ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ЦЕНТР ГРОМАДСЬКОГО ЗДОРОВ'Я
МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ»
(ЦЕНТР)

НАКАЗ

«07» листопада 2024 року Київ № 151-од

Про затвердження методичних рекомендацій щодо організації лабораторних досліджень збудників інфекційних хвороб в стічних водах, що утворилися в процесі господарсько-побутової діяльності

На виконання наказу Міністерства охорони здоров'я України від 07 жовтня 2024 року № 1701 «Про затвердження Методичних рекомендацій щодо здійснення спостереження за динамікою вмісту збудників інфекційних хвороб в стічних водах, що утворилися в процесі господарсько-побутової діяльності»

НАКАЗУЮ:

1. Затвердити методичні рекомендації щодо організації лабораторних досліджень збудників інфекційних хвороб в стічних водах, що утворилися в процесі господарсько-побутової діяльності, що додаються.

2. Начальнику відділу комунікацій (Миколі Ганічу) забезпечити оприлюднення на офіційному вебсайті Центру методичних рекомендацій щодо організації лабораторних досліджень збудників інфекційних хвороб в стічних водах, що утворилися в процесі господарсько-побутової діяльності, затверджених цим наказом.

3. Контроль за виконанням цього наказу залишаю за собою.

Генеральний директор **Михайло РОСАДА**

ЗАТВЕРДЖЕНО
наказ Державної установи «Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України»
від «07» листопада 2024 року № 151-од

Методичні рекомендації щодо організації лабораторних досліджень збудників інфекційних хвороб в стічних водах, що утворилися в процесі господарсько-побутової діяльності

1. Загальні положення

1.1. Ці методичні рекомендації призначені для використання фахівцями Державної установи «Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України», центрів контролю та профілактики хвороб Міністерства охорони здоров'я України, закладів охорони здоров'я, науково-дослідних інститутів, інших організацій та установ при організації та проведенні лабораторних досліджень стічних вод, що утворюються внаслідок господарсько-побутової діяльності, з метою виявлення збудників інфекційних хвороб, зокрема, таких як грип, поліомієліт, COVID-19, холера та інші.

1.2. Ці методичні рекомендації розроблені на підставі Закону України «Про систему громадського здоров'я»; наказу Міністерства охорони здоров'я України від 24.01.2008 № 26 «Про затвердження державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно генетичними методами», зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 07.02.2008 за № 88/14779; наказу Міністерства охорони здоров'я України від 30.05.2007 № 284 «Про затвердження методичних вказівок «Санітарно-вірусологічний контроль водних об'єктів»»; наказу Міністерства охорони здоров'я України від 30.05.1997 № 167 «Про удосконалення протихолерних заходів в Україні», наказу Міністерства охорони здоров'я України від 08.06.2015 № 325 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами», зареєстровано у Міністерстві юстиції України 07.08.2015 за №959/27404; наказу Міністерства охорони здоров'я України від 07.10.2024 № 1701 «Про затвердження Методичних рекомендацій щодо здійснення спостереження за динамікою вмісту збудників інфекційних хвороб в стічних водах, що утворилися в процесі господарсько-побутової діяльності» та інших актів законодавства.

1.3. Моніторинг збудників інфекційних хвороб у стічних водах дозволяє своєчасно виявляти та оцінювати рівень циркуляції патогенів у популяції. Відстеження таких збудників, як віруси грипу, поліомієліту, SARS-CoV-2, а

також збудник холери, набуває особливої важливості у контексті забезпечення громадського здоров'я та безпеки водних ресурсів.

1.4. Завдяки високій чутливості та специфічності полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є найбільш точним, швидким та інноваційним інструментом для виявлення як вірусної РНК, так і бактеріальної ДНК, що робить цю методику особливо ефективною для забезпечення своєчасного виявлення патогенів.

1.5. Ці методичні рекомендації містять детальні інструкції щодо відбору, транспортування, обробки проб та проведення ПЛР-аналізів стічних вод для виявлення вірусів, зокрема, грипу, поліомієліту, SARS-CoV-2 та збудника холери. Дотримання цих рекомендацій сприятиме підвищенню ефективності епідеміологічного моніторингу та забезпеченню своєчасного реагування на загрози, пов'язані з цими небезпечними інфекціями.

1.6. Основними завданнями цих методичних рекомендації є:

1.6.1. Забезпечення надійності та точності виявлення патогенів у стічних водах;

1.6.2. Мінімізація ризиків для здоров'я населення за рахунок раннього виявлення патогенних мікроорганізмів;

1.6.3. Організація контролю та моніторингу санітарного стану водних об'єктів, які можуть бути забруднені інфекційними агентами.

2. Відбір та підготовка проб

2.1. Відбір, підготовка та транспортування проб стічних вод здійснюється відповідно до Методичних рекомендацій щодо здійснення спостереження за динамікою вмісту збудників інфекційних хвороб в стічних водах, що утворилися в процесі господарсько-побутової діяльності, затверджених наказом Міністерства охорони здоров'я України від 07.10.2024 № 1701.

