Touch. Ампліфікатор ДНК включає в себе внутрішню систему кришки з нагрівальним елементом і можливістю регулювання висоти, щоб забезпечити пристосування приладу до розмірів зразків. Це допомагає уникнути конденсації в верхній частині зразків. Ампліфікатор працює на основі системи нагрівання, яка отримує постійне живлення від джерела електричного струму. Вона складається з кількох термоелектричних модулів з ефектом Пельтьє, радіатора з низькими втратами тепла і системи вентиляторного охолодження. Усі ці елементи об'єднані в один блок. Це дозволяє підвищити продуктивність процесу і швидко змінювати температуру блоку від вищих до нижчих значень за мінімальний час. Кожен блок має коннектор, який ідентифікує блок і дозволяє ампліфікатору ДНК розпізнавати його. Контрольний мікропроцесор забезпечує моніторинг поточного стану процесу та відображає інформацію на дисплеї у реальному часі за допомогою графіків. Устаткування також має детально розроблене корисне програмне забезпечення, яке дозволяє керувати процесом за допомогою клавіатури та високо роздільного LCD-дисплея. Для зручності витягування блок має ручку. [11]

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						26
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		



Рисунок 1.3. Принципова будова ампліфікатора CFX96 Touch

1 – кришка з нагрівальним елементом; 2 – лінзи за якими знаходяться лазери сенсорної системи; 3 – блок для зразків (пробірок); 4 – дисплей ампліфікатора; 5 – корпус приладу.

Принцип роботи ампліфікатора. Ампліфікація ДНК в ампліфікаторі (ПЛР) базується на принципі реплікації ДНК в живих клітинах. Процес реплікації полягає в створенні точної копії молекули ДНК шляхом розщеплення подвійного спірального ланцюга на два одинарні ланки, які слугують темплейтами для синтезу нових ДНК-ланок.

Принцип реплікації ДНК в ампліфікаторі полягає в повторенні цього процесу у спеціальних умовах, за допомогою термоциклера, який може регулювати температуру для різних етапів реакції.

Ампліфікація ДНК починається з денатурації подвійної спіралі молекули ДНК при високій температурі, що призводить до розщеплення на дві одинарні ланки. Після цього примикають праймери, короткі нуклеотидні послідовності, які спрямовують синтез нових ланок ДНК. Праймери приєднуються до кінців

одинарних ланок ДНК в етапі відпалу, який здійснюється при зниженні температури.

Після того, як праймери приєдналися до темплейтів, до системи додається ДНК-полімераза, яка дозволяє синтезувати нові ланки ДНК на основі темплейтів і праймерів. Для цього необхідна температура, що забезпечує оптимальні умови для роботи ДНК-полімерази.

Після закінчення цього циклу, нові ланки ДНК можуть бути використані як темплейти для наступних циклів ампліфікації, і процес повторюється декілька разів до отримання достатньої кількості ампліфікацій, зазвичай десь 30-35 ампліфікацій. При кожному наступному циклі збільшення вмісту ДНК зростає геометричній прогресії. [27, 21]

Висновки:

Перший розділ дипломного проекту присвячений огляду методик та обладнання, яке використовується при проведенні аналізів на виявлення туберкульозу.

З наведених даних, видно що переваги застосування даного методу діагностики набагато перевищують його недоліки, і якщо його проводити у повній відповідності до встановлених методик то результат буде максимально достовірним. Адже немає таких істот в світі, які б могли міняти свою ДНК, або РНК повністю, щоб їх не розпізнав даний аналіз. Тим паче за допомогою даного методу, можна не тільки виявити наявність бактерій в зразку але й розрахувати їх початкову кількість. Та при більш складній системі з використанням буферу MasterMix можна також визначити резистентність до певних антибіотиків, та мутації в генах.

Можна зазначити, що потенціал даної методики дослідження для всіх видів патогенних захворювань досить великий, хоча методика ще досить молода але вона вже зарекомендувала себе на світовому рівні.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 28
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

У сфері сучасної медичної діагностики існує широкий спектр видів ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), які використовуються в різних випадках залежно від зразка, цілей дослідження та його складності. Загалом існує приблизно 10 різних видів ПЛР, зокрема:

1. ПЛР-ПДРФ (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) – спочатку проводиться ПЛР, а потім рестрикція отриманого продукту.
2. ПЛР у реальному часі (Real-time PCR; RT-PCR) – спостереження за реакцією у реальному часі та кількісне визначення ДНК/РНК без електрофорезу.
3. ПЛР з використанням зворотної транскрипції (RT-PCR, Reverse Transcription PCR) – перетворення РНК на ДНК перед проведенням ПЛР.
4. Вкладена ПЛР (Nested PCR) – послідовна ампліфікація двома парами праймерів для зменшення небажаних побічних продуктів.
5. Інвертована ПЛР (Inverse PCR) – використання для визначення фланкуючих послідовностей після вставки ДНК в геном.
6. Асиметрична ПЛР (Asymmetric PCR) – ампліфікація одного зі страндів початкової ДНК.
7. ПЛР довгих фрагментів (Long-range PCR) – ампліфікація довгих ділянок ДНК.
8. Мультиплексна ПЛР (Multiplex PCR) – одночасна ампліфікація кількох фрагментів за допомогою декількох пар праймерів. [27]

Проведення ПЛР (полімеразована ланцюгова реакція) включає кілька етапів. Спочатку виконується підготовка реакційної суміші, включаючи збирання всіх необхідних компонентів, таких як ДНК-шаблон, праймери, нуклеотиди, фермент ДНК-полімераза і буферний розчин. Після цього реакційна суміш піддається денатурації, при якій подвійний ланцюг ДНК розщеплюється на окремі нитки. Наступним етапом є аннелінг, коли праймери зв'язуються зі специфічними

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 29
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

послідовностями на нитках ДНК. Після аннелінгу відбувається полімеризація, де ДНК-полімераза додає нуклеотиди до праймерів і синтезує нові ланцюги ДНК. Весь цикл денатурації, аннелінгу та полімеризації повторюється декілька разів для збільшення кількості ампліфікованої ДНК. Окрім проведення самого дослідження, важливо правильно підібрати всі компоненти, створити буфер та якісно виділити нуклеїнові кислоти зі зразка хвороби. [21]

2.1. Обґрунтування вибору технології виготовлення

2.1.1. Проведення аналізу на туберкульоз методом ПЛР в реальному часі

Для діагностики туберкульозу існує досить широкий набір лабораторних тестів таких як: мікроскопія, фенотипічні методи, генотипічні методи, метод фагової ампліфікації, та інші [7]

Знедавна одним з най популярніших методів лабораторних аналізів на туберкульоз став ПЛР в реальному часі, і не тільки через його високу ефективність, чутливість та універсальність, але й через його швидкість та зручність. [17] І хоча він може уступати по вартості дослідження іншим давно відомим методам, проте в даному методі також знижений ризик зараження, та витрачається менше людських ресурсів, адже більшість етапів можна провести за допомогою приладів, таких як система очищення нуклеїнових кислот та ампліфікатор. [17, 3]

Аналіз RT-PCR зазвичай використовується для визначення наявності ДНК або послідовності МТБ (*Mycobacterium tuberculosis*) у зразку і виявляє ампліфіковану ДНК у міру протікання реакції в режимі реального часу. Він відстежує ампліфікацію цільової молекули ДНК/РНК під час ампліфікації ПЛР з використанням комплементарних праймерів, тобто в режимі реального часу, а не в кінці реакції, як у звичайній ПЛР. В аналізі RT-qPCR використовуються мічені зонди з флуорофорами, які випромінюють флуоресценцію паралельно з ампліфікацією. Цикл протоколу ПЛР, в якому з'являється значна флуоресценція, пропорційний кількості ДНК/РНК, присутньої в зразку. Ця величина називається

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 30
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

порогом циклу (П ц) або кількісним визначенням циклу (К ц). RT-qPCR є чутливим, специфічним і відтворюваним методом, а автоматизація процедури скорочує час на виконання роботи і зменшує ризик перехресної контамінації. [3]

Доведено, що методи, засновані на RT-qPCR, виявляють МБТ з вищою чутливістю та специфічністю безпосередньо з позитивних культур або клінічних зразків протягом 2 годин. Для цього потрібно приблизно 6 копій/мл ДНК МБТ порівняно з мікроскопією мазка, яка вимагає 5000-10 000 бацил/мл. Для концентрованих зразків, таких як мокротиння, чутливість мікроскопії мазка збільшується до 39%. Для отримання позитивного результату посіву, який є референтним стандартом, потрібно щонайменше 100 життєздатних бактерій, а час обороту культури становить від 2 до 10 тижнів. Таким чином, для адекватного лікування та ефективного контролю МТБ існує потреба в ефективній, швидкій та точній діагностиці. [3]

В загалом цикл проведення даного аналізу не дуже великий, від забору зразку, є всього три етапи, первинна обробка зразку, залежить від матеріалу по якому буде проведений аналіз, далі іде виділення (очистка) ДНК з клітин, і останній етап власне RT-qPCR діагностика, яка одразу дає результати дослідження.

2.1.2. Попередня обробка зразку.

Проводити ПЛР аналіз можна по багатьом біологічним зразкам, але в даній роботі ми розглядаємо мокротиння, як зразок для аналізу.

Для попередньої обробки слизу наприклад спутолізін, який призначений для виділення епітеліальних клітин, патогенних або сапрофітних бактерій, грибів і дріжджів з мокротиння, що містить в собі дитиотреїтолу також можна використовувати, або лізоцим чи лізостафін. Адже не було виявлено суттєвих відмінностей в якості проведеного після цього аналізів, хоча і дитиотреїтил виявився дещо більш ефективним та референтним. [5] Тому слід додати до зразку слизу одного з представлених муколітиків в співвідношенні 1:1

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 31
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

2.1.3. Очистка ДНК

Після попередньої обробки зразку переходимо до очистки ДНК. Беремо зразок буфер, що зазвичай складається з лікуючого розчину, протиаз, в планшет глибоко луночний додають в перший ряд лунок буфер в другий та зразки в другий магнітні часточки в спеціальному буфері, водять програму на дисплеї і тоді проходять наступні реакції

Розділення нуклеїнових кислот стає все більш важливим інструментом молекулярної біології. До появи сучасних технологій розділення нуклеїнових кислот було трудомістким процесом, що включав кілька етапів екстракції та центрифугування, часто обмежувався невеликими виходами і низькою чистотою продуктів розділення, а також не був пристосований для автоматизації та масштабування. Протягом останніх кількох років були розроблені спеціально функціоналізовані магнітні частинки. [8]

Виділення ДНК за допомогою магнітних кульок є популярним та ефективним методом. Нижче описано загальну процедуру виділення ДНК за допомогою магнітних кульок:

Відбір зразка: Зразок ДНК збирають і лізують за допомогою відповідного буфера, щоб вивільнити ДНК з клітин.

Зв'язування ДНК з магнітними кульками: Магнітні кульки, покриті поверхнево функціоналізованим агентом, таким як кремнезем або парамагнітні кульки, додають до лізату. Кульки зв'язуються з ДНК за допомогою іонних або ван-дер-ваальсових взаємодій. [8]

Відокремлення бісеру від домішок: Комплекс бісер-ДНК відокремлюють від решти зразка за допомогою магнітного поля. Забруднюючі речовини вимиваються промивним буфером, в той час як ДНК-зв'язані намистини залишаються. [8]

Елюювання ДНК: ДНК елюється з бісеру за допомогою елюючого буфера, який руйнує взаємодію ДНК з бісером. Після цього ДНК можна використовувати для подальших досліджень, таких як ПЛР, секвенування або генотипування.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 32
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Загалом, виділення ДНК за допомогою магнітних кульок – це простий і швидкий метод, який дозволяє отримати високоякісну ДНК, придатну для різних застосувань. [8]

2.1.4. Власне RT-qPCR

На даному етапі найголовнішим критерієм є точність та надійність. При лабораторних дослідженнях найчастіше закупають різні набори для ампліфікації ДНК, але кожен набір має мати буфер, склад якого зазвичай засекречений, і унікальний для кожного виробника, праймери що теж мають запатентовані послідовності пептидів, тому їх склад не доступний в спільному доступі. Але з академічних джерел можна знайти такі відомості про праймери.

Праймери – штучно синтезовані олігонуклеотиди, що мають, як правило як правило, розмір від 15 до 30 нуклеотидів, ідентичні (комплементарні) протилежним кінцям протилежних ланцюгів шуканої ділянки ДНК-мішені. Слугують затравкою для синтезу комплементарного ланцюга за допомогою ДНК-полімерази і відіграють ключову роль в утворенні та накопиченні продуктів реакції ампліфікації. [1, 21]

Правильно підібрані праймери забезпечують специфічність і чутливість тест-системи та мають відповідати низці критеріїв:

- бути специфічними. Особливу увагу приділяють 3'-кінцям праймерів, оскільки саме з них Таq-полімераза починає добудовувати комплементарний ланцюг ДНК. За недостатньої специфічності праймерів у процесі ПЛР будуть утворюватимуться продукти, які, з одного боку, можуть бути ідентифіковані як хибнопозитивний результат, а з іншого боку, на процеси їх накопичення витрачатимуться компоненти реакційної суміші, що призведе до значної втрати чутливості реакції як такої;
- не повинні утворювати димери та петлі – стійкі подвійні ланцюги – при відпалюванні праймерів.

- при відпалі праймерів самих на себе або один з одним;
- область відпалу праймерів повинна знаходитися поза зонами мутацій, делецій або інсерцій у межах видової чи іншої специфічності, взятої як критерієм при виборі праймерів. При потраплянні в таку зону не відбувається відпалу праймерів і, як наслідок, виникає хибнонегативний результат. [2]

Не менш важливим компонентом є Taq-полімераза без якої не відбудеться ампліфікація, адже це фермент який каталізує дану реакцію. Потреба у використанні та напрацюванні саме Taq-полімерази зумовлена більшою швидкістю та термічною резистентністю в порівнянні з деякими іншими типами полімераз.

Також потрібно підібрати. Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ) і дезокситимідинтрифосфат (дТТФ) – будівельний матеріал, який використовується Taq-полімеразою для синтезу другого ланцюга ДНК.

