



Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union



**„Îmbunătățirea competențelor în practica de laborator pentru specialiștii agro-alimentari din Europa de Est.”
(Ag-Lab)**

Programul Erasmus +, ProiectKA2 n° 586383-EPP-1-2017-1-SI-EPPKA2-CBHE-JP (2017-2978/001-001)

Practici de laborator

Manual

Sub redacția generală a dnei **Klopčic Marija**, doctor în științe, profesor asistent și cercetător principal, Universitatea din Ljubljana și a dnei **Ischenko Tetiana**, doctor, profesor universitar, Centrul Științific și Metodologic al Învățământului Superior și Profesional Preuniversitar din Ucraina

Autorii noștri:

Alekseyeva Galyna, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Archvadze Nino, doctor, lector universitar, Universitatea de Stat din Tbilisi (Georgia)

Bogatko Nadia, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Agrară Națională Bila Tserkva (Ucraina)

Caisin Larisa, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Agrară de Stat din Moldova

Cherkezia Elena, doctor, lector universitar, Universitatea de Stat din Tbilisi (Georgia)

Coseleva Olga, master în agricultură, lector universitar, Universitatea de Stat din Comrat (Moldova)

De Flaviis Riccardo, doctor în științe, profesor, Universitatea din Teramo (Italia)

Domnenko Lubov, șef al serviciului de metrologie, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Dzuba Yaroslav, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Fedotova Liudmila, doctor în științe, conferențiar universitar, Universitatea de Stat din Comrat (Moldova)

Garkavenko Tetiana, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Gerard Robert, șef al serviciului de metrologie, VetAgroSup Lyon (Franța)

Getya Andriy, doctor în științe agricole, profesor, Universitatea Națională de Științe ale Vieții și Mediului (NUBiP), (Ucraina)

Gotsiridze Olani, doctor în științe, profesor, Universitatea Internațională din Caucaz (Georgia)

Gryshchenko Natalya, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională de Științe ale Vieții și Mediului (NUBiP), (Ucraina)

Gryshchenko Sergiy, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională de Științe ale Vieții și Mediului (NUBiP), (Ucraina)

Gulbani Anna, doctor, cercetător, Laboratorul Ministerului Agriculturii (Georgia)

Guledani Irakli, doctor, cercetător, Laboratorul Ministerului Agriculturii (Georgia)

Iakimova Tatiana, doctor, cercetător, Centrul Republican de Diagnostic Veterinar (Moldova)

Ischenko Tetiana, doctor, profesor, Centrul Științific și Metodologic al Învățământului Superior și Profesional Preuniversitar (Ucraina)

Inasaridze Nino, doctor în biologie, lector universitar, Universitatea de Stat din Tbilisi (Georgia)

Kandef-Gola Malgorzata, doctor, profesor asistent, Universitatea Wroclaw de Științe ale Mediului și Vieții (Polonia)

Kandyba Natalia, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională Agrară din Sumî (Ucraina)

Karpulenko Maksym, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Khitska Oksana, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Agrară Națională Bila Tserkva (Ucraina)

Khomenko Mykola, doctor, profesor, Centrul Științific și Metodologic al Învățământului Superior și Profesional Preuniversitar din Ucraina

Kievskaya Anna, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Klopčič Marija, doctor în științe, asistent profesor și cercetător superior, Universitatea din Ljubljana (Slovenia)

Kondratyuk Vadym, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională de Științe ale Vieții și Mediului (NUBiP), (Ucraina)

Kosek-Paszkowska Katarzyna, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Wroclaw de Științe ale Mediului și Vieții (Polonia)

Kovalenko Ihor, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională Agrară din Sumî (Ucraina)

Kozytska Tamara, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Kuchukashvili Zurab, doctor în biologie, profesor asistent, Universitatea de Stat din Tbilisi (Georgia)

Kurch Diana, doctor, cercetător, Centrul Republican de Diagnostic Veterinar (Moldova)

Kurta Khrystyna, cercetător al Laboratorului pentru Siguranța și Calitatea Alimentelor din Ucraina, Universitatea Națională de Științe ale Vieții și Mediului (NUBiP), (Ucraina)

Lapai Natalia, doctor, cercetător, Centrul Național de Certificare și Expertiză în domeniul Produselor Agricole (Ucraina)

Lozhkina Olena, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Lytvynenko Oleg, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Mardar Maryna, profesor, doctor în științe, Academia Națională de Tehnologii Alimentare din Odessa (Ucraina)

Mdinaradze Irma, doctor în științe, profesor, Universitatea Internațională din Caucaz (Georgia)

Mezhensky Andriy, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Mezhenska Natalia, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Mikiashvili Marika, doctor, cercetător al Laboratorului Ministerului Agriculturii (Georgia)

Neicovcena Iulia, doctor în științe, lector universitar, Universitatea de Stat din Comrat (Moldova)

Povarova Natalia, doctor, conferențiar universitar, Academia Națională de Tehnologii Alimentare din Odessa (Ucraina)

Ruban Sergiy, doctor în științe agricole, profesor, Universitatea Națională de Științe ale Vieții și Mediului (NUBiP), (Ucraina)

Rublenko Iryna, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Agrară Națională Bila Tserkva (Ucraina)

Rublenko Mykhaylo, doctor în științe, academician al Academiei de Științe Agricole din Ucraina, Universitatea Agrară Națională Bila Tserkva (Ucraina)

Ruzhynska Iryna, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Sapachova Mariya, doctor, cercetător, Institutul de Stat de Diagnostic de Laborator și Expertiză Veterinară și Sanitară (Ucraina)

Scripnic Elena, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Agrară de Stat din Moldova

Semanyuk Volodymyr, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională de Medicină Veterinară și Biotehnologii din Lvov (Ucraina)

Shaban Nidal, doctor în științe, profesor, Universitatea Forestieră din Sofia, membru al ISLE (Bulgaria)

Simonov Maryan, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională de Medicină Veterinară și Biotehnologii din Lvov (Ucraina)

Sobolta Andriy, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională de Medicină Veterinară și Biotehnologii din Lvov (Ucraina)

Stefanyk Vasyl, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională de Medicină Veterinară și Biotehnologii din Lvov (Ucraina)

Stybel Volodymyr, doctor în științe veterinare, profesor, Universitatea Națională de Medicină Veterinară și Biotehnologii din Lvov (Ucraina)

Titlova Olga, doctor, conferențiar universitar, Academia Națională de Tehnologii Alimentare din Odessa (Ucraina)

Tkachenko Nataliia, doctor în științe, profesor, Academia Națională de Tehnologii Alimentare din Odessa (Ucraina)

Tsarenko Taras, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Agrară Națională Bila Tserkva (Ucraina)

Turko Ihor, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Națională de Medicină Veterinară și Biotehnologii din Lvov (Ucraina)

Ushkalov Valerii, doctor, cercetător, Laboratorul pentru Calitatea și Siguranța Produselor Agricole din Ucraina din cadrul Universității Naționale de Științe ale Vieții și Mediului (NUBiP), (Ucraina)

Vovkotrub Natalia, doctor, conferențiar universitar, Universitatea Agrară Națională Bila Tserkva (Ucraina)

Vygovska Lilia, doctor, cercetător – lector universitar, Universitatea Națională de Științe ale Vieții și Mediului (NUBiP), (Ucraina)

Introducere

Acest manual a fost editat în cadrul proiectului UE Erasmus + „Îmbunătățirea competențelor în practica de laborator pentru specialiștii agro-alimentari din Europa de Est”/Ag-Lab/. Echipa de autori este formată din profesori universitari și specialiști ai laboratoarelor agro-alimentare din Slovenia, Franța, Italia, Polonia, Ucraina, Georgia și Moldova.

Această ediție este destinată studenților masteranzi la facultățile de veterinărie, agronomie, zootehnie și de tehnologii alimentare specializați în practica de laborator, tinerilor specialiști care își încep cariera la laboratoarele din sectorul agro-alimentar, precum și specialiștilor care lucrează deja în laboratoare pentru a-și actualiza cunoștințele profesionale.

Manualul cuprinde toate domeniile producerii agroalimentare și include informații generale legate de practicile de laborator, cum ar fi bazele activității laboratoarelor chimice și biologice, echipamentele de laborator, metodele analizelor de laborator, tehnicile de prelevare a probelor pentru diferite matrice, normele internaționale legate de practicile de laborator, managementul calității și aspectele metrologice. Două părți specifice sunt dedicate analizelor genetice aplicate în zootehnie și analizelor senzoriale aplicate în controlul produselor alimentare.

Manualul oferă cunoștințele esențiale necesare pentru activitatea laboratoarelor și este editat sub formă de ghid. Sursele suplimentare ar trebui utilizate pentru o studiere mai aprofundată a anumitor probleme științifice, juridice și tehnice.

Această versiune în limba engleză a manualului ar trebui să fie utilizată la nivel internațional și conține normele, regulile, tehnicile, metodele aplicate în țările UE și în țările care își armonizează legislația și sistemele de control la standardele europene.

Capitolul 1. Bazele de lucru într-un laborator chimic

1.1 Pregătirea laboratorului pentru testare. Reguli de securitate

Lucrul într-un laborator chimic pentru profani seamănă uneori cu magia, dar pentru alții nu diferă de acțiunile obișnuite din bucătărie. Și, într-adevăr, un chimist în laborator este ca un bucătar în bucătărie. Dar chimistul nu lucrează cu bucate obișnuite, ci cu cele speciale și amestecuri, nu cu produse, ci cu reactivi chimici.

Pentru a realiza cu succes experimentele chimice, este necesar să știm cu certitudine ce echipamente sunt disponibile în laboratorul chimic, ce ustensile sunt utilizate de chimiști și pentru ce sunt necesare acestea. Metodele chimice se bazează, de obicei, pe reacțiile chimice ale substanței testate cu anumiți reactivi în prezența unor indicatori relevanți care utilizează greutatea sau analizele volumetrice.