2.2. Концентрація збудників здійснюється відповідно до Методичних вказівок «Санітарно-вірусологічний контроль водних об'єктів», затверджених наказом Міністерства охорони здоров'я України від 30.05.2007 № 284.

2.3. Концентрація вірусів і бактерій у стічних водах часто є низькою, що вимагає попередньої концентрації збудників з великого об'єму зразка для підвищення чутливості ПЛР.

2.4. Методи концентрації вірусів і бактерій у стічних водах:

2.4.1. Фільтрація: пропускання зразка через фільтри з малим порогом пористості не менше 0,2–0,45 мкм для відділення патогенів.

2.4.2. Центрифугування: обробка зразків при високих швидкостях центрифугування сприяє осадженню вірусних або бактеріальних частинок шляхом їхньої сепарації від рідкої фази.

2.4.3. Ультрафільтрація: цей метод застосовується для селективного виділення частинок заданого розміру за допомогою спеціалізованих мембран, що дозволяють фільтрувати зразок на основі молекулярної маси або діаметра частинок.

3. Виділення нуклеїнових кислот (екстракція)

3.1. Процес екстракції має бути контрольованим з метою запобігання деградації нуклеїнових кислот (НК) та забезпечення отримання високоякісних зразків для ПЛР.

3.2. Для виділення РНК вірусів (грип, SARS-CoV-2 тощо) застосовують спеціалізовані набори, які забезпечують лізис вірусних частинок та подальшу очистку РНК за допомогою фільтраційних систем або магнітних частинок.

3.2.1. Для бактеріальних патогенів (Vibrio cholerae) виділення ДНК здійснюється із застосуванням спеціалізованих буферів для лізису клітинних стінок, після чого використовуються методи фільтрації або центрифугування для очищення ДНК.

3.2.2. З метою очищення зразка застосовуються різні хімічні та механічні методи для усунення білків, жирів та інших домішок, які можуть інгібувати ПЛР.

3.3. Оцінка кількості та якості нуклеїнових кислот:

3.3.1. Спектрофотометричний аналіз використовується для визначення концентрації НК на основі їх абсорбції, співвідношення довжини хвилі 260/280 нм для чистої НК мають бути у межах 1.8–2.0 відповідно, що вказує на чисті НК без значних забруднень білками.

3.3.2. Флуоресцентні методи оцінки дозволяють більш точно визначити кількість НК і виявити наявність домішок, що можуть впливати на ефективність ПЛР.

3.4. Орієнтовний перелік необхідного обладнання ПЛР-лабораторії для виділення НК:

3.4.1. Бокс біологічної безпеки не нижче II класу.

3.4.2. Центрифуга лабораторна з охолодженням для пробірок.

3.4.3. Центрифуга-вортекс.

3.4.4. Мікроцентрифуга.

3.4.5. Набір автоматичних піпеток (дозаторів) змінного об'єму.

3.4.6. Спектрофотометр.

4. Постановка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

4.1. Загальні вимоги до постановки ПЛР:

4.1.1. Безпечність проведення робіт досягається, зокрема, за рахунок того, що всі операції з реакційними сумішами виконуються в стерильних умовах, в окремих ламінарних боксах, щоб мінімізувати ризик контамінації. Персонал повинен використовувати засоби індивідуального захисту, зокрема одноразові рукавички, маски та лабораторні халати.

4.1.2. Для забезпечення достовірності результатів у кожній серії постановок ПЛР необхідно використовувати позитивний контроль (зразок з відомим вмістом ДНК/РНК відповідного патогену) та негативний контроль (дистильована вода або буфер без ДНК/РНК).

4.1.3. Усі реактиви для ПЛР повинні бути сертифікованими та відповідати стандартам якості. Для підвищення точності та надійності результатів рекомендовано використовувати набори для ПЛР із попередньо оптимізованими праймерами та зондами.

4.1.4. Підготовка реакційної суміші для ПЛР є ключовим етапом, оскільки точність і чутливість реакції залежать від правильного співвідношення реагентів. Неправильні пропорції реагентів можуть призвести до неефективної ампліфікації або навіть до відсутності результатів. Тому важливо дотримуватися чітких інструкцій при підготовці суміші.

4.2. Компоненти реакції:

4.2.1. Матриця: використовуються РНК (для вірусів) або ДНК (для бактерій), отримані зі зразків. Це генетичний матеріал, що підлягає ампліфікації.

4.2.2. Праймери: специфічні короткі олігонуклеотидні послідовності, що розпізнають і зв'язуються з цільовими ділянками геному збудників. Вони є важливими для забезпечення специфічності реакції, оскільки визначають, які саме ділянки ДНК або РНК будуть ампліфіковані.

4.2.3. ДНК-полімераза: фермент, що відповідає за синтез нових ланцюгів ДНК. Для стандартної ПЛР зазвичай використовують Taq-полімеразу, а для роботи з РНК-вірусами застосовується зворотна транскриптаза для перетворення РНК на комплементарну ДНК (кДНК).

4.2.4. Дезоксинуклеотиди (dNTPs): використовуються для синтезу нових ланцюгів ДНК. Вони включають дезокситидін-5'-трифосфат (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

4.2.5. Буферний розчин: створює оптимальні умови для функціонування ферментів, забезпечуючи належний pH та іонну силу.