Буфер – суміш катіонів та аніонів у певній концентрації, що забезпечує оптимальні умови для реакції, а також стабільне значення рН. [2]

В ампліфікаторі всі перераховані компоненти ставляться в одній епіндорфі в концентрації що залежить від виробника набору для ампліфікації, а також окремо ставляться дві пробірки з негативним та позитивним контролем, в яких замість зразку додають перевірені матеріали в яких є специфічна послідовність яку шукають та немає такої, для порівняння, та запускається цикл ампліфікації, що в середньому містить 35-40 повторів циклу, приблизно на 25 циклі на екрані можна побачити явно зростаючу криву, що і буде свідчити про позитивний результат. Сама ампліфікація відбувається:

Перший етап ПЛР — це денатурація зразка ДНК шляхом витримувannya його при температурі 94–95 °С. Крім ДНК, у реакційній суміші мають бути в надлишку два праймери, термостабільна ДНК-полімераза Taq

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 34
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

(виділена із *Thermus Aquaticus*) і чотири дезоксирибонуклеотиди. [7]

Другий етап ПЛР — ренатурація ДНК, яка відбувається за зниженої температури 50– 60 °С. За ренатурації відбувається відпал праймерів, а саме вони гібридизуються з комплементарними послідовностями ДНК (розпавленої ДНК-матриці) з утворенням коротких дволанцюгових ДНК-фрагментів, які необхідні для початку роботи ензиму полімерази. Кожен із праймерів гібридизується на одному з двох ланцюгів ДНК-матриці таким чином, щоб кінці праймерів, які здатні видовжуватися були спрямовані назустріч один одному. Приєднавшись до протилежних ланцюгів молекули ДНК, праймери обмежують собою ту її ділянку, яка в подальшому буде багатократно подвоєна (ампліфікована). Довжина такого фрагменту, що називається ампліконом, зазвичай складає декілька сотень нуклеотидів.

Третій етап ПЛР — синтез фрагмента комплементарного дочірнього ланцюга ДНК (за 70–72 °С, тобто оптимальної температури для активності ДНК-полімерази Taq). У якості будівельного матеріалу використовують чотири дезоксинуклеотидтрифосфати, що знаходяться в суміші. Синтез фрагментів дочірніх ланцюгів ДНК відбувається одночасно на обох ланцюгах материнської ДНК. Далі цикл повторюється знову. [7]

2.2. Опис технології виготовлення

В даному розділі будуть наведені та прописані всі етапи технології виготовлення виробу для проведення ПЛР тест-системи RT-qPCR. А також для можливого створення лабораторії по її виготовленню.

Технологічна схема проведення ПЛР аналізу на резистентний туберкульоз, в режимі реального часу наведена в графічній частині проекту БФ9114.23.30.002 ТС [28]

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

Процес санітарної підготовки виробництва включає наступні кроки:

- Навчання персоналу.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 35
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

- Приготування виробничих приміщень.
- Підготовка комунікаційного обладнання.
- Підготовка дезінфікуючих розчинів.

Перед початком роботи проводиться огляд та підготовка всього обладнання для здійснення технологічного процесу відповідно до вимог регламенту. [28]

ДР 1.1 Підготування робочих розчинів

До процесу підготовки робочих розчинів входить зазначення миючих та дезінфікуючих засобів. Всі мийні, дезінфікуючі розчини і суміші готує блок стерилізації або спеціально призначений співробітник згідно з наказом цехового начальника, ділянки або підрозділу. [28]

ДР 1.1.1 Приготування миючого розчину

Для здійснення миття та дезінфекції обладнання використовується розчин каустичної соди з концентрацією 2%. Для приготування 1 літра такого розчину необхідно взяти приблизно 20 г сухої каустичної соди і додати приблизно 980 мл води. Готовий розчин слід зберігати у герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці. [28]

ДР 1.1.2 Приготування дезінфікуючого розчину

Рецептуру "С4" готують шляхом змішування водню перекису з мурашиною кислотою у скляному посуді. Мурашину кислоту попередньо поміщають у холодну воду на 1 або 1,5 години і періодично струшують. Зберігають 3% розчин рецептури "С4" протягом не більше 1 доби в герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці.

«Дезоксон-1», що містить надощтову кислоту, має потужні бактерицидні, фунгіцидні та спороцидні властивості і використовується для дезінфекції рук. "Дезоксон-1" закуповується та зберігається на складі. Він розведений водою до необхідної концентрації.

Санітарна обробка "чистих" зон проводиться відповідно до письмової програми. Під час дезінфекції використовуються різні типи дезінфікуючих розчинів. Деякі з відомих розчинів, що застосовуються, включають:

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 36
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

- Розчин перекису водню (3%, 6%);
- Розчин "Гембар" (5%). [28]

Для обробки приміщень використовують розчини перекису водню. Розчини перекису водню з концентрацією 1-6% мають бактерицидні властивості, не є токсичними для людей. Вони не мають неприємного запаху, не корозійні для металевих поверхонь і не пошкоджують оброблювані предмети. Бактерицидна активність робочих розчинів зростає зі збільшенням їхньої температури.

Приготування робочого розчину перекису водню має здійснювати майстер зміни або під його наглядом призначений працівник. Розчин слід готувати в чистому посуді (скляному або емальованому) шляхом розведення перекису водню водою. Робочий розчин можна зберігати протягом 5-6 днів.

Гембар (концентрат з 25%), який розводять водою до потрібної концентрації (0,1-0,5%), закупається та зберігається на складі. Він використовується для дезінфекції поверхонь, посуду, санітарно-технічного та медичного обладнання. [28]

Підготовку обладнання слід проводити відповідно до Генеральної СОП 19-04-09 "Підготовка та обробка технологічного обладнання", Генеральної СОП 21-03-05 "Підготовка технологічного інструменту до роботи у виробничих приміщеннях" і СОП 04-05-13 "Підготовка технологічних ємностей в цеху органопрепаратів та очних крапель".

Контроль мікробіологічної чистоти поверхонь обладнання та інвентарю проводить працівник ВКЯ згідно з Генеральною СОП 20-06-10 "Контроль мікробіологічної чистоти поверхонь обладнання та інвентарю".

Розчин етилового спирту 96% постачається підприємством у готовому вигляді. Його розбавляють водою до концентрації 76%. Цей розчин можна зберігати в герметично закритій скляній посудині протягом 1 місяця. Для однієї обробки потрібно використовувати 5 мл етилового спирту 76%. [28]

ДР 1.2. Підготовка персоналу

При прийомі на роботу і щорічно працівники, які працюють в аналітичних

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 37
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

лабораторіях та процедурних кабінетах у лікарнях та клініках, повинні пройти медичний огляд, проходити регулярне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог та дотримуватися правил особистої гігієни. [28]

Кожен працівник аналітичної мікробіологічної лабораторії повинен мати 4 комплекти санітарного одягу, який потрібно замінювати щоденно або при забрудненні. Перед початком роботи працівники повинні одягати чистий санітарний одяг, закривати волосся хусткою або ковпаком, знімати прикраси, очищати нігті від лаку, ретельно мити руки теплою водою з милом та дезінфікувати їх.

Кожен працівник лабораторії несе відповідальність за дотримання правил особистої гігієни, стан свого робочого місця, а також виконання технологічних і санітарних вимог на своєму робочому місці. [28]

ДР 1.2.1 Навчання персоналу

Навчання персоналу поділяється на дві групи:

1. Навчання на робочому місці (внутрішньовиробниче):

- Лабораторний інструктаж.
- Ротація, що передбачає зміну робочих місць з метою набуття досвіду.
- Направлене придбання досвіду через наставництво, наставництво-супервізію.
- Ситуаційне наставництво, формальне та неформальне наставництво.
- Коучинг.
- Стажування.
- Використання працівників як асистентів.
- Підготовка у проектних групах.

2. Навчання поза робочим місцем (поза лабораторне): [20]

- Лекції.
- Ділові ігри та інсценування.
- Тренінги.
- Вирішення практичних ситуацій (кейсів).

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 38
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

- Вирішення виробничо-економічних проблем за допомогою моделей.
- Робочі групи.
- Конференції, семінари, круглі столи, дискусії.
- Зустрічі з керівництвом.
- Екскурсії.
- Самостійне навчання.

Також існують методи навчання, які поєднують аспекти внутрішньовиробничого та поза лабораторного навчання: [20]

- Емпіричне навчання.
- Демонстрація та практика під керівництвом.
- Програмовані курси.
- Навчання дією.
- Навчання за допомогою комп'ютера.

Використовуючи комбінацію наведених методів, можна підтримувати та стимулювати розвиток кожного працівника окремо та підприємства в цілому. [20]

ДР 1.2.2 *Забезпечення належного санітарного стану персоналу*

1. При прийнятті на роботу, персонал повинен пройти медичний огляд відповідно до Положення про порядок проведення медичних оглядів працівників певних категорій, затвердженого наказом Міністерства охорони здоров'я України №45 (з0136-94) від 31.03.94 року. Персонал, який працює безпосередньо у виробництві, включаючи тимчасових працівників, регулярно проходить медичні огляди. [26]

2. У роботі, пов'язаній з проведенням аналізів у лабораторії та забиранням матеріалів у процедурному кабінеті, не допускається особи з інфекційними захворюваннями, відкритими ранами на шкірі або носіями патогенної мікрофлори, поки їх стан здоров'я не нормалізується. Персонал повинен повідомляти свого керівника про будь-які симптоми захворювання, які можуть вплинути на результати досліджень або становити загрозу для пацієнтів у процедурному кабінеті. [26]

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						39
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

3. Осіб, які мають специфічну шкіру, хронічний кашель або алергію на матеріали та предмети, що використовуються у виробництві (одяг з текстильних матеріалів, хімічні речовини, мийні і дезінфекційні засоби, вироби тощо), не рекомендується залучати до роботи у методі дослідження ПЛР аналізу на туберкульоз через можливе додаткове забруднення робочої зони цими особами.

4. Перед трудовим прийняттям персонал, який бере участь у виробництві, повинен отримати навчання з правил особистої гігієни, а потім систематично проходити санітарно-гігієнічне навчання та строго дотримуватися гігієнічних вимог, що відповідають його роботі. [26]

5. Персонал повинен регулярно приймати душ, мити голову не рідше двох разів на тиждень та особливо дбайливо дотримуватися чистоти рук. Заборонено мати довгі нігті, оскільки неможливо належним чином очистити простір під нігтями. Накривання нігтів лаком не допускається. [26]

ДР 1.3 Підготовка приміщень

ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

Для щоденного прибирання приміщень рекомендується використовувати розчин, що складається з 3% перекису водню та миючого засобу. Стіни, двері та інші поверхні приміщення слід протирати за допомогою поролонової губки, насиченої цим розчином. Після цього розчин можна використати для миття підлоги. [28]

1.3.2 Генеральне прибирання

Поверхні, такі як стіни, двері, стеля та інші, можна обробити спеціальним розчином Гембар, використовуючи гідропульт. Рекомендована концентрація розчину становить 0,2% і розраховується з об'ємом 150-200 мл на літр води. Після розпилення розчину на поверхні приміщення рекомендується закрити його на період 30-40 хвилин, а потім видалити залишки розчину за допомогою губки. У разі особливо забруднених ділянок можна провести додаткове миття цим самим розчином. [28]

ДР 1.4 Підготовка робочого одягу

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 40
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Кожен працівник має мати 4 стерильних лабораторних халатів білого кольору. Захисні рукавички гумові або пластикові, змінне стерильне взуття та захист голови шапкою або косинкою, а також ризикну для волосся якщо воно довге. [28]

ДР 2 Підготовка інструментів

Обладнання дезінфікуються з використанням дезінфікуючих розчинів, таких як етиловий спирт з концентрацією 76% та розчин неоформу з концентрацією 5%. Це застосовується для інструментів, які використовуються повторно. [25]

Усі інструменти, які безпосередньо контактують з біологічним матеріалом або організмом людини, повинні бути одноразовими. Крім того, на піпетках варто мати змінні наконечники, щоб уникнути змішування реагентів, і ці наконечники мають бути замінювані кожного разу при зміні реагенту.

ДР 2.1 Інструменти для забору аналізу

Обладнання піддається дезінфекції за допомогою дезінфікуючих розчинів, таких як етиловий спирт з концентрацією 76% та розчин неоформу з концентрацією 5%. Це стосується таких предметів, як стіл в кабінеті, процедурний стілець, мийка, урна для використаних інструментів та інше обладнання. [25]

Всі інструменти, які прямо контактують з біологічним матеріалом або організмом людини, повинні бути одноразовими. Їх закупають від різних виробників і проводять необхідний аналіз на стерильність. Серед цих інструментів можуть бути контейнери для зберігання аналізу, шприці, голки, лопатки для пробірок, рукавички та маски для персоналу. Необов'язково закуповувати їх від одного виробника. [25]

ДР 2.2. Інструменти для лабораторії

Обладнання дезінфікується за допомогою дезінфікуючих розчинів, зокрема етилового спирту з концентрацією 76% та розчину неоформу з концентрацією 5%.

Всі інструменти, що прямо контактують з біологічним матеріалом або

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 41
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

організмом людини, повинні бути одноразовими. Їх закупають від виробників та проводять аналіз на стерильність за потреби. До таких інструментів входять змінні наконечники для автоматичних піпеток та пробірки. [25]

ДР 3 Підготовка деіонізованої води

Підготовка деіонізованої води, або ін'єкційної води як її ще називають, відбувається наступним чином. Забір води здійснюється з міського трубопроводу. [16]

ДР 3.1 Очищення від механічних домішок

Фільтрування, за допомогою фільтру Aquagum IRB – 1054 RX Знезалізнювач води. Принцип роботи: Установки знезалізнення IRB – це класичні безреагентные фільтри. Фільтруючий матеріал – Сорбент АС. Це фільтрат колоного типу, тому сорбент АС заповнює весь простір фільтру. [16]

ДР 3.2 Пом'якшення

Фільтр мішечний, складається з корпусу та декількох мембран які не пропускають частки різної величини вода проходить через фільтрувальний мішок, та інші просіваючи пристрої при цьому частинки сторонніх речовин залишаються на стінках фільтр-мішка. Поверхня фільтрувальних мішків являють собою сітку з порами різного діаметру. Розмір частинок, що утримуються, зумовлений пористістю мішечних картриджів яка для даного рівня очистки має становити 1 мкм. [16]

ДР 3.3 Де мінералізація зворотній осмос.