Măsurarea într-un laborator chimic este asociată cu o serie de factori periculoși și dăunători. Siguranța se bazează pe securitate și siguranța incendiilor.

Laboratoarele efectuează în mod constant cercetări folosind substanțe chimice. Manipularea necorespunzătoare a substanțelor chimice poate provoca otrăvirea lucrătorilor, arsuri chimice, dezvoltarea bolilor profesionale.

Normele protecției muncii reglementează cerințele pentru microclimat, conținutul de substanțe nocive, nivelurile de zgomot și vibrații, iluminarea în laboratoarele chimice.

Instalațiile laboratoarelor asigură iluminarea naturală, artificială și combinată, în funcție de caracteristicile lucrului vizual. Iluminarea locală ar trebui utilizată în combinație cu iluminarea generală. Este interzis să utilizați doar iluminarea locală. Dispozitivele locale de iluminare trebuie să fie adecvate categoriei și grupei de substanțe explozibile și trebuie fixate astfel încât lucrătorul să poată schimba direcția fasciculului de lumină dacă dorește.

Indicii microclimatului din zona de lucru a laboratoarelor chimice trebuie să îndeplinească cerințele Normelor sanitare de stat pentru microclimatul spațiilor industriale. În zona de lucru a laboratoarelor chimice, conținutul de praf, gaze și vapori de substanțe nocive nu trebuie să depășească CMP (concentrația maximă permisă) stabilită în documentele de reglementare aplicabile.

Lucrările de laborator trebuie efectuate numai cu o ventilație adecvată și trebuie să fie asigurată ventilația automată și blocarea. În cazul în care se descoperă defecțiuni de ventilație, lucrătorul trebuie să informeze șeful laboratorului și Departamentul pentru siguranța la locul de muncă.

Instalațiile laboratoarelor chimice destinate lucrului cu substanțe extrem de periculoase (pericol de clasa 1) și foarte periculoase (pericol de clasa a 2-a) trebuie izolate de alte spații de laborator, trebuie să aibă o intrare separată și hote de ventilație care să nu fie conectate la alte spații. Toate lucrările cu substanțele caustice, otrăvitoare, cu miros puternic, inflamabile și explozibile se efectuează în spații izolate (de incinta generală a laboratorului) și echipate cu dispozitive eficiente de ventilație în interior sau în hote. Hotele de ventilație sunt echipate cu pompe de aspirație.

Pentru a-i proteja pe angajații laboratoarelor chimice de efectele factorilor periculoși și dăunători, este necesară utilizarea mijloacelor de protecție colectivă, în conformitate cu cerințele documentației de reglementare curente. Spațiile laboratoarelor chimice trebuie să fie echipate cu stingătoare de incendiu primare (cutii de nisip uscat, stingătoare de incendiu, păături de incendiu fabricate din materiale izolante necombustibile etc.), a căror amplasare trebuie să fie indicată prin indicatoare în conformitate cu ISO 6309:2007 "Protecția împotriva incendiilor. Indicatoare de securitate. Forma și culoarea" (ISO 6309:1987, IDT).

Lucrătorii laboratoarelor chimice trebuie să fie asigurați cu îmbrăcăminte specială, încălțăminte specială și alte echipamente individuale de protecție (EIP), în conformitate cu cerințele din „Regulamentul privind procedura de dotare a lucrătorilor cu îmbrăcăminte specială, încălțăminte specială și alte echipamente individuale de protecție”.

În cursul exercitării atribuțiilor, lucrătorul de laborator este obligat să respecte normele sanitare și igiena personală: să lucreze numai cu echipamente individuale de protecție, să păstreze locul de muncă curat și în ordine corespunzătoare.

Pentru a neutraliza acizii vărsați sau alcalii, în laboratorul chimic trebuie să fie disponibile pahare cu soluții de neutralizare preparate în prealabil (bicarbonat de sodiu pentru acizi și acid acetic pentru alcali etc.). Deșeurile solide acumulate în laboratorul chimic trebuie colectate în ambalaje separate și eliminate în locațiile convenite cu autoritățile sanitare și pentru combaterea incendiilor.

Lucrările cu violență de reacție, creștere a presiunii, care supraîncălzesc obiectul de sticlă sau îl deteriorează prin pulverizarea produselor fierbinți sau caustice, precum și lucrările în vid trebuie să se desfășoare sub ecrane de protecție pe coli speciale. La locul acestei lucrări trebuie instalate ecrane transparente de protecție. În timpul amestecării sau diluării substanțelor ce emană căldură, trebuie utilizate ustensile de sticlă sau de porțelan rezistente la căldură. Vasele din sticlă rezistente la căldură nu pot fi încălzite la o flacără deschisă fără plasă rezistentă la căldură; flacoanele și baloanele din sticlă obișnuită cu pereți subțiri nu pot fi încălzite la foc deschis și pe plăci fierbinți.

Substanțele chimice sunt păstrate în laboratoarele chimice în conformitate cu certificatul privind termenii și condițiile de depozitare ale producătorului. Cantitatea de substanțe chimice în vrac (de rezervă) este depozitată într-o cameră specială izolată situată în afara laboratorului chimic. Fiecare recipient se etichetează cu denumirea exactă a substanței și cu o inscripție care indică prezența proprietăților toxice, inflamabile în substanță: roșu este pentru „Inflamabil”, galben este pentru „Otravă”, verde este pentru „A se păstra departe de apă” sau altele. Este interzisă depozitarea substanțelor chimice cu etichete ilizibile și fără etichete. Substanțele din paharele neclasificate urmează să fie eliminate. La depozitarea substanțelor inflamabile și explozibile, luând în considerare proprietățile lor fizico-chimice, trebuie respectate măsuri suplimentare de precauție, și anume: eterul dietilic (sulfuric) trebuie depozitat izolat de alte substanțe într-un loc rece și întunecat; sodiul metalic ar trebui depozitat în borcane de sticlă cu pereți groși, cu colțuri mari închise etanș cu plută sub un strat de petrol lampant uscat (fără umiditate), parafină sau ulei de transformator în cutii de nisip; peroxidul de hidrogen, acidul percloric (concentrat) și alți oxidanți nu pot fi depozitați împreună cu agenții reducători, și anume cărbune, sulf, amidon etc.; sodiul metalic și fosforul nu pot fi păstrate cu brom și iod. Vasele de sticlă pentru depozitarea substanțelor lichide inflamabile cu o capacitate mai mare de 1 litru trebuie plasate într-o cutie metalică ermetică.

Atunci când se efectuează un set de lucrări într-un laborator chimic, se utilizează gazele presurizate. Acestea pot fi gaze inerte (de exemplu argon, azot, heliu, dioxid de carbon) sau explozibile capabile să ardă (hidrogen, oxigen). Gazele de obicei se păstrează în butelii sub o presiune de până la 250 atm. În funcție de conținutul de gaz, buteliile sunt colorate într-o anumită culoare.

Gazele sunt prelevate din butelii cu ajutorul reductoarelor colorate într-o culoare care corespunde culorii balonului. Selectarea gazelor fără un angrenaj adecvat este strict interzisă.

În cazul utilizării gazelor comprimate (în unele cazuri a gazului lichefiat), înainte de toate este necesară verificarea minuțioasă a stării adecvate a buteliei și a angrenajului, și ca perioada de valabilitate a buteliei să nu fie expirată. Este interzisă utilizarea acestora după data expirării buteliei, precum și deteriorarea corpului buteliei sau angrenajului.

Buteliile de gaz trebuie protejate împotriva loviturilor, leziunilor mecanice și căldurii. Acestea sunt plasate în cutii metalice plasate în afara încăperilor, iar gazul este furnizat în laborator printr-o conductă specială instalată conform anumitor reguli.

Este strict interzis să lăsăm butelia de gaz nesupravegheată cu supapa deschisă.

1.2 Ustensilele de sticlă ale laboratoarelor chimice

Ustensilele de sticlă ale laboratoarelor chimice pot fi împărțite în grupe.

După scop:

- generale;
- speciale;
- de măsurare.

După material: sticlă simplă, sticlă specială, cuarț.

Ustensilele generale de sticlă includ acele articole care ar trebui să fie întotdeauna în laborator și fără care majoritatea lucrărilor nu pot fi efectuate. Acestea sunt: tuburi de testare, pâlnii simple și de măsurare, pahare, baloane cu fundul plat, vopsele pentru turnarea continuă, baloane conice (Erlenmeyer), baloane Bunsen, frigider, stivuitoare, recipiente cu apă distilată, racorduri, robinete și altele.

Ustensilele speciale de sticlă includ articolele utilizate pentru un anumit scop, de exemplu: aparatul Kipp, aparatul Soxhlet, aparatul Kjeldahl, coloanele de fracționare, paharele Woolf, paharele Tyschenko, picnometrele, hidrometrele, baloanele cu fundul rotund, frigiderile speciale, dispozitivele de măsurare a temperaturii de topire și de fierbere și așa mai departe.

Vasele de măsurare includ: cilindri și tuburi gradate, pipete, biurete și baloane gradate. Acestea sunt concepute pentru a măsura volumul lichidului.

1.2.1. Pipetele

Pipeta este un tub gol cu o gură de scurgere alungită și este un instrument indispensabil pentru distribuirea lichidelor utilizate în laboratoarele chimice, de mediu, microbiologice și medicale.

Tipuri de pipete:

- pipete gradate,
- pipete Mohr,
- pipete Sally,
- pipete Pasteur,
- pipete Panchenkov,
- pipete picurătoare,
- Distribuitoare pneumatice electronice sau mecanice.

De regulă, acestea sunt fabricate din sticlă rezistentă chimic sau din materiale polimerice.

În chimia analitică se utilizează cel mai frecvent pipetele gradate (cu linii gradate) și pipetele Mohr (o diviziune). Printre pipetele gradate se numără și micro pipetele, acestea sunt concepute pentru distribuirea lichidelor de 0,1 ml și 0,2 ml.