4.3. Зворотна транскрипція (для вірусних РНК) - це процес, у ході якого вірусна РНК перетворюється на комплементарну ДНК (кДНК), що слугуватиме матрицею для подальшої ампліфікації. Після синтезу кДНК отриманий продукт використовується для проведення стандартної ПЛР, що дозволяє отримати велику кількість специфічних копій.

4.4. Ампліфікація (цикли ПЛР) складається з циклічних змін температури, що дозволяють відтворювати тисячі копій цільової ділянки геному. Кожен цикл ПЛР зазвичай включає три основні етапи:

4.4.1. Денатурація: при температурі 95 °C ДНК-ланцюги розділяються на окремі ланцюжки, що забезпечує доступність матриці для праймерів.

4.4.2. Відпал праймерів: при температурі 50–65 °C праймери зв'язуються з цільовими ділянками матриці ДНК або РНК. Цей етап є важливим для специфічності реакції, оскільки неправильне з'єднання може призвести до непередбачуваних результатів.

4.4.3. Подовження: при температурі 72 °C полімераза синтезує нові копії ДНК на основі наявної матриці. Цей етап відповідає за фактичне збільшення кількості цільових фрагментів.

4.5. Реальна ПЛР (RT-ПЛР) застосовується при кількісних дослідженнях у випадках, коли флуоресцентні зонди дозволяють у реальному часі спостерігати процес ампліфікації. Це забезпечує можливість точно визначити кількість вірусів або бактерій у зразку.

4.6. Орієнтовний перелік необхідного обладнання для постановки ПЛР, приготування ПЛР-суміші і проведення ампліфікації:

4.6.1. Настільний ПЛР-бокс з бактерицидною лампою.

4.6.2. Ампліфікатор (термоциклер).

4.6.3. Центрифуга-вортекс.

4.6.4. Детектор флуоресценції.

4.6.5. Твердотільний термостат.

4.6.6. Набір автоматичних піпеток змінного об'єму.

4.6.7. Камера для горизонтального електрофорезу.

5. Інтерпретація результатів

5.1. Інтерпретація реальної ПЛР:

5.1.1. Пороговий цикл (Ct): чим нижче значення Ct, тим вища концентрація цільового патогену в зразку.

5.1.2. Позитивний контроль: повинен забезпечити ампліфікацію для підтвердження правильності проведення дослідження.

5.1.3. Негативний контроль: ампліфікація не повинна відбуватися, щоб виключити можливість контамінації.

6. Контроль якості та біобезпека

6.1. Контроль якості:

6.1.1. Для забезпечення точності результатів ПЛР мають використовуватись контрольні зразки із відомими позитивним та із негативним значеннями.

6.1.2. Лабораторія повинна забезпечувати регулярний внутрішньолабораторний контроль та міжлабораторний контроль якості досліджень, вживати передбачені законодавством заходи з оцінки відповідності законодавчо регульованих засобів вимірювальної техніки та сервісне обслуговування лабораторного обладнання, що використовується для проведення досліджень.

6.2. Біобезпека:

6.2.1. Зі зразками стічних вод слід працювати в умовах біобезпеки не нижче рівня 2 (BSL-2) залежно від ризику, що несе патоген.

6.2.2. Видалення контамінованих відходів має здійснюватись із дотриманням вимог Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами, затверджених наказом Міністерства охорони здоров'я від 08.06.2015 № 325 (у редакції наказу Міністерства охорони здоров'я України від 06.09.2022 № 1602), зареєстрованим в Міністерстві юстиції України 07.08.2015 за № 959/27404.

6.3. Працівники лабораторії, які проводять лабораторні дослідження збудників інфекційних хвороб в стічних водах, що утворилися в процесі господарсько-побутової діяльності, повинні бути забезпечені такими засобами індивідуального захисту:

6.3.1. Лабораторний (медичний) халат, виготовлений із матеріалу, стійкого до проникнення рідин і мікроорганізмів, для захисту шкіри та особистого одягу від потенційно небезпечних речовин. Халат має бути довгим і повністю закривати руки до зап'ясть.

6.3.2. Шапочка або інший захисний головний убір для зменшення ризику контамінації проб, захисту волосся та шкіри голови від випадкового контакту з інфікованими матеріалами.

6.3.3. Захисні рукавички, виготовлені із відповідного матеріалу (латекс, нітрил, вініл), для захисту рук від контакту із небезпечними патогенами та хімічними речовинами. Рукавички необхідно змінювати після кожного контакту з новим зразком або у разі пошкодження чи контамінації.

6.3.4. Захисне закрите взуття та бахіли, для додаткового захисту від забруднень, використання яких знижує ризик розповсюдження контамінантів за межі робочої зони.

6.3.5. Захисні окуляри або щиток для обличчя – захищають очі та слизові оболонки від аерозольного впливу, бризок і можливого потрапляння біологічних агентів або хімічних речовин.

Заступник Генерального директора **Олексій ДАНИЛЕНКО**