Вода після очищення на фільтрах грубого очищення потрапляє до установки зворотнього осмосу, яка забезпечує високоефективне видалення з води великої частини розчинних солей. Для перебігу процесу необхідно створити надлишковий тиск (тиск, вищий за осмотичний) для примусового фільтрування води крізь мембрану. [16]

Величина осмотичного тиску прямо пропорційна до концентрації розчинених речовин та абсолютної температури (температури за шкалою Кельвіна). Для прісної води, що містить солей 0,5 – 1,0 г/л,

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						42
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

осмотичний тиск дорівнює 2 – 3 МПа

ДР 3.4 Електродеіонізація

Електродеіонізація – це метод глибокого очищення води. Як джерело енергії вона використовує постійний електричний струм. Принцип роботи електродеіонізатора побудований на одночасному протіканні таких процесів:

Під дією постійного електричного поля іони металів і кислотних залишків рухаються до електродів з протилежним зарядом і через іонселективні мембрани відводяться в зону концентрату. [16]

ДР 3.5 Демінералізація ФСД

Реагентні ФСД (Н і ОН фільтри) – це послідовно встановлені катіонітовий фільтр і аніонітовий фільтр. За технологією та комплектацією фільтри аніонітні та катіонітні однакові, єдина відмінність полягає в дії іонообмінної смоли.

На фільтруванні води через смолу іонообмінну аніоніт/катіоніт. Фільтрація в Н катіонітових і ОН аніонітових фільтрах здійснюється в напірному корпусі від верху до низу. Під час проходження певного об'єму води, обмінна ємність смоли зменшується і необхідно провести регенерацію фільтра. Регенерація здійснюється автоматично за сигналом від керуючого клапана. Після проходження регенерації фільтр змішаної дії ФСД готовий до роботи. [16]

Іонний обмін. Простір між мембранами заповнений сумішшю катіонітів і аніонітів. Іони розчинених у воді солей поглинаються іонообмінною смолою, тобто заміщуються аніонами гідроксилу і катіонами водню.

Регенерація. Під дією електричного струму дисоційована вода відновлює обмінну здатність смол. [16]

Далі вода використовується в роботі.

ТП 1 Забір аналізу

Виконання процедур в процедурному кабінеті здійснюється відповідно до умов, визначених у наказі МОЗ України від 30.07.2013 року № 662 "Про затвердження Методичних рекомендацій щодо порядку забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						43
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

реакції". Для проведення тестування методом ПЛР в даній роботі використовують мокротиння пацієнта, оскільки при резистентному туберкульозі легень бактерії точно мають бути в мокротинні, інакше туберкульоз в пацієнта може бути не легеневої, а іншого виду. Після забору аналізу, його надсилають до лабораторії для проведення діагностики. [10]

ТП 2 Зберігання

Зберігання при транспортуванні проводиться з виконанням умов за наказом МОЗ України 30.07.2013 № 662 Про затвердження Методичних рекомендацій "Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції" [10]

Його перевозять у спеціальних контейнерах.

ТП 3 Виділення ДНК

Для виділення НК методом магнітних часток, закупають спеціальні набори від різних фірм, в залежності від потреб та складу набору. Хімічний склад таких наборів є комерційною таємницею. Тому можна вибрати будь-який набір і склад його буде однаковий. Кожен набір містить лізуючий буфер, магнітні часточки, промивочний буфер, елюційний буфер. І оскільки виділення в роботі відбувається з мокротиння, то має бути попередня обробка зразку. Зазвичай вона проводиться в кабінеті де проходить забір матеріалу, але якщо цього не відбулося, то треба додати до зразку, в пропорції (приблизній) 1:5 (зразок : муколітик), муколітик, також їх є велика кількість та їх властивості приблизно однакові, тому не важливо який використовувати. [6]

ТП 3.1 Підготовка планшету

Планшет з глибокими лунками Sente-Lab Ukraine плашка, з квадратними лунками 2,2 мл, на 96 місць, U-дно, дістають з упаковки та ставлять під ламінарну шафу. Якщо є підозра на забруднення планшету сторонніми бактеріями його слід потримати під ультрафіолетовим випромінюванням 10 хв, і тільки потім почати вносити реагенти. Лунки в планшеті пронумеровані. [6]

ТП 3.2. Додавання магнітних часток та лізуючого буферу до планшету

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 44
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Перед внесенням магнітних часток їх треба розвести в лізуючому буфері в пропорції 1:4. 1 лізуючого буферу : 4 магнітних часток. Але перед забором магнітних часток їх треба ретельно провортекстувати, щоб вони рівномірно розчинились в їх власному рідкому середовищі, дисцильованій воді. Після того як часточки розвели в лізуючому буфері їх додають по 400 мкл в 2-і та 8-мі стовпчики планшету. Або в інші залежно від програми приладу для виділення. [6]

ТП 3.3. Додавання промивного буферу до планшету

Далі в планет вносять по 700 мкл промивного буферу в 4-ті та 10-ті стовпчики планету. Всі маніпуляції робляться під ламінаром в рукавичках, рукавах та халаті. [6]

ТП 3.4. Додавання елюційного буферу до планшету

Далі в 6-ті та 12-ті стовпчики планшету додають елюційний буфер по 100 мкл в кожен лунку.

ТП 3.5. Виділення ДНК в Auto-Pure 32

Після заповнення всіх лунок планшету до магнітних часток з лізуючим буфером додають по 100 мкл провортексованих зразків.

Важливо щоб перед початком виділення НК апарат в Auto-Pure 32 був оброблений ультрафіолетовим випромінюванням не менше 30 хв для уникнення забруднення зразків іншими НК. Коли все готове планшет встановлюється в Auto-Pure 32. Далі в спеціальні пази вставляються гребінки для глибоко лункових планшетів, і запускається програма, для виділення НК. Вона може тривати різну кількість часу залежно від протоколу проведення, але не менше 15 хв. [6]

Після закінчення виділення планшет знову переносять під ламінар, та відбирають з лунок, де був елюційний буфер, зразки які мають містити виділені НК, їх переносять в стерильні епіндорфи на 0,2 мл. Та несуть на постановку ПЛР, або на зберігання при – 20 °С. В такому стані вони можуть зберігатись досить довго приблизно 1 тиждень. [6]

ТП 4 Ампліфікація

Для досягнення високої якості ампліфікаційної реакції (забезпечення

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 45
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

потрібної чутливості, специфічності та репродуктивності) рекомендується використовувати програмовані ампліфікатори (термостати) з такими основними параметрами: [3]

- швидкість нагрівання не менше 2,0 градусів Цельсія за секунду в діапазоні температур від 40 до 97 градусів Цельсія;
- швидкість охолодження не менше 2,0 градусів Цельсія за секунду в діапазоні температур від 50 до 97 градусів Цельсія;
- об'єм пробірок від 0,5 до 0,6 кубічних сантиметрів.

На даний момент ампліфікатори, такі як "Mastercycler 5330 plus" (Eppendorf, Німеччина), "Progen" (Techne, Великобританія) або еквівалентні моделі, відповідають цим параметрам.

ТП 4.1 Підготовка контролів

Для проведення ампліфікації потрібні такі реагенти, буфер для ПЛР, Таq-полімераза (термостабільна полімераза), виділені НК та контрольні зразки.

Таq-полімеразу треба розвести в буфері 1 до 10. Стріпи по 0,2 мкл умовно ділять на дві частини контролі та зразки, позитивний та негативний контролі. У всі пробірки додають по 15 мкл Таq-полімеразу + буфер, потім в якість пробірки вносять позитивний контроль по 5 мкл, дуже обережно щоб уникнути контамінації. А в деякі вносять негативний контроль теж по 5 мкл. Перед внесенням контролів їх треба про центрифугувати. [3]

ТП 4.2 Підготовка зразків

В стріпи місткістю по 0,2 мл, додають по 15 мкл буферу з розчиненою в ньому Таq-полімеразою, та по 5 мкл зразків, все робиться стерильними носиками з фільтрами. Всі реагенти центрифугуються перед забором. Коли стріп повністю заповнений його закривають кришками, та центрифугують протягом 5 хв при 1500-2000 об/хв, так щоб зникли бульбашки повітря в зразках. [3]

ТП 4.3 Цикл ампліфікації (ТП 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4)

Оскільки метод ампліфікації в ампліфікаторі програмується і складатися з 3-х основних стадій та початкової і завершальної, тобто зберігання. Найпростішим

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 46
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

показати всі три етапи ампліфікації в таблиці. Її наводимо нижче. [3]

Етапи ампліфікації	Температура (град. Цельс.)	Час (хв.)	Кількість циклів
1	95	5	1
2	94	1	5
	65	1	
	74	1	
3	94	0,5	
	65	0,5	
	74	0,5	
4	72	5	1
5		Зберігання	

А в загалом повних циклів має бути приблизно 35-40.

ТП 5 Перевірка результатів

При використанні обладнання для ПЛР в реальному часі, результати ампліфікації відображаються на комп'ютері після кожного циклу. Це означає, що результати стають видимими навіть до завершення всіх циклів ампліфікації. Зазвичай налаштовують набори реагентів таким чином, щоб позитивний результат був помітним приблизно після 25-30 циклів, що відображається як зростаюча лінія. При цьому, апарати ПЛР в реальному часі перевіряють проби шляхом освітлення їх певними світловими променями і отримують світлову інформацію, яку перетворюють на візуальне представлення на екрані. [3]

ПМВ 6 Пакування маркування результатів дослідження

Після отримання результатів, вони готуються для упаковки, маркування та відправлення замовнику. Результати досліджень включаються в документ, де вони поєднуються з фотографіями гелю та підписами, щоб забезпечити зрозумілість отриманих результатів. Крім того, надається письмове пояснення до результатів. Після цього, всі матеріали пакуються в папку та файл, які підписуються. На упаковці також зазначається контактна інформація лабораторії, щоб замовник міг зв'язатися з ними у разі потреби. [28]

ЗВ 7 Знешкодження відходів

Після використання всі інструменти для забору аналізу, а також пробірки і наконечники піпеток, проходять спеціальну упаковку для біологічних відходів,

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 47
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

дотримуючись всіх санітарних вимог щодо транспортування таких відходів. Потім вони відправляються профільним компаніям для належного утилізування та знешкодження. [28]

ПВ 8 Переробка відходів

Всі пластикові упаковки, які використовувалися для стерильних наконечників піпеток, а також інші упаковки, інструменти та рідини, які не мали прямого контакту з біологічними речовинами, розділяються за матеріалами та відправляються на переробку в спеціалізовані компанії. [28]

2.3. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Для організації проведення RT-qPCR та виготовлення всього або частини набору, потрібно досить багато речовин та інструментів. В даній роботі розглядається, що майже всі речовини взяті вже готові, чи майже готові всі вони наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1. – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

№	Найменування	Категорія та номер НТД, відповідно до якої перевіряються необхідні показники	Показники, обов'язкові для перевірки	Примітка
	1	2	3	4
1	Основна сировина			
1.	Муколітики	ДСТУ 4166:2003 "Лікарські засоби. Загальні вимоги до якості" "Фармацевтична продукція" (КВЕД 21.20)	Фізико-хімічних властивості (розчинність, рН, вологість, твердість, розмір частинок, в'язкість), визначення присутності домішок	Для розрідження мокротиння перед виділенням ДНК
2.	Лізуючий буфер	Регламент лабораторного синтезу	Ефективність, стерильність	Для руйнування стінок бактерій
3.	Розчин з магнітними часточками	Регламент лабораторного синтезу	Магнітні властивості, рН	Для вилучення амінокислот при очистці ДНК
4.	Протеаза	Регламент лабораторного синтезу	Активність, чистота, рН-стабільність та термостабільність	Руйнування білків на малі пептиди

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4	5
5.	Буферний розчин	НТД ДСТУ ISO 18385:2018 "Біотехнологія. Продукти біологічні. Вимоги до контролю якості та безпеки для перешкоджання забрудненню продуктів ДНК"	Чистота, стабільність	-
6.	ДНТП	Регламент лабораторного синтезу	Стабільність, чистота, не містити нуклеазних активностей, не містити ДНК людини та кишкової палички	Дезоксирибо-нуклеозид-трифосфати
7.	Праймери	Регламент лабораторного синтезу	Стабільність, цілісність	-
8.	Деіонізована вода	ДСТУ 7525:2014	pH, жорсткість, колір, мікробіологічна чистота.	-
9.	Taq-Полімераза	Регламент лабораторного синтезу	Чистота, концентрація.	Незамінний фермент для проведення реплікації ДНК
10.	MgCl ₂	ГОСТ 4209-77 ГОСТ 7759-73 CAS 7791-18-6, CAS 7786-30-3	Безбарвні кристали, розчинні у воді	-
2	Матеріали			
11.	Дистильована вода	ДСТУ ISO 3696:2003	Чистота, жорсткість, pH	-
12.	NaOH	ДСТУ ISO 3196:2001 Монографія ДФУ 2.0, 2014	pH, концентрація, чистота. Це тверді білі гранули.	-
13.	FeCl ₃	ДСТУ 7274:2012	Чистота, pH, розчинність	-
14.	Етиловий спирт 96%	ДСТУ 4221:2003	Чистоту, прозора рідина з яскравим запахом	-
15.	Гліцерин	ДСТУ ISO 2099-2002	Прозора, безбарвна, густа в'язка рідина, без запаху, солодкувата на смак.	-
16.	Аміак	-	Прозора, безбарвна рідина з надзвичайно гострим, характерним запахом	-
3	Допоміжна сировина			
17.	Пробірки			
18.	Халат медичний жіночий	ГОСТ 24760-81	-	-
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
БФ9114.23.30.001.ПЗ				Лист 49

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4	5
19.	Халат медичний чоловічий	ГОСТ 24760-81	-	-
20.	Наконечники, 2 - 20 мкл, з фільтром, універсальні	Servicebio	Стерильні, без ДНКа, РНКа, стерильні, РР	-
21.	Планшети глибоколуночні	Sente-Lab Ukraine	вільні від ДНК, ДНКа, РНКа, пірогенів, ПЛР інгібіторів, стерильні.	Плашка, з квадратними лунками 2,2 мл, на 96 місць, У-дно
22.	Гребінки для глибоколуночних планшетів	-	Вільні від ДНК, ДНКа, РНКа, пірогенів, ПЛР інгібіторів, стерильні	-
23.	Мікро пробірка з кришкою епіндорфи, 0,2 мл	prozoro	Витримують до 15000 G при центрифугуванні, з поліпропілену.	-
24.	Мірні стакани,	ДСТУ ISO 4787:2009	-	-
25.	Лійка ділильна циліндрична 250 мл	ДСТУ ISO 4787:2009	-	-
26.	Постійний магніт	-	-	-
27.	Лабораторний шпатель	ГОСТ 25336-82Е	-	-
28.	Латексні рукавички	ДСТУ EN ISO 14971:2015	-	-
29.	Засіб для миття посуду	-	-	-
30.	Губка для миття посуду	-	-	-
31.	Мило для рук	-	-	-
32.	Дезінфікуючий засіб	ДСТУ EN 14476:2018	-	-
33.	Пакети для сміття	-	-	-
34.	Смітник для відпрацьованих носиків та інших біологічно забруднених відходів	ДСТУ 2195-99 (ГОСТ 17.9.0.2—99)	-	-
35.	Рукава лабораторні	-	-	-

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 50
------	------	----------	--------	------	---------------------	------------

1	2	3	4	5
36.	Наклейки для маркування	-	-	-
37.	Коробка для пакування	-	-	-

Оскільки не всі дані та параметри є у відкритому доступі таблиця могла б бути більшою. Наприклад послідовність праймерів є секретною інформацією у кожного їх виробника, так само як і розчин дНТП. Також більшість концентрація компонентів в буферах які використовуються в даній роботі є комерційними таємницями.