Tuburile din cauciuc sau PVC se folosesc pentru colectarea lichidului în pipetă. Există, de asemenea, pere speciale pentru pipetele cu supapă.

Pipetele gradate au fost inventate în secolul XIX și sunt încă un instrument indispensabil pentru măsurarea exactă a unui anumit volum de lichid. Scala pipetei este gradată în centimetri cubi (cm³) la 20 °C. Pipetele gradate produc două clase de precizie (1 și 2). Pipetele gradate sunt de mai multe tipuri:

- 1 - pipete drepte cu linii gradate;
- 1a - pipete cu linii gradate cu un rezervor de rezervă;
- 2 - pipete extinse cu linii gradate cu extensie;
- 2a - pipete extinse cu linii gradate și rezervoare de rezervă.

În plus, pipetele sunt împărțite în tipuri. Cele mai populare trei tipuri de pipete sunt:

Tipul 1. Pipete de scurgere de la nivelul zero de sus până la orice marcaj. Marcajul inferior de pe pipetă corespunde capacității nominale. Astfel de pipete se numesc pipete incomplete de scurgere. Pipetele de acest tip pot fi din clasa 1 și 2 de precizie;

Tipul 2. Pipete pentru extragerea lichidului de la orice marcaj până la vârful de scurgere. Marcajul superior corespunde valorii capacității. Acestea sunt pipete pentru o turnare completă. Pipetele de acest tip pot fi din clasa 1 și 2 de precizie;

Tipul 3. Pipete de scurgere de la nivelul zero de sus până la vârful de scurgere. Partea inferioară a vârfului de scurgere corespunde volumului nominal. Pipetele de acest tip pot fi doar din clasa 2 de precizie.

În prezent, în toate laboratoarele moderne sunt utilizate mai multe tipuri de pipete automate (dozatoare), și anume:

- dozatoare mecanice cu volum variabil;
- dozatoare mecanice cu volum fix;
- dozatoare electronice.

Dozatoarele mecanice pot fi în diferite modificări, pot avea volume de dozare diferite, un număr diferit de canale (de obicei 1, 8, 12 sau 16), unele modele pot fi supuse autoclavării complete sau parțiale.

Dozatoarele mecanice cu volum variabil și fix au un principiu de lucru similar; principala caracteristică distinctivă este că, în primul caz, dumneavoastră puteți alege volumul necesar pentru această analiză în parametri setați ai dispozitivului (de exemplu, de la 100 la 1000 μl) și, în al doilea caz, poate fi ales doar volumul furnizat de acest model (de exemplu, 100 μl). Volumul dozei este selectat prin rotația unei roți speciale de reglare (tambur) pe carcasa instrumentului, fiind afișată valoarea volumului selectat. Producătorii pun de obicei tamburul de reglare sub butonul principal de funcționare al dispozitivului.

Se recomandă utilizarea vârfului dozatorului o singură dată și eliminarea acestuia după utilizare. Dacă dozați același lichid, nu puteți schimba vârful în timpul operației, dar după ce treceți la alte soluții, este necesar să schimbați vârful. Dacă procedura este realizată cu atenție, vârfurile pot fi reutilizate prin pre-spălare, sterilizare și uscare. Vârfurile sunt fabricate din polipropilenă, care rezistă autoclavării la 121°C.

Există două tipuri principale de vârfuri: sterile și nesterile.

Vârfurile sterile trebuie utilizate pentru reacția în lanț a polimerazei (PCR) și pentru alte analize medicale importante pentru puritatea și excluderea ADN-ului și ARN-ului străin. Vârfurile pot fi ambalate în ambalaje în vrac sau ambalate în trepiede speciale. Numărul vârfurilor dintr-un pachet este format în funcție de volumul unui vârf, adică cu cât volumul este mai mare, cu atât este mai mic numărul vârfurilor din pachet. Pentru fiecare companie și tip de dozatoare există propriile vârfuri, unice, dar și universale, iar dimensiunea lor ar trebui să corespundă dimensiunii și volumului dozatorului utilizat.

Partea inferioară a dozatorului este echipată cu așa-numitul „con de aterizare” la care este necesar să se fixeze strâns vârful. Nu puneți mâinile pe vârf, în special dacă lucrați cu vârfuri sterile. Puteți folosi trepiede speciale pentru confortul dumneavoastră.

Evitați variațiile de temperatură între dispozitiv, vârf și lichidul distribuit în timpul operației pentru a evita deteriorarea dispozitivului. De asemenea, diferența de temperatură poate afecta precizia dozei.

Pipetele mecanice au un avantaj mare față de pahar în viteza de dozare, precizie și comoditate. Cu toate acestea, pe lângă beneficii, pipetele mecanice (dozatoarele) au și dezavantaje. De exemplu, majoritatea acestor dispozitive nu pot fi folosite pentru selectarea substanțelor corozive (acizi concentrați, alcali, solvenți etc.). În timpul lucrului cu astfel de substanțe, mecanismul dozator se deteriorează și pipeta se rupe.

1.2.2. Baloanele din sticlă

Ustensilele de sticlă ale laboratoarelor chimice sunt fabricate din diferite materiale naturale și artificiale: sticlă, porțelan, corindon, șamotă, cuarț, metal, plastic etc. Ustensilele de uz general fabricate din sticlă sunt cele mai frecvente în laboratoare. Datorită stabilității sale termice, sticla este un material adecvat pentru fabricarea ustensilelor chimice. În cazurile în care rezistența chimică sau termică nu este suficientă, se utilizează vase din alte materiale.

Rezistența termică înseamnă capacitatea sticlei de a rezista (fără a distruge) fluctuațiilor puternice ale temperaturii. În ceea ce privește stabilitatea termică, sticla este divizată în grupe pe baza coeficienților de dilatare termică (CTE) în intervalul de temperatură de 20 – 300°C.

Rezistența chimică înseamnă capacitatea sticlei de a rezista efectelor distructive ale apei, acizilor, alcalilor și altor reactivi chimici.

Balonul este un vas din sticlă cu fundul rotund sau plat și cu gâtul lung. Baloanele sunt de diferite capacități - de la 50 cm³ până la câțiva dm³, cu și fără gradații:

- cu fundul plat,
- conic,
- cu fundul rotund,
- în formă de pară.

Baloanele cu fundul plat și conice sunt utilizate în mod obișnuit ca receptoare pentru distilarea lichidelor, pentru prepararea și cristalizarea soluțiilor. Acestea nu pot fi utilizate atunci când substanțele sunt încălzite la temperaturi ridicate și utilizate sub presiune redusă.

Baloanele cu fundul rotund sunt folosite pentru distilarea substanțelor, inclusiv în vid. Lungimea și diametrul gurii baloanelor cu fundul rotund pot fi diferite. Aceste baloane sunt cu două, trei gâturi etc. Baloanele cu fundul rotund cu tub de evacuare se numesc baloane Würtz. Acestea sunt concepute pentru distilare la presiunea atmosferică. Baloanele Kleisen sunt folosite pentru distilare sub presiune redusă.

Baloanele de aspirație (Bunsen) sunt utilizate pentru filtrarea în vid.

1.2.3. Baloanele gradate

De obicei, aceste baloane sunt cu fundul plat cu gâturi lungi, destinate preparării solvenților de o anumită concentrație, dizolvarea substanțelor, diluarea soluțiilor, au un marcaj inelar pe partea cilindrică a gâtului.

Reguli pentru lucrul cu baloanele gradate. Balonul este luat de partea superioară a gâtului, evitând atingerea brațelor cu partea sa convexă. Din căldura transmisă de mâini de pe pereții balonului, capacitatea

balonului și, prin urmare, volumul de lichid din acesta crește. Înainte de a fi umplut balonul se pune pe o suprafață de masă plată, bine iluminată.

Pentru a dizolva solidul într-un balon gradat, acesta este plasat într-un balon care este umplut cu solvent nu mai mult de $1/2$ sau $2/3$. Apoi, conținutul balonului se agită printr-o mișcare circulară lină până la dizolvarea completă a substanței. După aceasta în balon se adaugă solventul nou. Ultimele porțiuni ale solventului se adaugă prin picurare cu ajutorul unei pipete dotate cu un capac de cauciuc. Atunci când se adaugă ultimele picături de lichid, ochii experimentatorului trebuie să fie la un nivel cu marcajul balonului. Meniscul concav al suprafeței lichide cu partea inferioară ar trebui să fuzioneze cu linia marcajului, iar meniscul convex ar trebui să fuzioneze cu linia marcajului cu partea superioară. Picăturile cu solvent păstrate pe suprafața interioară a gâtului balonului deasupra marcajului sunt îndepărtate cu atenție cu ajutorul unui tub de hârtie de filtru. Soluția se agită foarte atent după închiderea balonului cu un dop.

La selectarea soluției din balonul gradat cu ajutorul unei pipete partea inferioară se scufundă în soluție aproape până la fundul balonului. Dacă pipeta este coborâtă până la fundul balonului, aerul se va scurge atunci când soluția este aspirată cu lichid.

Nu se recomandă:

- a) umplerea baloanelor gradate cu soluții dificil de spălat sau gel greu de îndepărtat de pe pereții baloanelor
- b) păstrarea soluțiilor preparate în baloane gradate pentru o lungă perioadă de timp
- c) încălzirea baloanelor gradate, amestecarea reactivilor reziduali, utilizarea lor în mod necorespunzător.

Întreținerea ustensilelor chimice

Prima și principală cerință pentru personalul de laborator este interzicerea utilizării vaselor și echipamentelor murdare.

Îndemânarea de a spăla ustensilele chimice face parte din tehnicile de laborator, a căror cunoaștere este obligatorie pentru fiecare angajat al laboratorului.

Murdăria de pe pereții vaselor poate fi îndepărtată prin diferite metode: mecanică, fizică, chimică, fizico-chimică sau combinată.