2.4. Матеріальний баланс

При виготовлені тест-системи на резистентний туберкульоз головною метою є отримання результату, чи хворіє пацієнт, чи може в нього якась інша хвороба. Отже потрібно отримати результат у вигляді позитивного, або негативного. А цей показник залежить від декількох факторів, на які ми можемо вплинути, при виборі методу тестування. Можна робити посіви бактерій з харкотиння рентген, різні проби, але всі вони займають дуже багато часу, або є не настільки точними як ПЛР. [13] Саме тому все частіше зараз використовують метод ПЛР. І як вже було зазначено в попередньому розділі RT-PCR є одним з най більш збалансований по часу та якості.

Кожен метод має свої недоліки. У ПЛР у реальному часі він теж є, і це його складові адже як вже було зазначено, всі безпосередньо важливі компоненти такі як:

- Праймери
- dNTP
- Taq-полімераза

Є дуже специфічними та не стабільними у навколишньому середовищі. Тому потрібен такий буфер який зможе підтримувати цю систему в рівновазі. [21]

Але оскільки ця галузь тільки почала розвиватись, хоча і змогли в перше

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 51
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

секвенувати ДНК в 1983 році. Проте тоді це був надзвичайно довгий процес. Тоді використовували не термостабільну полімеразу, і за один цикл вона вся розпадалася, бо термостабільні полімерази тоді ще не відкрили. Зараз все ще більшість нововведень в цьому напрямку досліджень є під дійсними патентами, або засекречені в різних компаніях, а те що відомо вже не таким ефективним рішенням.

З нестабільними компонентами може працювати тільки досвідчений працівник, тому не можна просто скласти в одну коробку всі перелічені компоненти MasterMix пробірки та відправити замовнику. Тому розчин з гліцерину та солей так ретельно готується, оскільки гліцерин досить густа рідина то також додають деіонізовану воду, адже вона відповідає А класу чистоти води і вона не впливає на властивості суміші. [16] Магній потрібен для додаткової стабілізації праймерів та dNTP, а не лише для каналізації роботи Taq-полімерази. [21]

Тому головною задачею науковця, або робітника, правильно і в максимально стерильних умовах зробити буфер а потім і MasterMix. Адже його не можна піддавати потім термо обробці, вони можуть порушити його стабільність. Або знизити якість.

І лише Taq-полімераза має інші примхи, ці ферменти не можуть довго знаходитись в середовищі яке налаштоване на праймери та dNTP, тому навіть якщо дати постояти підготовленим зразкам, або взяти вчорашню пробірку де всю ніч був MasterMix та Taq-полімераза реакція може не відбутись, бо фермент зруйнується. Тому її потрібно тримати в окремій пробірці, з власним середовищем. [9]

Для постановки принаймні одного аналізу на туберкульоз потрібно поставити одну пробірку із зразком, та по одній пробірці позитивного та негативного контролю. Для того щоб провести 40 циклів ампліфікації потрібно 15 мкл буферу MasterMix із розведеним в нім Taq-полімеразу в пропорції приблизно 27:1, оскільки концентрація Taq-полімерази в пробірці якій вона знаходиться

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 52
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

досить висока. Зразку зазвичай додають по 5 мкл в пробірку. Для повного розрахунку в даному випадку не вистачає даних бо склад MasterMix може бути дещо різним та конфіденційним. Тому можна зробити припущення.

Головною складовою Буферу для ПЛР є деіонізована вода. Адже саме вона є головним розчинником в усій системі. Приблизне відсоткове спів відношення компонентів буферу MasterMix таке:

- Деіонізована вода 75 %
- Буфер, суміш гліцерину та солей 16,5 %
- Хлорид магнію 5,08 %
- Суміш dNTP 2,03 %
- Праймери всі вони додаються в однаковій кількості 0,34 %

Оскільки відсотки приблизні то і розрахунок на 1 постановку буде приблизним. Якщо взяти до уваги що MasterMix та Taq-полімераза спів відносяться як 27: 1 то відсоток Taq-полімерази в розчині буде 3,7 %.

Позитивний та негативний контролі замішуються в свої розчини в такій концентрації щоб точно показатись при ампліфікації для позитивного контролю, ну а негативний контроль не має показатись бо він по збутий будь який НК.

Як видно з відсоткового співвідношення насправді праймери знаходяться в буфері в пікомольних концентраціях.

А тепер розрахуємо приблизний вміст кожного компоненту в 1 постановці, не забувши що для цього нам треба буде використати в 3-чі більше MasterMix та Taq-полімераза адже вони використовуються тричі.

Об'єм що додається до одної пробірки вираховується з огляду на плановану кількість ампліфікацій на 35-40 циклів це 15 мкл та 5 мкл, Буфер для ПЛР та зразок.

Використання компонентів MasterMix + Taq-полімераза

$$\frac{3,7}{100} * 15 = 0,555 \text{ мкл} - \text{Taq} - \text{полімерази}$$

До множимо на 3 для повної постановки:

$$0,555 * 3 = 1,665 \text{ мкл Taq} - \text{полімерази}$$

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 53
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Звідси видно що MasterMix

$$(15 - 0,555) * 3 = 43,34 \text{ мкл}$$

Тепер визначимо скільки інших компонентів що входять в MasterMix потрібно:

Деіонізована вода

$$\frac{75}{100} * 43,34 = 32,5 \text{ мкл}$$

Буфер, суміш гліцерину та солей

$$\frac{16,5}{100} * 43,34 = 7,15 \text{ мкл}$$

Хлорид магнію

$$\frac{5,08}{100} * 43,34 = 2,2 \text{ мкл}$$

Суміш dNTP

$$\frac{2,03}{100} * 43,34 = 0,8798 \text{ мкл}$$

Праймери в однаковій кількості для всіх видів

$$\frac{0,34}{100} * 43,34 = 0,147 \text{ мкл}$$

Що стосується зразку та контролів їх додають по 5 мкл.

Проте слід зазначити що зазвичай замішують трішки більшу кількість але в таких самих пропорціях, адже кожен самплер має свою похибку, та й до того ж важко відібрати все із маленьких епіндорфів до останньої краплини. Тому зверху додають приблизно це 10 мкл суміші для ПЛР (MasterMix+ Taq-полімераза) оскільки вони замішуються безпосередньо перед постановкою, та в окремій стерильній пробірці, а не знаходяться у розфасованих великих пробірках.

Різні виробники розраховують ємність одного набору по різному, звісно MasterMix іде в най більшій кількості адже його потрібно більше всього, також на скільки я знаю можуть варіюватись вміст і самих компонентів буферу в залежності наприклад від стабільності праймерів, або від інших факторів.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						54
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Контролі та Таq-полімераза в меншій кількості, тим паче що на 1 контрольний зразок можна поставити не 1 зразок для аналізу.

Всі величини в даному розділі були розраховані теоретичні та приблизні, а результатом при постановці досліду буде світимість зразків яка буде відображатись на екрані в нм. За допомогою певних каналів світимості, які забезпечують спеціальні фарбники, що при ампліфікації від'єднуються так чи інакше від праймерів які наділені флуорофорами, які починають виділяти флуорисценцію.

Приблизна вартість наору на 48 постановок 12000 грн тому одна постановка коштує близько 250 грн, ціна варіюється від поширеності даного типу наборів, якості та складності їх виготовлення тому ціни можуть буди дуже різними.

2.5. Контроль процесу виготовлення

Для забезпечення якісного проведення аналізу на туберкульоз методом ПЛР у реальному часі, та при застосування методу виділення ДНК за допомогою магнітних часточок слід виконувати наступні контролі точок (див. табл. 2.2), які є критичними для отримання правильного результату.

Таблиця 2.2 – Контроль виробництва

№ контрольної точки (назва стадії)	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проби	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
К 3.2	Вортекс	Візуальний	Кожного процесу	Час 30 с. N=2000 об/хв Магнітні часточки мають бути рівномірно розчинені у пробірці.
К 3.2	Розчин лізісного буферу та магнітних часточок	Пропорційна-математичний	Кожного процесу	Пропорції розчину 1:4 (магнітні часточки : лізуючи буфер)
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
БФ9114.23.30.001.ПЗ				Лист 55

Продовження таблиці 2.2.

1	2	3	4	5
К 3.2	Однорідність	Візуальний	Кожного процесу	Магнітні часточки мають бути рівномірно розчинені в лізисі перед відбором саплером.
К 4.1	Вортекс	Візуальний, на датчику швидкості	Кожного процесу	Домогтися однорідності. Час 20 с. N=1500-2000 об/хв
К 4.1	Центрифуга	Візуальний, на датчику швидкості	Кожного процесу	Час 5 хв. N=1500-2000 об/хв Перевірити щоб в пробірках не було бульбашок повітря, якщо вони все ще є повторити операцію.
К 4.2	Вортекс	Візуальний, на датчику швидкості	Кожного процесу	Домогтися однорідності. Час 20 с. N=1500-2000 об/хв
К 4.2	Центрифуга	Візуальний, на датчику швидкості	Кожного процесу	Час 5 хв. N=1500-2000 об/хв Перевірити щоб в пробірках не було бульбашок повітря, якщо вони все ще є повторити операцію.
К 4.3	Ампліфікатор	Візуальний перевірка програми перед запуском	Кожного процесу	Програма має відповідати прописаній програмі в інструкції для даного типу ампліфікації.

При дотриманні даних контрольних заходів, проведення аналізу має найбільшу якість, а результати будуть максимально наближені до нормальних, негативних або позитивних.

2.6. Стандартизація біомедичної продукції

Стандартизація RT-PCR потребує індивідуального підходу оскільки конкретний склад та оптимальні умови ПЛР можуть варіюватися в залежності від типу ПЛР, додаткових компонентів та специфічних вимог дослідження. Для забезпечення стандартизації набору RT-PCR не існує загально прийнятих норм, оскільки всі вони надто різні, але на кожному виробництві вони свої, проте є і деякі загальні показники, які ми розглянемо. Отже використовують нормативну технічну документацію, прописану на виробництві, власні методики перевірки, перевірку рН, стабільність, та ефективність при постановці.

Ефективність проведення постановки на туберкульоз може також залежить від якості виділення ДНК із зразка, тому слід робити це перевіреним способом, для того щоб він не впливав на характеристики тест-системи набору.

На основі інформації яку дізналася при проходженні перед дипломної практики на базі «ТОВ ХЕМА» (табл. 2.3)

Таблиця 2.3. – Специфікація якості набору для дослідження на резистентний туберкульоз методом RT-PCR

Показник контролю	Встановлені значення	Методи контролю
1	2	3
Опис MasterMix	Прозора блідо рожева рідина, дещо гущіша за воду, без механічних включень	Візуальний
Стерильність	Вмісту нітратів, не більше 0,00002% або 0,2 мм рт. ст. Важких металів не більше 0,00001% або 0,1 мм рт. ст. Не більше 10 життєздатних аеробних мікроорганізмів у 100 мл	ДФУ 2.0, Т.1 (5.1.1), СТ-Н МОЗУ 42-4.6:2015

1	2	3
Ефективність	Коректні результати при постановці RT-PCR, на екрані приладу, без не допустимих відхилень	Практичний метод.
Стабільність з часом	3 місяці	Практична власна методика
Стабільність	Стабільний склад	Власне методика
Ефективність після заморозування	Має спарювати після 3 заморозок та розморозмо	Практичний метод

2.6.1. Методи контролю якості набору для проведення тестування на туберкульоз

Опис MasterMix

Прозора рідина, блідо рожевого кольору, дещо густіша за воду, без механічних включень, однорідна.

Стерильність

Препарат повинен бути стерильний. Випробування проводять згідно з вимогами ДФУ 2.0, Т.1 (5.1.1) та СТ-Н МОЗУ 42-4.6:2015.

Ефективність

Ефективність проведення ПЛР у реальному часі перевіряється експериментальним методом. Робиться постановка яка має відповідати таким вимогам:

- Плавний підйом світимості
- Рівне плато коли використані всі наявні матеріали в суміші. (див рис 2.1)
- Початок зростання світимості приблизно на 25 циклі. (див рис 2.2)
- Негативи контроль не має зростати до самого кінця циклів ампліфікації. (див рис 2.2.)
- На початкових циклах ампліфікації світимість не має бути надто низькою, або надто високою. (див рис 2.1)

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 58
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

На малюнку 2.1 видно, що початкові цикли дуже сильно коливаються по світимості, це може означати, що праймери розпалися, або самі флуорофори які забезпечують цю світимість втратили свої властивості, або відчепилися від праймерів занадто рано, та почали показувати хибні результати позитивності, адже на ранніх стадіях цього не можливо, адже кількість ДНК в зразку надто мала, щоб прилад міг їх відобразити.

Тобто якщо сильні коливання в низ та в гору по світимості це означає що флуорофори розпалися і набір не є ефективним він бракований.

Якщо плато рівне та гладке значить всі компоненти працюють правильно та вони зберігали свою стабільність.