Pentru a alege metoda de spălare a vaselor în fiecare caz, trebuie să fie disponibile următoarele informații:

1. cunoașterea proprietăților contaminanților vaselor
2. utilizarea solubilității contaminanților în apă (rece sau fierbinte), în soluții de alcali, diferite săruri și acizi;
3. utilizarea proprietăților oxidanților, oxidarea în anumite condiții a contaminanților organici și anorganici, distrugerea lor prin formarea compușilor ușor solubili;
4. toate substanțele cu proprietăți active la suprafață (săpun, detergenți sintetici, argile de curățare etc.) pot fi utilizate pentru spălare;
5. curățarea mecanică (cu ajutorul ruginii etc.) poate fi utilizată pentru a îndepărta sedimentele care contaminate vasele dacă acestea sunt stabile din punct de vedere chimic;
6. pentru spălare ar trebui utilizați doar reactivii ieftini;
7. A se ține întotdeauna seama de siguranță și de posibilitatea unor accidente în timpul spălării vaselor. Fiecare lucrător de laborator trebuie să fie familiarizat cu regulile de siguranță.

Următoarele reguli trebuie respectate în timpul spălării vaselor chimice:

1. Trebuie să spălați vasele imediat după utilizare sau cel târziu la sfârșitul zilei de lucru. Nu întârziati spălarea vaselor contaminate în ziua următoare;
2. Metoda de purificare selectată trebuie să se bazeze pe natura poluării, și anume solubilitatea acesteia în apă sau în soluții apoase, solvenți organici, capacitatea de oxidare;
3. Dacă nu știți ce metodă de curățare să alegeți, începeți cu cea mai simplă și mai accesibilă metodă - spălarea cu apă fierbinte sau cu săpun. Agenții mai puternici, cum ar fi solvenții fierbinți, acizii concentrați și alcalii, amestecul de crom trebuie utilizat numai în cazul în care contaminarea nu este spălată cu apă;
4. Îmbrăcați întotdeauna mănuși de cauciuc în timpul spălării vaselor și puneți-vă ochelari sau o mască de protecție în timpul utilizării lichidelor agresive, în special a amestecului de crom, alcalilor concentrați etc.;
5. Este de dorit ca vasele să fie curățate de lucrătorul care lucrează cu acestea. Alte persoane pot face acest lucru numai atunci când utilizează aceeași substanță în laborator, când contaminarea este

neagresivă, netoxică și se spală ușor prin orice mijloace. Dacă proprietățile de contaminare ale asistentului de laborator nu sunt cunoscute, acesta trebuie să primească instrucțiuni înainte de a spăla vasele.

6. Ustensilele destinate unor operațiuni deosebit de exacte și scopuri analitice trebuie spălate de mai multe ori cu apă distilată în urma spălării cu apă de la robinet.

Baloanele gradate, pipetele sunt considerate pure numai dacă nu conțin contaminanți vizibili și dacă apa distilată curge de pe pereții interiori ai vasului fără a lăsa picături. În cazul în care există picături de apă pe sticlă, acest lucru indică contaminarea acesteia cu substanțe grase. Contaminanții grași denaturează grav rezultatele măsurării capacității tuturor vaselor și, prin urmare, prezența lor este inacceptabilă. Pentru a elimina poluarea cu grăsime a balonului, pipetele se spală cu amestec de crom, soluție alcalină de permanganat, amestec de alcool cu eter, soluție de alcool de potasiu caustic, soluție fierbinte de fosfat trisodic (pulbere de spălat) etc. potasiu și acid sulfuric concentrat.

Ustensilele de măsurare nemăsurate nu trebuie utilizate în laboratorul analitic. Validarea unui vas de măsurare urmărește determinarea conținutului real al acestuia (V_{valid}). În urma verificării, se constată corectarea ΔV la volumul său nominal, care este indicat pe vasele de măsurare $\Delta V_{\text{nom}} = V_{\text{valid}} - V_{\text{nom}}$. Vasele de măsurare sunt spălate și uscate cu atenție înainte de verificare, apoi umplute cu apă distilată la o anumită temperatură și presiune barometrică. Apa este turnată într-un vas de măsurare pre-cântărit cu o precizie corespunzătoare capacității vasului de măsurare astfel încât eroarea de cântărire să nu depășească 0,1% din greutatea apei.

Dacă ΔV depășește erorile permise, atunci vasele sunt corectate prin aplicarea erorii în calcul sau obținerea unui marcaj nou.

1.3 Solvenții

Solventul este un compus chimic individual sau un amestec capabil să dizolve diferite substanțe, și anume, să formeze sisteme omogene cu compoziție variabilă, constând din două sau mai multe componente, și anume soluții.

Cerințe pentru solvenți:

Orice substanță poate fi solvent pentru orice altă substanță. Cu toate acestea, în practică, numai substanțele care îndeplinesc anumite cerințe sunt clasificate ca solvenți. De exemplu, solvenții ar trebui să aibă o solubilitate bună, activă, fiind suficient de inerti din punct de vedere chimic față de substanța și aparatele solubile.

Clasificarea chimică a solvenților

Cea mai frecventă clasificare chimică conform căreia se divizează toți solvenții este:

- anorganică
- organică

Solvenții anorganici

Apa este solventul anorganic cel mai frecvent utilizat pentru un număr mare de compuși anorganici și organici. Solvenții anorganici includ: amoniac lichid care este un solvent bun pentru metalele alcaline, fosfor, sulf, săruri, amine și alte substanțe; anhidrida sulfurică lichidă este un solvent pentru mulți compuși organici și anorganici.

Solvenții organici

Solvenții organici au o mare importanță. Aceștia sunt solvenții de petrol (inclusiv halogenații lor), alcoolii, eterii și esterii, cetonii, compuși nitro. Solvenții, amestecurile de diferite substanțe individuale, cum ar fi benzina, eterul de petrol, amestecurile de alcoolii și eteri, precum și eterul dietilic, acetona, turpentina, tetracolorura de carbon și alte substanțe sunt frecvent întâlnite.

Solvenții sunt clasificați după caracteristici:

- după punctul de fierbere, solvenți cu punct de fierbere scăzut (de exemplu etanolul, acetatul de metil) și solvenți cu punct de fierbere ridicat (de exemplu xilenul);
- după rata de evaporare: se disting următoarele tipuri:
 - puțin volatile (turpentina);
 - volatilitate medie (cherosen);
 - foarte volatile (benzină, terebentină etc.).

Este important de știut! Cu cât volatilitatea solventului este mai mare, cu atât acesta este mai inflamabil și mai explozibil.

- după polarități: non-polari (hidrocarburi, disulfură de carbon) și polari (de exemplu apă, alcoolii, acetona).

Specificațiile solventului conțin, de obicei, date privind temperatura de aprindere, limitele concentrațiilor de vapori explozibili din aer, presiunea vaporilor la temperaturi standard și solubilitatea - pentru care tip de substanțe poate fi folosit acest solvent (pentru dizolvarea uleiurilor și grăsimilor, rășinilor, cauciucurilor naturale și sintetice etc.).

1.3.1.1. Reguli pentru lucrul cu solvenții organici și anorganici

Toți solvenții sunt utilizați în stare lichidă. Metoda de aplicare depinde de tipul și densitatea acestora și poate fi: perie, jet, precum și imersiune, vaporizare, electro-depunere și pulverizare (pneumatică/fără aer/electrostatică).

Este important să se ia întotdeauna în considerare posibilitatea unei inflamații și, prin urmare, să se respecte anumite reguli în timpul proceselor de transportare a mărfurilor, depozitării și în timpul lucrului.

În plus, manipularea inadecvată a solventului poate afecta sănătatea umană (gravitatea acestui efect depinde de tipul substanței). Leziunile pielii, membranelor mucoase, tractului digestiv, greața, aritmia, tinitusul, transpirația excesivă fac parte doar din posibilele efecte nocive. Pentru a evita otrăvirea sau cel puțin pentru a minimiza efectul toxic, este necesar să se respecte cu strictețe siguranța și utilizarea EIP (ochelari, măști, respiratoare). Evitați contactul cu pielea și pătrunderea în tractul respirator. Dacă ajunge pe piele, ștergeți și clătiți cât mai curând posibil zona de contact sub jetul de apă.

Asigurați-vă că zona de lucru este bine ventilată astfel încât temperatura aerului din zona de lucru să nu depășească limitele permise, deoarece unii solvenți sunt explozibili. Evitați, de asemenea, sursele fierbinți în acest sens.

Depozitarea și transportarea ar trebui să se desfășoare în condiții răcoroase, cu poziția verticală obligatorie a containerului.

În funcție de gradul de pericol, solvenții utilizați în laboratoare se împart în trei grupe:

- solvenți care cauzează preponderent intoxicații acute cu fenomenul predominant de anestezie: benzină, alcool etilic și butilic, acetonă;
- solvenți mai toxici, provocând intoxicații acute; acest grup solvent include alcoolul metilic (metanolul), dicloretanul etc.;
- solvenți cu toxicitate ridicată, pe lângă intoxicații acute, provoacă modificări persistente ale funcțiilor organelor circulatorii și ale sistemului nervos; acest grup include benzen, toluen, xilen și altele.

Din punct de vedere al siguranței împotriva incendiilor, cele mai multe dintre ele sunt inflamabile. Atunci când lucrează cu solvenții, un lucrător trebuie să fie întotdeauna foarte atent, chiar și o ușoară neglijență nu poate fi tolerată, deoarece acest lucru poate duce la un accident.

Normele de siguranță de bază pentru lucrul cu solvenții organici sunt:

- Lucrați întotdeauna cu solvenți în zona hotei de ventilație.
- În timpul lucrului cu solvenții inflamabili, toate arzătoarele trebuie să fie oprite, iar încălzitoarele electrice deschise trebuie să fie deconectate în zona hotei de ventilație unde se efectuează încercarea.
- Ustensilele de sticlă utilizate pentru testul cu solvent organic trebuie să fie curate și uscate înainte de a fi umplute.
- Lucrul legat de riscul de incendiu, scânteiere sau explozie trebuie efectuat în picioare.
- Nu puteți lăsa locul de muncă nesupravegheat în timpul experimentelor cu solvenți.
- Încălzirea și distilarea solvenților organici inflamabili și combustibili se pot efectua numai într-o baie de apă sau aer folosind aparatele electrice cu circuit închis.
- Nu turnați solvenții organici în canalizare. Lichidele reziduale trebuie colectate într-un container sigilat în acest scop și eliminate într-o zonă autorizată de inspecție sanitară și de incendiu.