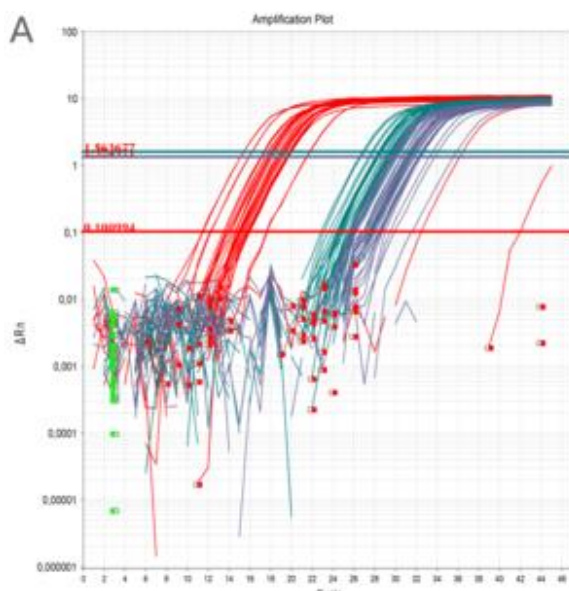


Рисунок 2.1 – Результат ПЛР у реальному часі

На малюнку 2.2 показано як має виглядати прояв результатів на RT-PCR прояв на 25 циклі плавне зростання світимості. Різні кольори ліній вказують на різні фарбники. Як видно деякі зразки не проявили світимість, це негативі контролі, або зразки в яких немає шуканого фрагменту ДНК.

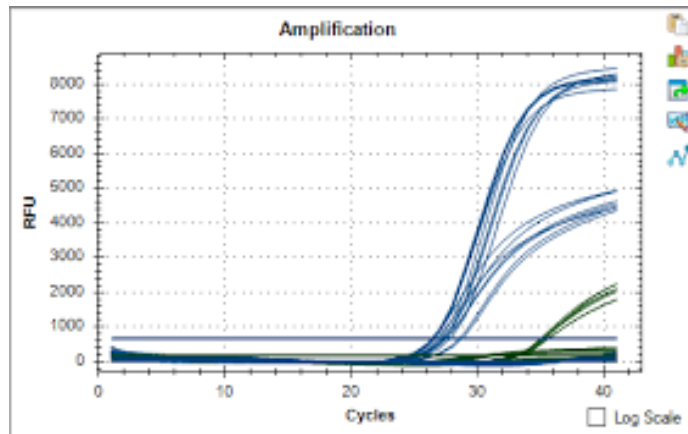


Рисунок 2.2 – Результати RT-PCR з правильним результатом по циклу відтворення.

На малюнку 2.3 най вищі лінії не рівні а це означає, що праймери втратили сво стабільність і почали руйнуватись.

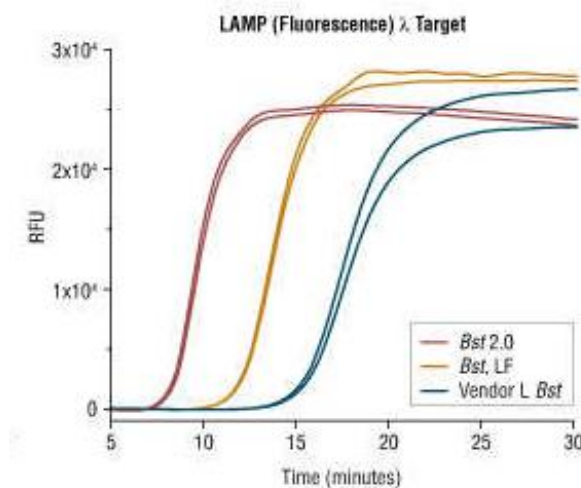


Рисунок 2.3 – Приклад руйнування праймерів.

Якщо постановка відповідає всім наведеним вище вимогам, то вона є ефективною та якісною.

Стабільність з часом

Для перевірки цього параметру, достатньо просто робити постановки приблизно раз на тиждень і перевіряти ефективність компонентів. Якщо реакція не відбулася, або відбулася не по нормам ефективності, значить стабільність втрачена. В середньому набір має зберігати свої властивості протягом 3-х місяців, зазвичай це залежить від стабільності праймерів, або флуорофори, адже вони є най не стабільнішими складовими.

Стабільність

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 60
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Стабільність складу визначають за лабораторними нормами виробництва. Перевірити його досить важко тому треба просто змішувати складові у визначених пропорціях, щоб зберегти його стабільність. Його зміна може відбутись тільки, якщо ефективність постановки спадає не через праймери та барвники флуорофори, тоді для забезпечення норм аналізу на туберкульоз методом ПЛР у реальному часі, потрібно під корегувати його склад. Одним з головних показників того, що склад стабільний є рН, який відповідає лабораторним вимогам на даний тип вибору.

Ефективність після заморожування

Перевіряється після заморозки та розморозки реагентів та постановці ампліфікації. Якщо параметри світимості не змінилися значить набір пройшов випробування. Якщо ні то треба під корегувати склад.

Висновки:

В даному розділі було підібрано метод проведення аналізу ПЛР в реальному часі, як найбільш ефективний та економічно доцільний. Було розглянуто необхідний критичний склад тест-системи для виявлення *Mycobacterium tuberculosis* в зразку. Обґрунтована технологія проведення тестування, та найефективніші методи з представлених на ринку очистки нуклеїнових кислот.

На основі отриманого аналізу було представлено технологію проведення аналізу на туберкульоз методом ПЛР в реальному часі. Для наданої технології були зроблені матеріальні розрахунки, обґрунтований склад реагентів для проведення ампліфікації ДНК в ампліфікаторах, методи лабораторних досліджень, та методи контролю для забезпечення належної роботи тест-системи. Був приведений матеріальний розрахунок по головним складовим MasterMix.

А також було розроблено стандартизацію біомедичного продукту, яка включає в себе визначення параметрів, які характеризують якість тест-системи, а також встановлення меж допустимих, прийнятних, значень, на контролях, для цих параметрів.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 61
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. АПАРАТУРНО-ІНЖЕНЕРНА ЧАСТИНА

3.1. Обґрунтування конструкції технологічного устаткування

Для проведення ПЛР множена використовувати різноманітні ампліфікатори, най сучаснішим є ампліфікатори, які показують результати в реальному часі, їх програме забезпечення зроблено, так що вони після кожного циклу сканують пробірки на флуоресценцію, яка викликана спеціальними фарбниками, флюорофорами і відображають її у вигляду графіку, де по осі «Х» номер циклу, а по осі «Y» інтенсивність флуоресценції. Таким чином дані прилади набагато полегшують роботу. Схожі на них є ампліфікатори які вимірюють флюоресценцію, але тільки один раз в кінці всіх циклів, в такому випадку є лише один показник інтенсивності випромінювання, а також результат не видний до самого закінчення ампліфікації. Хоч вони теж досить ефективні, але вони менш розповсюджені. І також слід зазначити, що зараз досі використовують ампліфікатори так би мовити перші, в яких можна тільки вбити програму, а перевірку результатів треба робити різними іншими методами, наприклад, за допомогою гель електрофорезного дослідження, що забирає набагато більше часу, і тут є більше шансів отримати похибку через не правильну роботу працівника, що виконує дослідження. Також існують похибки самого дослідження методом гель електрофорезу. Проте вони ще досі знаходять собі застосування в деяких дослідженнях. Тому хоч вони і не настільки зручні та ефективні для, швидкого та якісного аналізу ПЛР вони виконують свої функції достойно.

Тому в даній роботі було розглянуто саме ПЛР в реальному часі, як най сучасніший метод ПЛР. А саме одного з най оптимальніших з представників, як було вже зазначено в попередньому розділі CFX96 Touch, який має гарні характеристик до роботи та не є надто дорогим обладнанням.

Для виділення ДНК або РНК з клітин існує безліч різних способів: ручний, він займає досить багато часу, та теж більш схильний помилок, оскільки робиться людиною, а люди не машини і можуть помилитись; з використанням магнітних

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						62
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

часточок, але ручний, цей метод використовує магнітну сепарацію, але без використання автоматизованих систем; і метод заснований на магнітних часточках з використанням автоматизованого приладу для очистки нуклеїнових кислот. Слід зазначити, що всі ці методи використовуються, і для деяких вірусів та бактерій не можна використовувати метод магнітної сепарації оскільки їх НК дуже не стабільні і не виділяються таким методом. До таких вірусів відноситься, вірус гепатиту С, який є РНК вмісним вірусом, і його метод виділення може бути, тільки ручним, принаймні із сучасним обладнанням та методами.

Але для виділення бактерій *Mycobacterium tuberculosis* оскільки генетична інформація в них зберігається в ДНК, а не в РНК. Тому в даній роботі було використано саме автоматичне виділення НК, щоб уникнути помилок при виділенні, зробити дослідження швидшим, та ефективнішим, для цього виду бактерій. В даній роботі ми використовуємо, систему для очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32, за її оптимальні технологічні характеристики та відносно низьку ціну, не дуже велику вагу та компактність.

Всі пробірки планшети та стріпи підбиралися з огляну на сумісність з обраними приладами: ампліфікатором CFX96 Touch, та системою для очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32. І також головним показником було також стерильність обраних пробірок, епіндорфів, стрипів, планшетів. Всі використані в апаратурній схемі обладнання та устаткування мають відповідати нормам лабораторного обладнання «МОЗ наказ 24.01.2008 N 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"»

В таблиці 3.1. наведена специфікація обладнання до апаратурної схеми БФ9114.23.30.003 АС. Дана схема була розроблена для повного циклу проведення аналізу на резистентний туберкульоз. Обладнання підбиралося з огляду на, вимоги проведення аналізу, сумісності один з одним, та власні характеристики, які мають задовольняти вимогам процесу. Головна вимога до

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						63
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

устаткування процесу це його стерильність та якість.

Таблиця 3.1. – Специфікація обкладення до апаратурної схеми
«БФ9114.23.30.003 АС»

Позиція	Позначення	Найменування	Кількість	Маса	Примітка
1	2	3	4	5	6
ПР1 (15 мл) ПР2 (15 мл)	ПР (15 мл)	Пробірка конічна центрифужна з гвинтовою кришкою 15 мл	2		
ПР1 (6 мл) ПР2 (6 мл)	ПР (6 мл)	Пробірка VACUTEST PLAST с На-Гепарином 13x100, 6 мл	2		
ПР1 (5 мл) ПР2 (5 мл) ПР3 (5 мл)	ПР (5 мл)	Пробірка 5 мл стерильна 12x86 мм	3		
ПР1 (2 мл) ПР2 (2 мл) ПР3 (2 мл) ПР4 (2 мл)	ПР (2 мл)	Кріопробірка Sente-Lab із зовнішньою кришкою, ПП, 2 мл	4		
Е1 (0,2 мл) Е2 (0,2 мл) Е3 (0,2 мл) Е4 (0,2 мл) Е5 (0,2 мл)	Е (0,2 мл)	Мікропробірки 0,2 мл тип Eppendorf з опуклою кришкою, стерильні	5		
С1 (0,2 мл) С2 (0,2 мл) С3 (0,2 мл)	С (0,2 мл)	Мікропробірки для ПЛР 0,2 мл з опуклою кришкою в стрипах по 8 штук (120 стрипів/уп) PCRN-8D	3		
ПЛ1 ПЛ2 ПЛ3 ПЛ4	ПЛ	Глибока 96-лункова плашка для культур клітин, стерильна, циліндричне дно	4		
ВР1 ВР2 ВР3 ВР4	ВР	Центрифуга вортекс V-1 plus	4	0,8 кг	

1	2	3	4	5	6
Ц1	Ц	ЦЕНТРИФУГА ЛАБОРАТОРНА (МЕДИЧНА) ДЛЯ МІКРОПРОБІРОК ТА СТРИПВ HW56 C-10000	1	4,3 кг	
A1	A	Ампліфікатор CFX96 Touch (для проведення ПЛР(PCR) тестів)	1	21.4 кг	
СОНК1	СОНК	Система очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32	1	25 кг	

3.2. Розробка схеми автоматизації технології виготовлення

Головою метою даного розділу є отримати воду най вищої якості, адже як було зазначено в попередніх розділах, для приготування MasterMix для ПЛР важлива чистота буферу, та його стабільність. А однією з складових цієї суміші є деіонізована вода. Іони води можуть порушити стабільність най чутливіших компонентів MasterMix таких, як dNTP та праймерів, вже не кажучи про хімічне, або фізичне забруднення води, які можуть зіпсувати всі досить дорогі до речі матеріали. Дорогі бо праймери та dNTP а також контролю, це синтетично виготовлені нуклеотидні послідовності, або дезоксинуклеотидтрифосфати, які не так легко виготовити, тому зіпсувати їх це означає втратити можливість провести аналіз на резистентний туберкульоз.

Вода деіонізована, також відома як демінералізована вода, або ін'єкційна вода, є водою, з якої видалені іони в процесі багатоступінчастої фільтрації. Варто зауважити, що така вода не зустрічається в природі і, якби вона й утворилася, швидко втратила б свої властивості. Навіть дистильована вода, яка зберігається у відкритій посудині, з часом втрачає свою якість через взаємодію з CO₂ у повітрі, утворюючи вугільну кислоту.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 65
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Іони можуть бути позитивними або негативними, і вони можуть бути різних типів. Наприклад, нітрати, що складаються з іонів NO_3^- , є одним з прикладів. У воді також можуть бути присутні різні співвідношення іонів H^+ і OH^- , що визначають її кислотність або лужність.

Отже, деіонізована вода видаляє як позитивні, так і негативні іони. Термін "демінералізація" використовується для позначення процесу видалення всіх розчинених солей з води, що наближає її до ідеальної хімічної чистоти.

Такої води в природі не існує тому її можна тільки отримати за допомогою багато ступеневої очистки. [18]

Хімічні властивості деіонізованої води визначаються її складом і відсутністю іонів. Основні характеристики хімічної природи деіонізованої води включають:

1. Відсутність іонів: Деіонізована вода практично не містить іонів, таких як катіони (позитивно заряджені іони) і аніони (негативно заряджені іони). Вона піддається процесу демінералізації, що призводить до видалення мінеральних солей і іонів з води.
2. Нейтральний рН: Деіонізована вода має нейтральний рівень рН, який приблизно дорівнює 7. Це означає, що вона є нейтральною і не має значного впливу на кислотні або лужні реакції.
3. Висока провідність: Завдяки відсутності іонів, деіонізована вода має дуже низьку провідність. Це означає, що вона не є добрим провідником електричного струму.
4. Добра розчинність: Деіонізована вода має здатність розчиняти речовини на молекулярному рівні. Це зроблено можливим завдяки відсутності солей і іонів, які можуть конкурувати з іншими речовинами при розчиненні.
5. Низький вміст домішок: Деіонізована вода має мінімальний вміст домішок, таких як органічні сполуки, бактерії, віруси та пірогени. Це забезпечує її використання в чутливих дослідженнях та процедурах, де чистота води є важливою.

6. Не більше 10 життєздатних аеробних мікроорганізмів у 100 мл. При необхідності можуть застосовуватись більш суворі попереджувальні межі.
7. Опір (МОм*см) > 18
8. Вмісту нітратів, не більше 0,00002% або 0,2 мм рт. ст.
9. Важких металів не більше 0,00001% або 0,1 мм рт. ст.
10. Бактеріальних ендотоксинів менше 0,25 МО/мл. [14]

Ці хімічні властивості роблять деіонізовану воду корисною в багатьох галузях, включаючи хімічну, фармацевтичну, лабораторну і медичну промисловості, де чистота і відсутність іонів є критичними факторами.

Отже гарно деіонізована вода забезпечить більш стабільну суміш. Тому дуже важливо робити очистку правильно. Головною задачею цього розділу буде зробити автоматизовану систему для очистки такої води.

Результатом даної автоматизації має стати деіонізована вода класу чистоти А в достатній кількості щоб задовольнити всі потреби в ній при виготовленні наборів для ПЛР у реальному часі на резистентний туберкульоз.

3.2.1. Обґрунтування конструкції технологічного устаткування, для деіонізації води

Вода йде з водопроводу та потрапляє на фільтр осадовий №1 (див рис 3.1), що очищає воду від великих домішок та заліза, який заповнений сорбентом АС під тиском не менше 0,028 МПа та температурою в діапазоні +3-30°C. В фільтрі (Aquarum IRB – 1054 RX Знезалізнювач води №1 на схемі), вона нагрівається нагрівачем №2 до температури +30°C, яка є оптимальною для всіх ступенів очистки води. Після проходження фільтру №1 вода збирається в бак №3, із баку вода за допомогою насоса №4 подається для реанімації фільтру №1. Також в баку №3 є вимірювач рівня, який при надлишку води вмикається, щоб бак №3 не переповнився. З баку №3 вода потрапляє на фільтр мішечного типу №6 (фільтр мішечного типу FSI X100) під тиском 2-3 МПа тиск забезпечує насос №5. Фільтр №6 являє собою мішечний фільтр, який застосовується для видалення механічних

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						67
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

частинок, грудок і згустків з води. Принцип роботи фільтра полягає в такому: вода надходить у фільтр через горизонтальний патрубок і проходить через фільтрувальний мішок. У процесі фільтрації забруднення затримуються всередині мішка, а чиста вода виходить через нижній вертикальний патрубок. Мішки фільтрів вставлені в кошик з отворами, щоб запобігти розриву мішка під тиском води. Ефективність фільтрації залежить від щільності мішка і розміру отворів. Що менший розмір пор мішка, то дрібніші частинки можуть бути вловлені. В даній системі він має бути одним з наймілкопрохідним щоб домогтися якіснішої очистки води [19]. Далі вода потрапляє в бак для зберігання №7, де воду знову підігрівають за допомогою нагрівача №8 до температури +40°C. Після підігріву води, вона подається на установку зворотного осмосу №9 та №10 що ідуть у зв'язці для більшої очистки. Оптимальна температура має бути в межах від +20 до +45°C. В приладах є власні вбудовані насоси, що піднімають тиск до 0,8-1 МПа. А тиск на мембранах зворотного осмосу приблизно 0,6 МПа. Зворотний осмос – це метод очищення води, який використовує напівпроникну мембрану для видалення іонів, молекул і шкідливих частинок, розмір яких перевищує розмір молекул води. Ця технологія дозволяє ефективно очистити воду від різних розчинених та зважених домішок, включаючи бактерії, і знаходить застосування як в промислових процесах, так і в виробництві питної води. Цей процес відбувається за допомогою зворотно осмотичної мембрани, через яку вода проникає, але розчинені домішки залишаються затриманими, оскільки їх розмір перевищує розмір пор у мембрані. [15] Також в деяких установках зворотнього осмосу також іде і знезараження води за допомогою ультрафіолетового випромінювання. Останній етап це проходження води через іоні фільтри №12-13 що заповнені спеціальним сорбентом (ФСД фільтри, Фільтр змішаної дії для знесолення води МВ 1665) вони остаточно прибирають аніони та катіони з води, роблячи її хімічну формулу дуже наближеною до H_2O , без заряджених іонів та без додаткових домішок. Тиск на цих фільтрах має бути 0,4 МПа №12 та 0,2 МПа №13, відповідно а температура від +4 до +60°C. Такий тиск

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 68
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

забезпечується за допомогою насосу №11. Після проходження заключного етапу очистки вода збирається в стерильний бак №14. Далі воду можна пустити по стерильним пластиковим трубам.

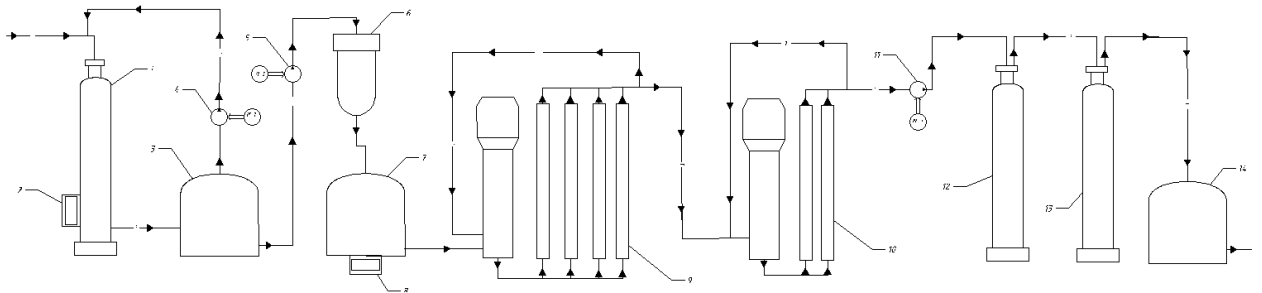


Рисунок 3.1 – Технологічна схема очистки воды

1 – фільтр осадовий; 2 – нагрівач; 3 – бак; 4 – насос; 5 – насос; 6 – фільтр мішечного типу; 7 – бак; 8 – нагрівач; 9 – установка зворотнього осмосу; 10 – установка зворотнього осмосу; 11 – насос; 12 – іоній фільтр ФСД; 13 – іоній фільтр ФСД; 14 – бак.

Оскільки на виході вода має бути типу чистоти А то головною задачею є не дати їй забруднитись між етапами очистки тому це має бути цілісна система, і вона має відповідати головним вимогам при яких працюють прилади, тиск який вимагає апарат та температура води. Також доцільно по закінченню очистки перевірити рН води як один з основних показників деонізації води, рН має бути нейтральним допустимі відхилення, 0,3 рН. Тому слід зробити наступні етапи автоматизації щоб задовольнити всі потреби для виготовлення води деіонізованої.

Таблица 3.2. – Параметри контролю та регулювання виробництва

№ п/п	Найменування стадії процесу (технологічний об'єкт), місце заміру параметра	Найменування параметра, що контролюється чи регулюється	Норми технологічного режиму та допустимі відхилення	Вимоги до схеми автоматизації (контроль, регулювання, сигналізація)
1	2	3	4	5
1	Фільтр осадового типу	Температура	+3-30°C	контроль, регулювання
2		Тиск	0,028 МПа	контроль, регулювання

Продовження таблиці 3.2.

1	2	3	4	5
3	Мішечний фільтр	Рівень	-	регулювання
4		Тиск	2-3 МПа	контроль, регулювання
5	Бак,	Температура	+ 40 °С	контроль, регулювання
6	Трубопровід	Температура	+ 30 °С	контроль, регулювання
7	Фільтр ФСД змішаної дії	Тиск	0,4 МПа	контроль, регулювання
8	Фільтр ФСД змішаної дії	Тиск	0,2 МПа	контроль, регулювання
9	Трубопровід	рН	7	контроль, регулювання

Далі в таблиці 3.3 наведена специфікація устаткування, виробів і матеріалів, для схем автоматизації очистки деіонізованої води, до схеми БФ9114.23.30.004 СА.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист 70
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 3.3. – Специфікація устаткування, виробів і матеріалів, для схеми автоматизації очистки деіонізованої води

Позиція на схемі	Назва параметра	Середовище, місце відбору інформації	Граничне значення параметра	Місце монтажу	Назва, технічна характеристика	Тип, марка моделі	Код	Завод-виробник	Кількість
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
УСТАТКУВАННЯ ТА ПРИЛАДИ									
1-1 5-1 6-1	Температура	Вода	40°C	Фільтр Бак Трубопр.	Термоперетворювач опору платиновий, НСХ 50П, діапазон вимірювання (-50)...60 °С, $P_{\max} = 25$ МПа, довжина монтажною частини 200...3150 мм, захисна арматура – сталь 8Н10Т; інерційність 30 с, клас допуску 2	ТСП-1288		НВО «Електротермія» , Приладобудівний з-д, м. Луцьк	3
1-2 5-2 6-2	Температура	–	–	Щит керування	Регулятор мікропроцесорний восьмиканальний. Забезпечує сигналізацію та контроль і автоматичне регулювання програмування керування реверсивними механізмами; вихідні сигнали: аналогові: 0...5 мА, 0...20 мА, 4...20 мА, 0...10 В; дискретні: через транзистор – до 40 В, 100 мА; через реле – до 220В, 8 А. Основна зведена похибка вимірювання $\pm 0,2$ %. Максимальна кількість кроків програми кожного програмного задатчика – 48, максимальний час програми – 3800 годин. Інтерфейс RS-485	МТР-44		ВАТ «Прикарпатпром-арматура», м. Івано-Франківськ	3
2-1	Тиск	Вода, з сорбентом	0,2 МПа	Фільтр мішечного типу	Сигналізатор різниці тисків електричний, діапазон спрацьовування 0,02...0,25 МПа, температура (-60)...120 °С, похибка спрацьовування ± 8 %, $I_{\text{вих}} = 1$ А	СП-Э		ВАТ «ОКБ "Сигнал" им. А. И. Глухарева», м. Енгельс, Росія	1
2-2	–	–	–	Щит керування	Прилад вторинний пневматичний показувальний, реєструвальний (система	ФК007 1		АТ «ТИЗ-ПРИ-БОР	1

[illegible]

Ізм.										
Лист										
№ докум.										
Піппис										
Дата										
БФ9114.23.30.001 ПЗ										
						максимальний час програми – 3800 годин. Інтерфейс RS-485				
	4-1 7-1 8-1	Тиск	Вода	0,4 МПа	Фільтр ФСД	Сигналізатор різниці тисків електричний, діапазон спрацьовування 0,2...0,7 МПа, температура (60)...120 °С, похибка спрацьовування 0,02 МПа, I _{вих} = 0,3 А	СП-ЭК		ВАТ «ОКБ "Сигнал" им. А. И. Глухарева», м. Енгельс, Росія	3
	4-2 7-2 8-2	–	–	–	Щит керування	Регулятор мікропроцесорний. Реалізує дво- та трипозиційне регулювання, алгоритми регулювання з імпульсним або аналоговим виходами. Забезпечує корекцію за другим параметром. Кількість входів: аналогових – 2 (0...5 мА, 0(4)...20 мА, 0...10 В), максимальна похибка АЦП ± 0,2 %; кількість виходів: ди-скретних або імпульсних – 4 (транзисторний ключ ВК – відкритий ключ або релейний вихід на напругу 220 В і струм 8 А), аналогових – 1 (0...5 мА, 0(4)...20 мА), максимальна похибка ЦАП ± 0,5 %	МК-21		ВАТ «Підприємство “МІКРОЛ”», м. Івано-Франківськ	3
	9-1	pH	Вода	-1 – +14	Трубопро- від	pH-метр промисловий у складі первинного вимірювального перетворювача магістрального виконання (заглибного – ДПг-4М) та проміжного перетворювача П-215М, I _{вих} = 0...5 мА; цифровий інтерфейс RS-485	ДМ-5М		«Гомельський завод измерительных при-боров», м. Гомель	1
	9-2	–	–	–	Місцевий	pH-метр промисловий у складі первинного вимірювального перетворювача магістрального виконання (заглибного – ДПг-4М) та проміжного перетворювача П-215М, I _{вих} =	ДМ-5М		«Гомельський завод измерительных при-боров», м. Гомель	1
73	Лист									

Ізм.																															
	Лист																														
№ докум.																															
Піппис																															
Дата																															
БФ9114.23.30.001 ПЗ																															

Ізм.	Лист	№ докум.	Піппис	Дата						
БФ9114.23.30.001 ПЗ										
75	Лист									

					керування; Ужив = 220/380 В, 50/60 Гц, W _{жив} ≤ 9 В·А				
3-4 4-3 7-3	—	—	—	Місцевий	Перетворювач частоти (ПЧ) [забезпечує пуск і регулювання швидкості двигуна; прискорення, уповільнення, зупинку, розгін і гальмування, захист двигуна]; містить ПД-регулятор витрати та тиску; склад: ПЧ та пульт керування E82ZBC; Ужив = 180...264 В; діапа-зон вих. частоти: -650...+650 Гц; частота комутації 2...16 кГц; характеристика U/f – лінійна або квадратична; перевантажувальний момент: 180...210 % Мп; ступінь захисту IP20; рабочая температура –10...55 °С	Lenze 8200 Vector		Електротехнічна фірма Lenze, Німеччина	3
КАБЕЛІ ТА ПРОВІДНИКИ									
—	—	—	—	—	Кабель 4 × 1,5 мідний, діаметр 13,82 мм; ізоляція – пластикат полівінілхлорид ний	БНТ 100		Південнотрубни й завод, м. Нікополь	1

3.2.2. Розробка схеми автоматизації технології виготовлення деіонізованої води

Щоб полегшити виробництва тест-систем для аналізу на резистентний туберкульоз було розроблено схему автоматизації очистки води аналітичної кості. Схема автоматизації включає в себе 9 контурів для автоматичного контролю та регулювання процесу. Креслення наведене в графічній частині проекту БФ9114.23.30.004 СА.

Перший контур та п'ятий контур вимірює та регулює температуру, перший контур в осадовому фільтрі, другий в баку для зберігання води. Ці контур складаються з термометрів (1-1 та 5-1) регуляторів (1-2 та 5-2) та підсилювачів потужності (1-3 та 5-3), які керують підігрівачами (ТЕН 1 та ТЕН 2).