1.3.2. Acizi puternici și slabi

Toți acizii se împart în:

- Puternici
- Slabi

Potrivit lui Brønsted, rezistența acidului este determinată de capacitatea protolitică, care depinde de cât de puternic este exprimată disponibilitatea substanței de a da sau primi protoni. Reactivul determină funcția pe care o îndeplinește substanța în reacție – acizi sau baze. În acest caz, un reactiv important este apa, deoarece acționează ca bază sau acid:

Acizii care se disociază fără reziduuri în soluții apoase se numesc puternici.

Exemple de acizi puternici

- HCl- acid clorhidric;
- HBr-hidrobromură;
- HI - iodură;
- HNO₃ - acid nitric;
- HClO₄ - acid clorhidric;
- H₂SO₄ - acid sulfuric.

Toți acizii (cu excepția acidului sulfuric) prezentați în lista de mai sus sunt monoprotici, deoarece atomii lor dau un singur proton; moleculele de acid sulfuric pot produce doi protoni, astfel acidul sulfuric este diprotic.

Acizii slabi au o disociere incompletă. Ca rezultat, în soluție există molecule nedisociate.

1.3.3. Concentrația soluțiilor și diluărilor

Soluțiile apoase de compuși chimici (reactivi) sunt utilizate predominant în practica analizei chimice.

O soluție este un sistem omogen în care moleculele substanței dizolvate sunt distribuite între moleculele solvabile. Soluțiile sunt saturate și nesaturate. Într-o soluție saturată, la o anumită temperatură substanța nu se mai dizolvă. Într-o soluție nesaturată la o anumită temperatură, substanța se poate dizolva în continuare.

Concentrația unei soluții este cantitatea de compuși chimici conținută într-o masă sau într-un volum dat de soluție.

Concentrația poate fi masa (în părți sau procente) sau volumetrică (molară sau normală).

Solubilitatea este masa unei substanțe care se poate dizolva într-o anumită masă sau volum de solvent care formează o soluție saturată. Solubilitatea este exprimată cel mai adesea de cantitatea gramelor substanței care se dizolvă la 100 g de solvent la o anumită temperatură, formând o soluție saturată. Uneori, greutatea solventului este de 1000 g. Pentru substanțele solubile, solubilitatea este exprimată în grame per decimetru cub.

Pentru majoritatea substanțelor, solubilitatea crește odată cu creșterea temperaturii. În cazul în care soluția este saturată la temperaturi mai ridicate, aceasta se răcește la o temperatură mai scăzută, la care solubilitatea substanței este mai mică și atunci excesul acestei substanțe se cristalizează.

După apropiere soluțiile sunt:

- De lucru (cu concentrație aproximativă) care sunt utilizate pentru operațiuni generale de analiză pregătitoare. Ele pot fi destul de concentrate.
- titrate (cu concentrație exactă) care sunt folosite în etapa finală de analiză pentru a obține indicatori cantitativi. Aceste soluții sunt destul de diluate.

În cele mai multe cazuri, soluțiile sunt preparate prin amestecarea unei anumite mase de reactiv (eșantion) cu volumul calculat de apă distilată (sau alt solvent): reactivul este cântărit pe un cântar tehnologic sau analitic, iar solventul este măsurat cu ajutorul cilindrului gradat, pipetei sau biuretei. Întrucât soluțiile de lucru sunt pregătite din reactivii de clasificare „h”, se recomandă filtrarea acestora.

Pentru soluțiile titrate, eșantionul de reactiv trebuie cântărit pe balanța analitică.

Pregătirea soluțiilor cu concentrație procentuală

Concentrația procentuală (%) este egală numeric cu cantitatea gramelor de compus chimic dizolvat conținut în 100 grame de soluție.

Pregătirea soluțiilor cu concentrație normală

Concentrația normală este exprimată prin cantitatea maselor echivalente a substanței conținute în 1 l (1000 ml) de soluție.

Echivalentul unui compus chimic este egal numeric cu masa sa echivalentă în reacție, dar este exprimat în grame.

Masa echivalentă a elementului este egală cu masa sa molară împărțită la valență.

Masa echivalentă a oxidului este egală cu masa sa moleculară împărțită la numărul atomilor de oxigen înmulțit cu 2 sau cu suma maselor echivalente de oxigen și element. De exemplu, masa echivalentă a oxidului de aluminiu este:

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

Masa echivalentă a acidului este egală cu masa sa moleculară împărțită la bazicitatea acidului în această reacție sau cu suma maselor echivalente a rezidului de acid și a hidrogenului. De exemplu, masa echivalentă a acidului sulfuric este:

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

Masa echivalentă a bazei este egală cu masa sa moleculară împărțită la numărul de grupuri de hidroxil implicate în această reacție. De exemplu, masa echivalentă a $Al_2(OH)_3$ este:

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

Masa echivalentă a ionului este egală cu masa sa molară împărțită la valoarea sarcinii sale, fără a lua în considerare semnul sarcinii. De exemplu, masele echivalente de ioni de aluminiu și sulfat sunt egale cu:

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

Masa echivalentă a unei săruri este egală cu masa sa molară împărțită la produsul numărului de atomi metalici din moleculă cu valența sa din acea sare sau cu suma maselor echivalente de cationi și anioni. De exemplu, masa echivalentă a sulfatului de aluminiu este:

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

Prepararea soluțiilor cu concentrație molară

Concentrația molară (M) este egală numeric cu numărul de moli ai substanței conținute în 1 litru (1000 ml) de soluție. Molul (masa molară) este egal numeric cu greutatea moleculară a substanței, dar este exprimat în grame. De exemplu, $M_{KOH} = 56,11 \text{ g/mol}$, $M_{HCl} = 36,46 \text{ g/mol}$.

Conversia concentrațiilor soluției de la o unitate la alta

La calcularea concentrației procentuale molare și invers, trebuie reamintit faptul că concentrația procentuală este calculată pentru o anumită masă a soluției, iar masa molară și respectiv normală pentru volum, astfel trebuie să cunoașteți densitatea soluției. Dacă notăm: c ca concentrație procentuală; M este concentrația molară; N este concentrația normală; e este masa echivalentă, r este densitatea soluției; m este masa molară, atunci formulele pentru concentrația procentuală vor fi următoarele:

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

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

Aceleași formule pot fi utilizate pentru a converti concentrațiile normale sau molare până la un procent.

De exemplu,

Care este concentrația normală și molară a unei soluții de acid sulfuric de 12% a cărei densitate este $r = 1,08 \text{ g/cm}^3$?

Soluție

Masa molară a acidului sulfuric este de 98. Prin urmare,
 $m(H_2SO_4) = 98$ și $e(H_2SO_4) = 98 : 2 = 49$.

Înlocuind valorile necesare în formulă, obținem:

a) Concentrația molară a soluției de acid sulfuric de 12% care este

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

b) Concentrația normală a soluției de acid sulfuric de 12% care este

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

Uneori, în practica de laborator, este necesară transformarea concentrației molare în normală și invers. Dacă masa echivalentă a substanței este egală cu masa molară (de exemplu, pentru HCl, KCl, KOH), atunci concentrația normală este egală cu concentrația molară. Prin urmare, soluția de acid clorhidric 1 n. va fi simultan soluția 1 M. Cu toate acestea, pentru majoritatea compuşilor, masa nu este egală cu cea molară și, prin urmare, concentrația normală de soluții a acestor substanțe nu este egală cu concentrația molară.

Pentru transformarea dintr-o concentrație în alta, pot fi utilizate formulele:

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

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

De exemplu,

Concentrația normală de 1 M de soluție de acid sulfuric este

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

De exemplu,

Concentrația molară 0,5 n. Na_2CO_3

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

Prepararea soluțiilor din fixanale.

Fixanal este o fiolă care conține o substanță cântărită exact.

Pe fiecare cutie și fiolă se scrie formula substanței și concentrația acesteia (0,1 N, 0,01 N etc.). Conținutul fiolei, care este transferat cantitativ și dizolvat într-un balon volumetric de 1 litru, oferă exact 0,1 N, 0,01 N etc. de soluție.

1.4. Echipamente analitice și principiile de detectare ale acestora

În prezent, cercetările fizice și chimice sunt implementate prin intermediul unor tehnici analitice care reprezintă o arie largă de echipamente de măsurare. Cu ajutorul lor, se efectuează atât cea mai recentă cercetare științifică, cât și cea de rutină în domeniul fizicii, chimiei, biologiei, medicinei și altor domenii. Instrumentele analitice sunt utilizate în agricultură, în sistemele de control al mediului, în medicină.

Asigurarea modernă a laboratoarelor cu echipamente analitice este rezultatul unei selecții lungi a mijloacelor și instalațiilor de măsurare, care au fost utilizate în diverse domenii ale științei și tehnologiei, precum și al anilor de elaborare a metodelor specializate și a mijloacelor de analiză.

Bazele teoretice și posibilitățile practice ale metodelor de analiză fizico-chimice:

- determinarea valorii fizice (chimice) pe care se bazează metoda de analiză;
- relația dintre compoziția chimică și proprietățile fizice ale unei substanțe;
- metodele de conversie a analitului în concentrație sau masă: metoda graficului de calibrare, metoda standard (eșantion), metoda aditivului, metoda de calcul.

Clasificarea metodelor de analiză esențiale:

- Directă
- Indirectă
- Inversie.

1.4.1. Aparatul pentru măsurarea pH-lui: caracteristici, utilizare și întreținere

pH-ul este un indicator al acidității soluției, și anume raportul dintre acid și alcali.

Hidrogenul/puterea Hidrogenului/pH-ul potențial este un indice de hidrogen care caracterizează concentrația ionilor de hidrogen liberi din apă.

Pentru a simplifica conceptul, pH-ul este determinat de raportul cantitativ dintre H^+ și OH^- ionii din apă. De exemplu: cu cât este mai mult H^+ în apă, cu atât apa este mai acidă. Cu cât este mai mult OH^- (anume H^+ mai puțin), cu atât mai multă apă alcalină este.

Nivelul pH-ului tinde să crească pe cont propriu.

În apa distilată perfect limpede, acești ioni se vor echilibra unul pe altul. În astfel de cazuri, apa este neutră și $\text{pH} = 7$.

Dacă se dizolvă diferite substanțe în apă, acest echilibru poate fi tulburat, ceea ce duce la o modificare a pH-ului.

NOTĂ! Nu încercați să mențineți pH-ul la o cifră strictă. Să presupunem că pH-ul soluției = 6.0 și noi cel puțin o schimbăm, o calibrăm înapoi la 6.0. NU FACEȚI ACEST LUCRU! Ar trebui menținute doar valorile extreme din acest interval de 5.5-6.5. Prin urmare, nu va fi preferat nici un element.

Foarte des, pH-ul este confundat cu aciditatea și alcalinitatea apei. Este important să înțelegem diferența dintre acestea. pH-ul este un indicator al intensității, dar nu și al cantității. Cu alte cuvinte, pH-ul reflectă gradul de aciditate sau alcalinitate al mediului, în timp ce aciditatea și alcalinitatea caracterizează conținutul cantitativ al substanțelor din apa capabilă să neutralizeze alcalii și, respectiv, acidul. De exemplu, punând mâna în apă, putem spune ce fel de apă este - rece sau fierbinte, dar nu vom putea determina cât de multă căldură este în ea (și anume, cât timp această apă se va răci).

În funcție de pH, viteza reacțiilor chimice, gradul de agresivitate corozivă a apei, toxicitatea poluanților etc. pot varia.

Metode de determinare a pH-ului.

Mai multe metode sunt utilizate la scară largă pentru a determina pH-ul soluțiilor. Indicele de hidrogen poate fi estimat aproximativ prin indicatori sau poate fi determinat analitic prin efectuarea titrării bazei acide.

- Indicatorii acizi principali. Indicatorii acido-bazici - substanțele organice – coloranții, a căror culoare depinde de pH-ul mediului sunt utilizați în mare măsură pentru a estima aproximativ concentrația ionilor de hidrogen. Printre cei mai bine-cunoscuți indicatori se numără turnesolul, fenolftaleina, metiloranjul și alții. Schimbarea culorii fiecărui indicator apare în propriul interval de aciditate, de obicei fiind de 1-2 unități.

- Metoda ionometrică. Determinarea pH-ului se bazează pe măsurarea unui milivoltmetru - ionometria EMF a unui lanț galvanic, care include un electrod special al cărui potențial depinde de concentrația de ioni H^+ în soluția înconjurătoare. Metoda are o comoditate și precizie ridicată, în special după calibrarea electrodului indicatorului în intervalul de pH selectat, permite măsurarea pH-ului soluțiilor opace și colorate și, prin urmare, este utilizată la scară largă.

- Metoda analitică volumetrică. Titrarea acidă principală oferă, de asemenea, rezultate precise ale determinării acidității soluțiilor. Se adaugă o soluție de concentrație cunoscută (titrant) în mod optim la soluția de testare. Când sunt amestecate, are loc o reacție chimică.

Cum se calibrează corect aparatul pentru măsurarea pH-lui

Electrozii pH nu sunt un sistem ideal. Pot avea lungimi diferite, formă geometrică imperfectă, defecțiuni ale compoziției electrolitului intern etc. Toate acestea le afectează caracteristicile și, în același timp, sunt destul de normale, întrucât există anumite toleranțe în orice producție. Prin urmare, fiecare aparat pentru măsurarea pH-lui necesită calibrare, care ajută instrumentul să stabilească relația dintre semnalul electrodului și valoarea pH-ului din soluție.

Calibrarea este un moment foarte important! Este necesar să înțelegem imposibilitatea măsurării pH-ului cu o precizie mai mare decât standardele utilizate. De exemplu, dacă doriți să lucrați cu o precizie de 0,01 pH, atunci sunt necesare următoarele condiții: eroarea totală a aparatului pentru măsurarea pH-ului și a electrodului nu trebuie să depășească 0,005 pH, iar calibrarea trebuie efectuată cu atenție deosebită pentru soluțiile tampon speciale de înaltă precizie. Nu puteți cumpăra aceste soluții deoarece acestea nu pot fi stocate. Ele trebuie să fie pregătite personal de dumneavoastră, folosind reactivi special pregătiți și apă.

Dacă nu este posibilă pregătirea unui tampon cu o precizie de $\pm 0,005$ pH, atunci vom lucra cu soluții tampon, a căror precizie este asigurată la un nivel de $\pm 0,02$ pH. Prin calibrarea cu ajutorul unor astfel de standarde, eroarea totală nu va depăși 0,04-0,03 pH, cu condiția ca eroarea instrumentului să fie la nivelul de 0,01 pH.



Electrozii pH moderni sunt în general combinați, și anume electrodul pH și electrodul de referință. Pe lângă ușurința utilizării, aceasta oferă un răspuns mai rapid și reduce eroarea generală.

Punctul izoelectric pentru astfel de electrozi este la nivelul de $\text{pH} = 7$ (0 mV). Prin urmare, instrumentul trebuie calibrat pe un tampon cu pH neutru (de exemplu de 6.86 sau 7.01). Al doilea punct trebuie selectat la o distanță de aproximativ 3 unități pH, adică $\text{pH} = 4$ sau 10. Dacă instrumentul este calibrat doar pe două tampoane, alegerea celui de-al doilea punct depinde de intervalul în care lucrați de obicei. Dacă acestea sunt soluții alcaline, atunci trebuie utilizat un tampon de $\text{pH} = 10$, dacă acidă - $\text{pH} = 4$. Aceasta se datorează unei anumite diferențe în pantele liniilor de calibrare din zona acidă și alcalină. Nu va exista nici o problemă dacă dispozitivul poate fi calibrat pentru trei sau mai multe puncte. În acest caz, ordinea de calibrare nu este importantă, deoarece aparatul pentru măsurarea pH-ului îl monitorizează pe cont propriu.

Cele mai avansate modele de aparate pentru măsurarea pH-lui au așa-numitul suport GLP, care, pe lângă data ultimei calibrări, permite estimarea stării electrodului pe baza datelor privind raportul dintre panta curbei de calibrare și valorile teoretice (59,16 la 25°C) în%. Dacă instrumentul nu are suport GLP, dar are un mod de măsurare mV, panta poate fi calculată independent prin măsurarea valorilor mV din tampon $\text{pH} = 7$ și $\text{pH} = 4$.

De exemplu:

$\text{pH} 7 = -10 \text{ mV}$

$\text{pH} 4 = +150 \text{ mV}$

$\text{pantă} = 150 - (-10)/59,2 \times 3 = 90,1\%$

95-102% - un electrod în stare de lucru;

92-95% - un electrod trebuie curățat;

mai puțin de 92% - trebuie să schimbați electrolitul sau să înlocuiți electrodul.

Un punct important în funcționarea adecvată a aparatului pentru măsurarea pH-ului este compensarea modificărilor de temperatură. Această problemă este una dintre cele mai importante și mai dificil de soluționat în măsurarea pH-ului.

Eroarea de măsurare are loc din trei motive:

- ecuația Nernst include temperatura;
- concentrațiile de echilibru ale ionilor de hidrogen din tampon și eșantioane variază în funcție de temperatură;
- caracteristicile electrodului pH depind de temperatură.

Potrivit ecuației Nernst, panta teoretică a curbei de calibrare se modifică cu temperatura. În cazul în care instrumentul nu ia în considerare această modificare, atunci la eroarea de măsurare se adaugă o eroare de 0,003 pH pentru fiecare grad Celsius și fiecare unitate pH din punctul izopotential.

De exemplu:

Instrumentul este calibrat după tampon $\text{pH} = 7$ la 25°C .

Eșantion cu $\text{pH} = 5$ la 20°C , eroare = $0,003 \times 5 \times 2 = 0,03$

Eșantion cu $\text{pH} = 2,5$ la 2°C , eroare = $0,003 \times 23 \times 4,5 = 0,31$

Eșantion cu $\text{pH} = 12$ la 80°C , eroare = $0,003 \times 55 \times 5 = 0,82$

2. Este mult mai dificil să se compenseze modificările în concentrațiile de echilibru ale ionilor de hidrogen din eșantioane cu modificările de temperatură. Problema este că, fără a cunoaște compoziția chimică exactă a eșantionului, este imposibil de anticipat natura acestor modificări. Când temperatura se

schimbă cu 25-30 de grade, pH-ul se poate schimba cu 0,5-1 unitate. Aparatele generale de laborator pentru măsurarea pH-ului nu iau în considerare acest factor și acesta nici nu poate fi luat în considerare, deoarece soluțiile sunt foarte diferite. Soluțiile tampon nu sunt excepții:

Temperatura	Valoarea pH-ului				
C	4,01	6,86	7,01	9,18	10,01
0	4,01	6,98	7,13	9,46	10,32
10	4,00	6,92	7,07	9,33	10,18
20	4,00	6,88	7,03	9,22	10,06
25	4,01	6,86	7,01	9,18	10,01
30	4,02	6,85	7,00	9,14	9,96
50	4,06	6,83	6,98	9,01	9,82
70	4,12	6,85	6,99	8,93	9,75

Pentru a obține cele mai bune rezultate, aparatul pentru măsurarea pH-ului trebuie calibrat în astfel de cazuri:

- La utilizarea regulată, cel puțin o dată pe săptămână
- Dacă nu este utilizat, o dată pe lună
- Dacă presupuneți că măsurătorile sunt incorecte
- Dacă sunt testate lichide agresive (foarte acide sau foarte alcaline)
- Dacă sunt testate lichide pe un interval larg de măsurare
- După înlocuirea electrodului

Întreținerea adecvată a aparatului pentru măsurarea pH-ului

Deși există metode obișnuite de întreținere a aparatelor pentru măsurarea pH-ului, pot exista cerințe specifice pentru fiecare marcă și model. Este necesar întotdeauna să fie respectate instrucțiunile aparatului pentru măsurarea pH-ului și apoi acesta poate fi folosit pentru o perioadă mai lungă de timp.