Другий контур та восьмий контур вимірює тиск в фільтрах за допомогою датчиків (2-1 та 8-1) та показувальних і реєструвальних мікропроцесорних приладів (2-2 та 8-2), а механізми виконавчі мембранні пневматичні прямої дії з опозиціонером допомагають контролювати тиск (2-3 та 8-3).

Третій контур вимірює рівень в баку та контролює щоб він не переповнювався за допомогою датчика рівня (3-1) показувальних і реєструвальних мікропроцесорних приладів (3-2), регуляторів мікропроцесорних (3-3), за допомогою, перетворювач частот живить (3-4), насос (М1) що качає воду з баку назад до фільтра 1.

Четвертий контур та сьомий контур вимірює тиск в фільтрах за допомогою датчиків (4-1 та 7-1), та показувальних і реєструвальних мікропроцесорних приладів (4-2 та 7-2), далі за допомогою, перетворювач частот живить (4-3 та 7-3), насоси (М2 та М3), що збільшують тиск в трубах.

Шостий контур вимірює та регулює температуру за допомогою датчику (6-1) та показувального і реєструвального мікропроцесору приладу (6-2) а механізми виконавчі мембранні пневматичні прямої дії з опозиціонером (6-3) закриває протік якщо температура не відповідає устновленії нормі.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						76
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Дев'ятий контур виміряє та сигналізує та регулює рівень рН в трубі на виході, як контроль. Датчик якості (9-1) знімає показання по рН та передає його на рН-метр промисловий у складі первинного вимірювального перетворювача магістрального виконання (9-2), а регулює все мікропроцесорний регулятор (9-3).

Висновки

В даному розділі була виконана автоматизація очистки деіонізованої води, що може суттєво покращити вироблення тест-систем на резистентний туберкульоз а також зменшити витрати на реагенти. При створенні такої автоматичної системи очікується отримання води класу чистоти А, але оскільки ця схема поки тільки теоретична підтвердити успішність очистки можна тільки в лабораторії після практичної спроби. Також слід зазначити, що дана система є майже автономною, та не потребує великих людських ресурсів. А отримання деіонізованої води майже не обмежені в об'ємах, адже первину воду беруть із звичайного водопостачання.

Також в даній роботі було розроблена та описана схема автоматизації, були проведені необхідні креслення, та описаний механізм очистки деіонізованої води.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						77
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ

Для даного розділу було взято план №1, бо метою даної роботи було виготовити складові для набору, що проводить діагностику на резистентний туберкульоз, методом ПЛР в реальному часі. А саме описати створення речовин в лабораторних умовах, для виявлення резистентного туберкульозу.

Метою цього розділу є оцінка та виявлення шкідливих та небезпечних факторів, що можуть створитись в спроектованих лабораторних приміщеннях, при виготовленні реагентів, та проведенні ПЛР в реальному часі на ампліфікаторі, та заходи їх усунення.

4.1. Характеристика лабораторних приміщень

Лабораторні приміщення мають відповідати класам чистоти «С» та «D». «С» для приготування первісних компонентів, та робота з ними, а також для проведення ПЛР на ампліфікаторі. «D» для роботи з більш нестабільними компонентами та фасування готових виробів. Додаткову чистоту забезпечують ламінарні шафи в яких проводяться майже всі маніпуляції. Приміщення класу чистоти «D» має бути затемненим, адже деякі компоненти є схильні до дисоціації під сонячними променями, можна не повністю головне мінімізувати потрапляння прямих сонячних променів в середину. Всі приміщення мають мати вентиляцію штучну, та штучне освітлення, на підлозі має бути лінолеум хімічно стійкого складу, стіни мають бути білого кольору. Ознайомитись з планом приміщень можна на малюнку 4.1, а параметри лабораторних кімнат та перелік обладнання, що використовується в них наведено в таблиці 4.1. Оскільки в даному виді досліджень можлива контамінація зразків, та самих речовин що використовуються в проведенні дослідження, кожен з етапів має проводитись в окремому приміщенні.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						78
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 4.1 – Характеристика лабораторних приміщень. Обладнання та устаткування.

№	Найменування	Основні характеристики	Кількість	Поз. на рис.
	2	3	4	5
Приміщення				
1	Параметри всього приміщення	6900Ч х 8650 х 2700 мм; S = 59,6 м ² ; V = 161,15 м ³	–	–
2	Параметри кімнати 1	3000 х 5990 х 2700 мм; S = 17,99 м ² ; V = 48,519 м ³	–	–
3	Параметри кімнати 2	3000 х 1710 х 2700 мм; S = 5,13 м ² ; V = 13,851 м ³	–	–
4	Параметри кімнати 3	3000 х 3000 х 2700 мм; S = 9 м ² ; V = 24,3 м ³	–	–
5	Параметри кімнати 4	3000 х 2500 х 2700 мм; S = 7,5 м ² ; V = 20,25 м ³	–	–
6	Параметри кімнати 5	3000 х 2000 х 2700 мм; S = 6 м ² ; V = 16,2 м ³	–	–
7	Природне освітлення	Вікно з металопластику KBE 70 Balance 1200 х 1400 мм	4	–
8	Штучне освітлення	Світильник EVROLIGHT ОПАЛ-В	7	10
Обладнання, оснащення, матеріали				
9	Ламінарна шафа біологічної безпеки HR1500-ІІА2	Розміри: 1680 х 845 х 2160 мм. Матеріал: нержавіюча сталь Потужність: 1300 В	4	1
10	Стіл виробничий, СН-400х600-БП з бортом і полчкою	Розміри: 1100 х 600 х 850 мм. Матеріал: нержавіюча сталь	4	2
11	Бак для сміття Planet №3 50 л	Розміри: 410 х 410 х 455 мм Матеріал: пластик.	4	3
12	Холодильник HISENSE RB224D4BDF	Розміри: 495 х 562 х 1430 мм Матеріал: нержавіюча сталь. Потужність: 244 Вт Рівень шуму: 39дБ	2	4
13	Стілець лабораторний LK SPECIAL STANDART П/В	Розміри: діаметр 600 мм, висота 580 мм Матеріал: суцільнолитий, поліуретан	8	5

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4	5
14	Морозильна камера ультранизька температура DW-HL778/SA	Розміри: 1205 x 1025 x 1955 мм Матеріал: нержавіюча сталь. Потужність: 700 Вт Діапазон потужності: -40°C; -70°C	1	6
15	Стіл мийка лабораторна.	Розміри: 900 x 600 x 900 мм Матеріал: керамограніт, поліпропілен.	1	7
16	Морозильна шафа TKSS400N GGM Gastro	Розміри: 500 x 500 x 1630 мм Матеріал: Сталь Потужність: 425 Вт	1	8
17	Ампліфікатор CFX96 Touch (для проведення ПЛР(PCR) тестів)	Розміри: 350 x 400 x 300 мм Матеріал: Нержавіюча сталь, пластик. Потужність: 200 Вт	1	9
18	Система очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32	Розміри: 400 x 470 x 450 мм Матеріал: нержавіюча сталь, пластик. Потужність: 450 Вт	1	11
19	Провідний димовий пожежний сповіщувач СПД-3.0	Розміри: 100 x 48 мм Матеріал: пластик	6	12
20	Порошковий вогнегасник ОП-9	Розміри: 585 x 180 мм Матеріал: сталь	4	13

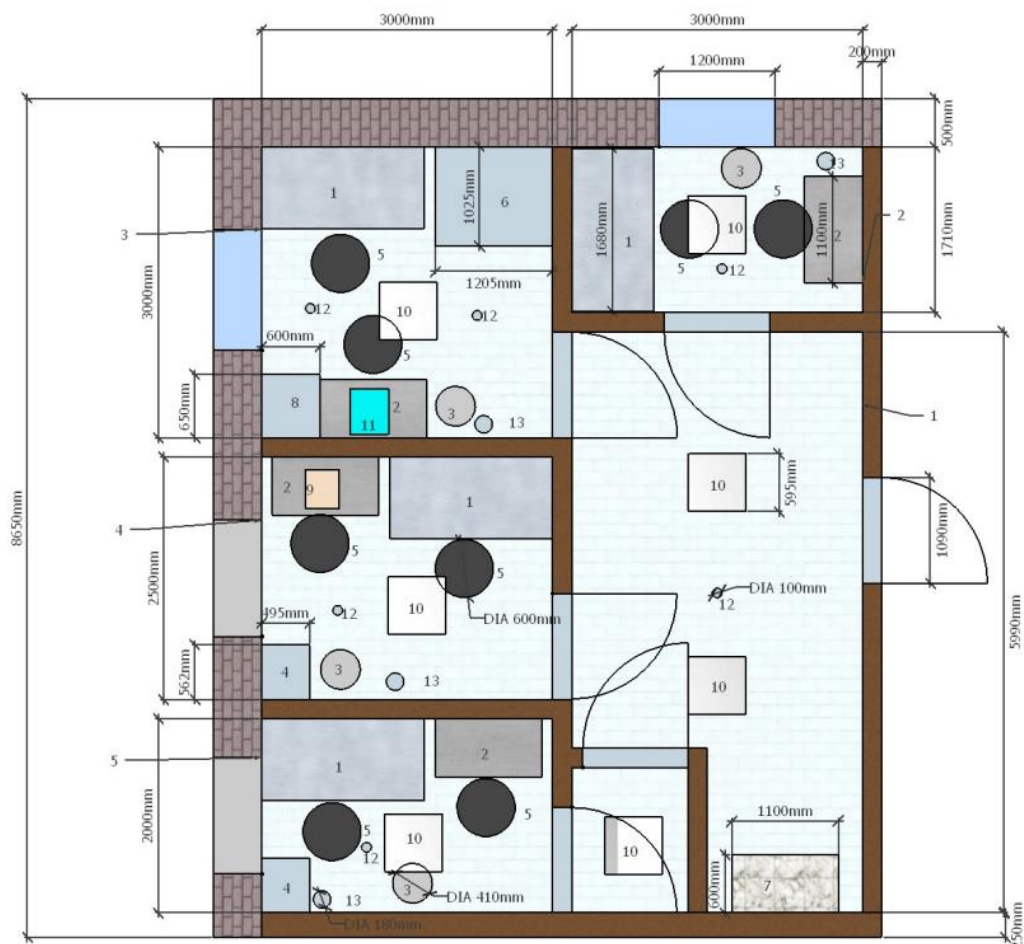


Рисунок 4.1. – План приміщення лабораторії для виготовлення виробів та проведення ПЛР діагностики.

В таблиці 4.2. наведено порівняння нормативних значень, щодо розмірів приміщення, та робочих зон.

Таблиця 4.2. – Порівняння реальних та нормативних значень характеристик приміщення.

№	Параметр приміщення	Реальні значення	Нормативні значення
1	2	3	4
1	Мінімальна площа на 1 працюючого	1 – 17,99	6 м ²
		2 – 5,13	
		3 – 9	
		4 – 7,5	
		5 – 6	
2	Мінімальний об'єм на 1 працюючого	1 – 48,519	20 м ³
		2 – 13,851	
		3 – 24,3	
		4 – 20,25	
		5 – 16,2	

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4
3	Мінімальна ширина проходу	1,2 м	1,5 м
4	Мінімальна відстань між технологічним обладнанням (робоча зона)	1 – 1,6	1 м
		2 – 0,95	
		3 – 1,1	
		4 – 1,5	
		5 – 0,9	
5	Мінімальна відстань між технологічним обладнанням (неробоча зона)	0,65	0,6 м

Згідно з нормами НАПБ Б.03.002-2007 дані лабораторні приміщення не всі відповідають нормам. Тому потрібно провести деяку реорганізацію, приміщень, наприклад збільшити розміри кімнат, замінити маленькі приміщення на неробочі, а також треба замінити розташування обладнання в лабораторії, щоб воно відповідало нормам.

4.2. Аналіз небезпечних та шкідливих факторів в лабораторії що направлена на проведення чи виготовлення ПЛР виробів

Головні норми та правила підтримання безпеки в лабораторіях даної спрямованості прописані в Наказі від МОЗ України 24.01.2008 N 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"». В таблиці 3 ми розглянемо потенцій небезпеки в лабораторії для поліамідної діагностики, при роботі з обладнанням, та біологічними речовинами

Таблиця 4.3. – Виявлення небезпечних та шкідливих факторів

№	Найменування обладнання, оснащення, матеріалів	Джерело небезпеки	Причини небезпеки	Наслідки небезпеки
1	2	3	4	5
1	Ламінарна шафа біологічної безпеки HR1500-IIA2	Біологічне зараження	Не правильна робота під ламінатом. Не дотримання санітарних норм. Поломка ламінарну	Зараження патогенним мікроорганізмами або вірусами, що може призвести до серйозних проблем зі здоров'ям.

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
2	Морозильна камера ультранизька температура DW-HL778/SA	Електро-проводка	Поламка морозильника пошкодження шнурів.	Електричні опіки, удар струмом, коротке замикання пожежа, опіки.
3	Система очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32	Біологічне зараження	Не дотримання санітарних норм, не правильне використання обладнання.	Зараження патогенним мікроорганізмами або вірусами, що може призвести до серйозних проблем зі здоров'ям.

Проаналізувавши таблицю 4.3. можна побачити що є біологічні та електричні небезпечні показники.

4.2.1. Біологічна безпека

Таблиця 4.4. – реальні та нормативні значення біологічно небезпечних показників.