Pe lângă frecvența calibrării, îngrijirea adecvată a electrodului de pH va asigura o durată mai lungă de funcționare și rezultate mai precise. Mulți electrozi ai aparatelor pentru măsurarea pH-ului constau dintr-un bulb de sticlă cu senzor intern, care trebuie ținut într-o soluție specială. La utilizarea unui aparat portabil pentru măsurarea pH-ului, soluția de stocare trebuie să fie în capacul protector al dispozitivului. Turnarea acestei soluții din capac nu este permisă... ceea ce este cu adevărat necesar! Pentru majoritatea electrozilor aparatelor pentru măsurarea pH-ului, este foarte important ca aceștia să fie depozitați într-un mediu umed cu o soluție de stocare adecvată.

Pentru a curăța majoritatea electrozilor aparatelor pentru măsurarea pH-ului, este suficientă spălarea acestora în apă distilată (deionizată). Îndepărtați surplusul de apă și puneți înapoi electrodul în soluția umedă de stocare. Dacă soluțiile de măsurare pot contamina suprafața electrodului, utilizați o soluție de detergent sau chiar lăsați electrodul acolo pentru mai mult timp.

1.5 Metode optice de analiză

Metodele optice de analiză se bazează pe utilizarea fenomenului emisiei de radiație electromagnetică de către atomii sau moleculele substanței testate sau pe interacțiunea radiației electromagnetice cu materia. Întrucât natura radiației depinde de compoziția calitativă și cantitativă a substanței, aceasta permite analizarea substanțelor.

Radiația electromagnetică din intervalul optic - radiație optică (ușoară). Termenul combină radiațiile vizibile de lumină, infraroșii și ultraviolete.

Metodele fotometrice de analiză care se bazează pe absorbția radiației în gama vizibilă a spectrului, adică în intervalul lungimii de undă de 400 - 780 nm, au devenit cele mai răspândite. Acest lucru se datorează posibilității de a obține mulți compuși organici și anorganici de culoare intensă, adaptați determinării lor fotometrice în regiunea vizibilă a spectrului cu ajutorul dispozitivelor destul de simple și relativ ieftine.

În funcție de natura interacțiunii substanței cu radiația electromagnetică, metodele optice se împart în:

- absorbție (bazată pe măsurarea absorbției de către o substanță cu radiație ușoară). Acestea includ colorimetria, fotolorimetria, spectrofotometria, metodele de absorbție atomică;
- emisie (bazată pe măsurarea intensității luminii emise de o substanță). Acestea includ fluorimetria, analiza spectrului de emisie.

Metodele optice de analiză suscită utilizarea dispozitivelor moderne de complexitate variabilă, ceea ce oferă o serie de avantaje în comparație cu metodele chimice clasice: viteza, simplitatea tehnicii, utilizarea unei cantități mici de substanță pentru analiză, capacitatea de a analiza compuși de orice natură. În plus, acestea sporesc sensibilitatea, acuratețea și reproductibilitatea rezultatelor.

1.5.2 Colorimetrele fotoelectrice

Analiza fotometrică se bazează pe absorbția selectivă a radiației electromagnetice din diferitele secțiuni ale spectrului unui sistem. Analiza fotometrică cu utilizarea radiației monocromatice se numește metoda spectrofotometriei de absorbție.

În funcție de structură, în analiza fotometrică se disting metodele fotocolorimetrice și spectrofotometrice de analiză.

Metodele fotocolorimetrice măsoară absorbția culorii soluțiilor, implică utilizarea instrumentelor și măsurătorilor simple.

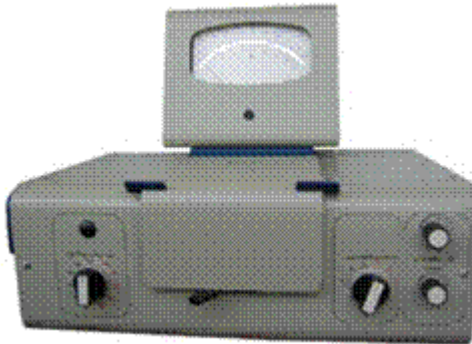
Colorimetrele de concentrație fotoelectrică (CCF) sunt concepute pentru a măsura transmisia și densitatea optică a soluțiilor lichide transparente și a probelor solide, precum și pentru a determina concentrația de substanțe în soluții după precalibrarea dispozitivelor de consum.

Intervalul spectral CCF este între 315 și 990 nm. Sursa de radiație sunt lămpile cu halogen; receptorul de radiație sunt fotodiodele.

Principiul funcționării colorimetrelor de acest tip se bazează pe comparația fluxului luminos care trece prin solventul sau soluția de control pentru care se efectuează măsurarea și fluxul luminos care trece prin mediul de testare.

Fluxurile luminoase ale fotodetectorilor sunt convertite în semnale electrice, care sunt procesate de microcalculatorul colorimetrului și sunt prezentate pe placa digitală sub formă de indice de transmisie, densitate optică, concentrație.

Măsurarea concentrației soluției de testare este posibilă cu respectarea legii fundamentale privind absorbția luminii, adică, cu o dependență liniară a densității optice de concentrație.



Măsurătorile pe colorimetru trebuie efectuate la o temperatură ambiantă între 10-35°C, cu o umiditate a aerului de 50-80%.

În apropierea colorimetrului nu ar trebui să existe surse puternice de câmpuri electrice, magnetice, surse puternice de lumină și dispozitive de încălzire.

Nu este permisă incidența luminii solare directe asupra colorimetrului.

Stabilirea lungimilor de undă trebuie realizată prin aducerea undelor scurte la cele mai lungi.

Suprafețele de lucru ale cuvetei trebuie șterse bine cu un amestec de alcool-ester înainte de fiecare măsurare.

În momentul instalării cuvetei în suportul cuvetei, este interzisă atingerea suprafețelor de lucru. Lichidul este turnat în cuvetă după marcajul de pe partea laterală a cuvetei. La instalarea suportului cuvetei, nu înclinați cuvetă cu lichid. Închideți cuvetă cu capacul. După schimbarea foto-filtrului și după găsirea colorimetrului cu capacul secțiunii cuvetei lăsați-l deschis pentru mai mult de 5 minute, măsurările vor începe după 5 minute de menținere a foto-detectorului cu capacul secțiunii cuvetei închis.

După lucru, instrumentul trebuie să fie oprit.

Alegerea unui filtru

Prezența în colorimetru a nodului filtrelor și a setului cuvetei permite alegerea unei astfel de combinații, în care va fi cea mai mică eroare în determinarea concentrației.

Selectarea filtrului se realizează în modul ce urmează:

- turnați soluția în cuveta și determinați densitatea optică pentru toate filtrele de lumină ale colorimetrului;
 - conform datelor obținute, desenați o curbă, plasând de-a lungul axei orizontale lungimile de undă corespunzătoare transmisiei maxime a filtrelor și de-a lungul axei verticale - valorile corespunzătoare ale densității optice a soluției;
 - marcați secțiunea curbei pentru care sunt adevărate următoarele condiții: densitatea optică are o valoare maximă; cursul curbei este aproximativ paralel cu axa orizontală, adică densitatea optică depinde puțin de lungimea de undă.
- Lungimea de undă care corespunde transmisiei maxime a filtrului cade pe curba spectrală a soluției de încercare, pentru care sunt îndeplinite condițiile menționate anterior.

Alegerea unei cuvete

Alegerea preliminară a cuvetei se face vizual, în funcție de intensitatea culorii soluției. Dacă soluția este colorată intens (închisă), utilizați o cuveta cu o lungime mică de lucru (1-3 mm). În cazul soluțiilor slab colorate, se recomandă să lucrați cu celule cu o lungime de lucru mai lungă (30-100 mm).

Turnați soluția în cuveta preselectată și măsurați densitatea optică prin introducerea filtrului adecvat în rază.

Când se măsoară o serie de soluții din cuveta, umpleți-o cu o soluție de concentrație medie. Dacă densitatea optică rezultată este de aproximativ 0,3 - 0,5, selectați această cuveta pentru a lucra cu această soluție. Dacă această condiție nu este îndeplinită, trebuie testată o altă cuveta. În cazul în care valoarea densității optice măsurate este mai mare de 0,5-0,6, luați cuveta cu o lungime de lucru mai mică, dacă valoarea densității optice este mai mică de 0,3-0,2, atunci ar trebui să selectați o cuveta cu o lungime de lucru mai mare.

Măsurarea concentrației unei substanțe în soluție

Trebuie să efectuați următoarele operații: selectați lungimea de undă; alegeți o agregată; faceți un grafic de calibrare pentru substanță; măsurați concentrația substanței în soluție.

Pentru a construi un grafic de calibrare, este necesar să pregătiți o serie de soluții standard ale acestei substanțe cu concentrații cunoscute, acoperind gama de modificări posibile ale concentrațiilor acestei substanțe în soluția de testare.

Măsurați densitatea optică a tuturor soluțiilor și faceți un grafic de calibrare, prin trasarea concentrațiilor cunoscute de-a lungul axei orizontale și a valorilor corespunzătoare densității optice care corespund cu axa verticală.

Ar trebui să se asigure că dependența concentrației de densitatea optică este liniară, și anume, exprimată în grafic printr-o linie dreaptă.