№	Фактор безпеки	Реальне значення	Нормативне значення
1	Наявність патогенних організмів у ламінарній шафі	невідомо	Проба повітря, КУО/м3 – 10
2	Наявність патогенних організмів у Auto-Pure 32	невідомо	Проба повітря, КУО/м3 – 10

При роботі в лабораторії мають чітко застосовуватись санітарні норми та правила особистої гігієни, адже завжди є небезпека зараженню. Також необхідно щоб в приміщенні лабораторії була вентиляція для підтримання чистоти повітря за нормами притік та відтік повітря має відповідати наведеним в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5. – Норми по вентиляції повітря в лабораторії

№	Найменування приміщення	Кратність обміну повітря (куб.м/год)	
		притік	витяжка
1	Зона виділення НК	5	6
2	Зона приготування реакційних сумішей і проведення ПЛР	5	5

Також в лабораторії дуже важливо виконувати всі вимоги по зберіганню хімічних реагентів та речовин, щоб уникнути хімічного ураження, або забруднення навколишнього середовища. Правила зберігання хімічних речовин в

лабораторіях пропасні в ДСП 9.9.5.-080-02. Їх правильне зберігання не тільки тане запобіжником не бажаних небезпечних випадків, але і збереже їх якість та чистоту перед дослідями. Заходи запобігання наведені в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6. – Заходи забезпечення ОП при біологічній небезпеці

№	Група номенклатурних заходів з ОП	Вид заходу	Критерій вибору
1	Технічні заходи	Обов’язкова ультрафіолетова обробка перед та після проведення виділення нуклеїнових кислот із зразків	Для уникнення поширення патогенних організмів, та бактерій за межі приладу, та для уникнення контамінації нових зразків, для більш чистого дослідження.
2	Організаційні заходи	Постійна перевірка належно роботи ламінарів та Auto-Pure 32	Щоб уникнути аварійного режиму роботи, або недостатньої потужності очистки від бактерій робочої зони.
		Проведення інструктажу та перевірки санітарних знань у робітників	Для навчання працівників санітарних норм при роботі в лабораторії.
3	Режимні	Уникнення осіб що не знають санітарні норми в лабораторії.	Для забезпечення чистоти в приміщені
4	Експлуатаційні	Ознайомлення з правилами експлуатації приладів та установок.	Для підтримання чистоти та правильної роботи приладів
		Технічний догляд за обладнанням, та його ремонт.	Для коректної робити обладнання та безпечної роботи з ним.
5	ЗІЗ	Інструктаж з індивідуального захисту та правил дезінфекцій	Для підтримки індивідуального захисту працівників та їх здоров’я.

За даними таблиці 4.6. видно, що підприємство забезпечує всі необхідні заходи для уникнення небезпеки згідно з Наказом МОЗ України 24.01.2008 N 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"».

4.2.2. Пожежна безпека

Ще однією серйозною небезпекою є займання електроприладів під напругою, що може призвести до пожежі небезпечність пожежі наведена в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7. –Визначення пожежної небезпеки

№	Категорія пожежної небезпеки	Клас пожежонебезпечної зони	Клас пожежної небезпеки
1	B	П-Па	Е (горіння електроприладів під напругою)

Щоб уникнути пожежі було розроблено низку заходів (див табл. 4.8.)

Таблиця 4.8. – Заходи та засоби для забезпечення ОП при пожежній небезпеці

№	Група номенклатурних заходів з ОП	Вид заходу	Критерій вибору
1	2	3	4
1	Технічні заходи	Уникати ушкодження кабелів, приладу, та не перенавантажувати пристрої для уникнення збоїв в електромережі	Для запобігання електричного удару, та займання інших предметів та самого приладу.
2	Організаційні заходи	Проведення інструктажу співробітників.	Для правильної експлуатації приладу.
		Установка запобіжника.	Уникнення КЗ
		Присутність в кімнаті вогнегасника типу ОП-9	Для своєчасного гасіння при займанні

Продовження таблиці 4.8.

1	2	3	4
3	Режимні	Уникненню перевірки приладу не кваліфікованими людьми	Для уникнення можливих поломок приладу при не кваліфікованій діагностиці чи ремонті.
4	Експлуатаційні	Вчасне обслуговування приладів, заземлення приладу.	Для постійної належної роботи приладу

Приймаючи до уваги норми ДСТУ 3855-99 в даній лабораторії всі необхідні норми пожежної безпеки дотримані в належній кількості.

Висновок:

В даному розділі, було проаналізовано та розроблено приміщення, в якому може проводитися ПЛР та виготовлення його компонентів, а також потенційні небезпеки при роботі в даному закладі. При оцінці було виявлено не відповідність по площі та об'єму деяких кімнат на одного працюючого, для виправлення не відповідності необхідно розширити декілька кімнат, та можливо переставити деяке обладнання. З точки зору безпеки біологічної та пожежної, дане приміщення повністю відповідає нормам та вимогам щодо безпеки праці.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						86
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

На сьогоднішній день в Україні і світі існує багато різновидів діагностики туберкульозу, наприклад, рентген діагностика імуноферментний аналіз на антитіла, проте ПЛР у реальному часі є най ефективнішим та швидким аналізом, оскільки він займає набагато менше часу та має більшу специфічність, порівняно з іншими методиками, адже він використовує для діагностики ДНК бактерій. ДНК як відомо є унікальною для кожного організму, маючи свої специфічні складові, на які і направлена ампліфікація, на унікальні частини ДНК *Mycobacterium tuberculosis*.

Було здійснено розробку технології виготовлення тест-систем на резистентний туберкульоз викликаний *Mycobacterium tuberculosis*. Яка включає в себе всі сучасні та най ефективніші методики, по виділенню ДНК та методу ампліфікації у реальному часі, які дають можливість дуже точно та специфічно визначати збудники інфекції. Та підібране необхідне обладнання, для підтримання оптимальних умов, для можливого виготовлення та проведення аналізу, після встановлення вимог до технології та вимог для забезпечення оптимального процесу. Також було розглянуто принциповий склад тест-системи для проведення ПЛР у реальному часі, яка включає всі необхідні реагенти та складові, для проведення аналізу. Такі як: MasterMix, Taq-полімераза, позитивний та негативний контроль.

На основі статистичних даних, було виявлено, що в світі на 2021 рік понад 10,6 мільйона осіб можуть бути хворими на туберкульоз, з них 4,1 мільйона в Україні, що становить близько половини від всіх хворих. Тому, пошук експрес-методів ефективної діагностики туберкульозу, є ключовим завданням сучасної науки та діагностики. В проекті було розглянуто проведення тестування на туберкульоз методом RT-PCR, який включає в себе ряд переваг для пацієнтів та підприємств які їх проводять. В роботі було зазначено, що весь час, який мінімум може бути затрачений на діагностику, від забору біологічного матеріалу пацієнта,

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						87
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

до отримання результатів, може бути 1 робочій день. Цей показник найнижчий для всіх видів діагностики, а його точність також є одною з най вищих у сфері діагностичних методів. Що надає йому переваги для пацієнта, адже швидкий та точний результат може відіграти вирішальну роль у підтримці здоров'я пацієнта. В свою чергу підприємство, витрачає менше часу, та отримує гарну репутацію, завдяки ефективності роботи та точності результатів.

Для розробленої технології було підібрано основне та допоміжне технологічне обладнання та розроблена апаратурна схема виробництва яка детально показує етапи проведення аналізу на резистентний туберкульоз, з позиції обладнання та устаткування для їх реалізації.

Також, у роботі було здійснено автоматизацію процесу очищення деіонізованої води, що може значно покращити вироблення тест-систем для резистентного туберкульозу і знизити витрати на реагенти, та покращити їх якість. При створенні такої автоматичної системи планується досягнути води в класі чистоти "А". Варто також зазначити, що дана система практично автономна і не потребує значних людських ресурсів.

Окрема увага в проєкті, приділялася охороні праці та безпеці роботи при проведення тестування, в наслідок чого було проведено аналіз та розробка приміщення, де може здійснюватися проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та виготовлення його компонентів, а також оцінено потенційні ризики, пов'язані з роботою в цьому закладі. Під час оцінки було виявлено незначні не відповідності у площі. Для усунення цих не відповідностей потрібно розширити кілька кімнат. З точки зору біологічної та пожежної безпеки, це приміщення повністю відповідає нормам і вимогам щодо безпеки праці

Отже в рамках дипломного проєкту було виконано всі поставлені задачі. А розглянутий матеріал підтверджує перспективу, ефективність та якість розглянутої методики діагностики на резистентний туберкульоз.

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						88
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. 6. Магнітне сепарування – РОЗДІЛЕННЯ ЗЕРНОВИХ СУМІШЕЙ В ТРИСРАХ; ПНЕВМАТИЧНЕ, ГІДРАВЛІЧНЕ І МАГНІТНЕ СЕПАРУВАННЯЮ. Навчальні матеріали ТДАТУ. URL: https://elib.tsatu.edu.ua/dep/mtf/ophv_23/page6.html
2. Biochain Institute Inc. Biochain Institute Inc. URL: <https://www.biochain.com/blog/using-dntp-in-polymerase-chain-reaction-pcr/>
3. Effectiveness of real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pathological samples: a systematic review and meta-analysis. PubMed Central (PMC). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5657121/>
4. GenePure Pro. Labvita. URL: <https://labvita.com.ua/products/genepure-pro/>
5. How to Process Sputum Samples and Extract Bacterial DNA for Microbiota Analysis. PubMed Central (PMC). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6214103/>
6. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections – Scientific Reports. Nature. URL: <https://www.nature.com/articles/srep45199>
7. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis - Latest Diagnostic Tools. IntechOpen - Open Science Open Minds | IntechOpen. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/43720>
8. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. PubMed Central (PMC). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7080036/>
9. What is Taq Polymerase?. News-Medical.net. URL: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Taq-Polymerase.aspx#:~:text=Taq%20polymerase%20is%20the%20heat,of%20amplifying%20specific%20DNA%20sequences>

10. ZakonOnline. Наказ № 662 від 30.07.2013 Про затвердження Методичних рекомендацій. Аналітично-правова система ZakonOnline. URL: https://zakononline.com.ua/documents/show/37137_37137
11. Ампліфікатор – це. jak.bono.odessa. URL: <https://jak.bono.odessa.ua/articles/amplifikator-ce.php>
12. Ампліфікатор CFX96 Touch (для проведення ПЛР(PCR) тестів). EliteCopter. URL: <https://elitecopter.com.ua/ua/sredstva-zashhity-ot-koronavirusa/analizatory/amplifikator-cfx96-touch-bio-rad-ssha-uk>
13. Діагностика туберкульозу та встановлення випадку захворювання « КНП "Запорізький регіональний фтизіопульмонологічний лікувально-діагностичний центр". КНП "Запорізький регіональний фтизіопульмонологічний лікувально-діагностичний центр". URL: <http://zotd.com.ua/?p=120>
14. ДР.В. ВОДА ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ. Фармацевтична енциклопедія. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1784/voda-dlya-in-yekcij>
15. Зворотний осмос. Переваги та недоліки. Принцип роботи. Евромінерал Україна. URL: <https://euromineral.com.ua/portfolio-items/zvorotnij-osmos-perevagi-ta-nedolik/>
16. Как получают воду аналитического качества? – Подробная информация. Деионизированная вода Тимерхан® DIH2O – ИП Латыпов И.Г. URL: <https://xn--80aaahkvt2anmhcg4dxdwc.xn--p1ai/производство/вода-для-лабораторного-анализа/>
17. М. С. Калачнюк Л. Г. Калачнюк Д. О. Мельничук С. Д. Мельничук Г. І. Калачнюк. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці (методичні аспекти). URL: <http://aminbiol.com.ua/2012pdf/108.pdf>
18. Магазин вимірювальних приладів та обладнання ПП БРОМ. БРОМ – вимірювальні прилади для контролю та безпеки. URL: <https://brom.ua/uk/pro-deionizirovanu-vodu-zkosti-otrumannya-zastosuvannya-ukr>

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						90
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

19. Мешочный Фильтр FSI X100 (США). Купить. Лучшая Цена!. Магазин Фильтров Aqua Club №1 (Аква Клуб) • Отличные Цены. URL: <https://aquacub.com.ua/shop/meshochnyy-filtr-fsi-x100/>
20. Навчання персоналу. Pidru4niki. URL: https://pidru4niki.com/10310208/menedzhment/navchannya_personalu
21. ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДІАГНОСТИКИ : Метод. вказівки до навч. дисципліни / упоряд.: Остапченко Л. І., Драницина А. С., Гребіник Д. М. Київ, 2017. 89 с. URL: https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Biochimiya/Biblioteka/Ostapchenko_Osnovy_molekulyarnoi_diagnosticsky_Metodichka_2017_final.pdf
22. ПЛР Туберкульоз (плевральна рідина), якісне дослідження Показання, підготовка, результати аналізу – IQlab. Медична лабораторія IQlab Сдать Здати аналізи в Дніпрі. Клініко-діагностичні дослідження. URL: <https://iqlab.com.ua/product/tuberkuloz-mysobacterium-tuberculosis-plevralna-rdina-metodom-plr>
23. ПЛР. *Mycobacterium tuberculosis* (туберкульоз), якісне визначення (кров, плазма, ліквор) \ N. Медична Лабораторія CSD LAB. URL: https://www.csdlab.ua/analyzes/diahnostyka-inshykh-infektsiy/plr-tuberkuloz-n?utm_source=google&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=dsa-kyev&utm_term=&gclid=Cj0KCQjw98ujBhCgARIsAD7QeAgjksKH3KCM9OXdwrpAWXPWOc8KTxXURy_6TxdoxD_kBCqhCXWKDUUaAnB1EALw_wcB
24. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) (статья) | Академия Хана. Khan Academy. URL: <https://ru.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr#:~:text=>
25. Про затвердження Державних санітарних норм та правил «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						91
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		

- охорони здоров'я». Офіційний вебпортал парламенту України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1067-14#Text>
26. Про затвердження Положення про порядок проведення медичних оглядів працівників певних категорій (ДНАОП 0.03-4.02-94). Офіційний вебпортал парламенту України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0136-94#Text>
 27. Про полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). URL: https://physiology.med.sumdu.edu.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=295&lang=ru
 28. Розділ 7. Опис технологічної схеми. StudFiles. URL: <https://studfile.net/preview/5194359/page:12/>
 29. Система очищення нуклеїнової кислоти Auto-Pure 32. Casada. URL: <https://casada.ua/sistema-ochistki-nukleinovoj-kisloty-auto-pure-32-ua>
 30. Смесь dNTP (25 мМ кожного). Пущинские лаборатории. URL: <https://www.laboratorii.com/reaktivy/thermo-scientific/57650/>
 31. Статистика з ТБ Центр громадського здоров'я. Центр громадського здоров'я України МОЗ. URL: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/tuberkuloz/statistika-z-tb>
 32. Туберкульоз, *Mycobacterium tuberculosis*, ДНК методом ПЛР – якісн. Медична лабораторія ДІЛА. URL: <https://dila.ua/labdir/174.html>
 33. Форма N-33. Звіт про хворих на туберкульоз. Україна, 2022.
 34. Форма N-8. Звіт про захворюваність на активний туберкульоз. Україна, 2022.
 35. Хлорид магнію (хлористий магній). АКТ Україна. URL: <https://atk-ua.com/ua/catalog/hlorid-magniya-hloristyj-magnij/>

					БФ9114.23.30.001.ПЗ	Лист
						92
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		