Tunați soluția de testare în cuvete de aceeași lungime de lucru cu care s-a efectuat calibrarea, stabiliți lungimea de undă corespunzătoare λ și măsurați densitatea optică a soluției.

1.5.3 Spectrofotometria

O metodă de analiză bazată pe determinarea spectrului de absorbție sau măsurarea absorbției luminoase la o anumită lungime de undă, care corespunde curbei de absorbție maxime a substanței testate. Analiza se efectuează prin absorbția substanțelor de radiație monocromatică în regiunile vizibile, ultraviolete și în apropierea zonelor infraroșii ale spectrului.

Spectrofotometria este utilizată pentru identificarea compușilor, investigarea compoziției, structurii și analizelor cantitative ale substanțelor individuale și sistemelor multicomponente. Curba de absorbție a lungimii de undă sau a numărului de undă se numește spectrul de absorbție al substanței. Această curbă este o caracteristică specifică a unei anumite substanțe. Analiza calitativă a substanțelor prin spectrul lor de absorbție se realizează în două moduri:

- prin parametri cunoscuți ai spectrului de absorbție a substanței testate;
- prin compararea spectrului de absorbție al unei soluții de substanță standard cu o soluție a substanței testate cu aceeași compoziție.

Spre deosebire de determinările fotocolorimetrice, nu numai soluțiile colorate, ci și cele incolore pot fi analizate în spectrofotometrie. În acest caz, analiza nu se efectuează în regiunile vizibile, ci în regiunile UV sau IR ale spectrului.

Principalul tip de instrumente pentru spectrofotometrie sunt spectrofotometrele, în care, spre deosebire de fotoelectrocolorimetre, monocromatizarea nu este asigurată de filtre, ci de niște dispozitive optice speciale, așa-numite monocromatoare, care permit modificarea continuă a lungimii de undă a radiației electromagnetice care trece prin soluție. Tipuri de monocromatoare (foto-filtre):

- adsorbție: diminuarea luminii prin absorbția fluxului luminos de către materialul filtrului;

- dispersie: reducerea luminii prin schimbarea indicelui refractiv a substanței filtrului;
- interferență: lucrul se bazează pe fenomenul interferenței unui fascicul paralel, reflectat de două oglinzi, localizate la o lungime de undă.

Monocromatoarele sunt sisteme optice care emit secțiuni strânse de frecvențe sau lungimi de undă a spectrului optic. Monocromatoarele sunt caracterizate de:

- lățimea de bandă - intervalul lungimilor de undă în care intensitatea luminii care trece prin monocromator este mai mare de jumătate din intensitatea luminii la lungimea maximă de undă;
- lărgimea fantei - intervalul lungimilor de undă care cad pe un monocromator (fanta de intrare) și ies din acesta și cad în eșantion (fanta de probă).

Este necesar să se efectueze cercetări la fantele minime înguste. Rezoluția spectrofotometrului este îmbunătățită semnificativ prin utilizarea unui monocromator dublu: anume, dacă există două monocromatoare conectate consecutiv într-un singur dispozitiv, în care golul de ieșire al primului servește drept gol de intrare a celui de-al doilea. Acest lucru poate reduce semnificativ lumina împrăștiată.



Pentru a lucra în zona vizibilă a spectrului utilizați cuvete din sticlă, care utilizează cuarț în apropierea razelor UV. Pentru analiza continuă a soluțiilor utilizați cuvetele de debit.

La efectuarea măsurărilor, trebuie să se ia în considerare faptul că cea mai mică eroare de măsurare a densității optice este observată la o valoare numerică a densității optice de aproximativ 0,4. La o densitate optică mai mare de 0,8, este necesar să se utilizeze cuvete cu o lungime a stratului de absorbție mai scurtă sau să se dilueze soluția de testare. Dacă densitatea optică este mai mică de 0,1, este necesar să se utilizeze cuvete mai lungi.

La calculare în spectrofotometrie se utilizează metoda graficului de calibrare. Preparați o serie de diluări ale soluției standard (C_{st}), măsurați densitatea optică (A_{ST}), faceți reprezentarea grafică $A_{ST} - C_{ST}$. Apoi măsurați densitatea optică a soluției analizate și determinați grafic concentrația acesteia.

În analiza spectro-fotometrică, ca în fotocolorimetrie, este necesar să se creeze condiții optime pentru a obține o anumită precizie și reproductibilitate a rezultatelor.

1.6 Spectroscopia atomică

Metodele spectroscopiei atomice sunt metode de analiză bazate pe măsurarea stării energetice a atomilor de substanțe. Acestea diferă după modul în care este recepționat și înregistrat semnalul, iar necesitatea pentru pre-atomizarea mostrelor este obișnuită. Atomii de substanțe care se evaporă într-o flacără emit sau absorb lumină de o anumită lungime de undă. Prin intensitatea benzilor din spectru, se poate determina numărul elementelor chimice individuale din eșantion.

- Spectroscopia de absorbție atomică bazată pe absorbția atomică a radiației de la o sursă externă.
- Spectroscopia de emisie atomică se bazează pe emisia atomică a radiației excitate prin utilizarea diferitor surse externe (arc, scânteie, flacără, plasmă).
- Metoda spectroscopiei de fluorescență atomică de analiză elementală cantitativă pe spectrul atomic de fluorescență. Proba de analit este convertită într-un vapor atomic și iradiată pentru a excita fluorescența prin radiația care este absorbită doar de atomii elementului determinat (lungimea de undă a radiației corespunde energiei electronice a atomilor respectivi). O parte a atomilor excitați emite lumină (semnal analitic) înregistrată de spectrofotometre. De obicei este utilizată fluorescența de rezonanță (lungimile de undă a luminii absorbite și emise sunt aceleași). Pentru atomizarea soluțiilor se utilizează flacără, plasmă cuplată inductiv sau atomizatori electrotermici (tuburi de grafit, filamente, tije încălzite electric).

Analiza spectrală de absorbție atomică (flacără) este o metodă de analiză realizată prin absorbția selectivă a luminii de către atomii unei substanțe convertite într-o stare gazoasă atomică. Radiația de la o

sursă de lumină care trece prin gaze de materie la frecvențe care coincid cu frecvența de tranziție a electronului de la nivelul de bază la cel mai apropiat de acesta este absorbită (linia de rezonanță) și este determinat gradul de atenuare a liniilor spectrale ale elementului care face obiectul studiului, concentrația acestuia în eșantion. Intensitatea absorbției luminoase prin metoda de absorbție atomică este determinată de *legea lui Beer-Lambert - Bouger*:

$$D = \lg(I_0/I) = k l C,$$

unde D este densitatea optică (absorbție); I_0 este intensitatea de ieșire a luminii excitante; I este intensitatea luminii care trece prin eșantion; k este coeficientul de absorbție; l este grosimea stratului de absorbție; C este concentrația elementului care urmează să fie determinat. Coeficientul de absorbție k , proporțional cu probabilitatea tranziției de rezonanță, nu depinde de temperatură. Atomizarea eșantioanelor necesită o temperatură de $\sim 2000 - 3000^\circ\text{C}$. Atomizatorii de flacără, atomizatorii electrotermici, precum și Frecvența Înaltă și descărcarea cuptorului cu microunde se utilizează în acest interval de temperatură, dar, cel mai adesea, sunt substanțele ignifuge care operează pe un amestec de acetilenă și protoxid de azot. În acest interval de temperatură, peste 90% din atomi nu se află în stare excitată, astfel încât alți atomi și molecule nu pot afecta coeficientul de absorbție. Acest fapt, împreună cu numărul mic de linii de absorbție, face ca această metodă să fie extrem de selectivă. Sursa de lumină emite un spectru liniar care conține linia necesară a elementului determinat. Lămpile cu catod cavită, lămpile cu descărcare în gaz fără electrozi, un laser reglabil sunt utilizate ca surse de radiație. Un dezavantaj semnificativ al metodei de absorbție atomică, în comparație cu metoda de analiză spectrală a emisiilor atomice, este incapacitatea de a detecta simultan mai multe elemente din eșantion și necesitatea determinării secvențiale a acestora. Tehnica de efectuare a analizei absorbției atomice, în comparație cu alte metode de analiză spectrală atomică, este mult mai simplă și permite de a determina până la 70 de elemente cu o sensibilitate de $\sim 10^{-4} - 10^{-9}\%$ din greutate nu doar de concentrații scăzute, ci și de concentrații mari în eșantioane. În prezent, metoda Analizei Spectrale a Absorbției Atomice este considerată una dintre cele mai selective, rapide, productive, precise și, în același timp, relativ ieftine metode.

Analiza spectrală de emisie atomică (spectrometrie), ASEA este un set de metode elementare de analiză, bazate pe studiul spectrului de emisie al atomilor și ionilor liberi în faza gazoasă. În mod tipic, spectrele de emisie sunt înregistrate în cel mai convenabil interval optic de lungimi de undă cuprinse între ~ 200 și ~ 1000 nm (spectroscopia în vid este necesară pentru înregistrarea spectrelor în regiunea < 200 nm pentru a elimina absorbția aerului de unde scurte; pentru a înregistra spectrele în regiunea > 1000 nm sunt necesare detectoare speciale infraroșii sau cu microunde).

Proba substanței testate este introdusă în sursa de radiație, unde are loc evaporarea acesteia, disocierea moleculelor și excitarea atomilor (ionilor). Atomii emit radiații caracteristice care pătrund în dispozitivul de înregistrare al dispozitivului spectral.

La ASEA de înaltă calitate, spectrele eșantioanelor sunt comparate cu spectrele elementelor cunoscute indicate în atlasele și tabelele corespunzătoare liniilor spectrale și, astfel, stabilesc compoziția elementală a analitului. În analiza cantitativă, cantitatea (concentrația) unui element din analit se determină în funcție de mărimea semnalului analitic (negreala sau densitatea optică a liniei analitice de pe plăcuța fotografică; fluxul luminos la receptorul fotoelectric) al acestui element din conținutul său din probă.

Excitarea atomilor apare atunci când unul sau mai mulți electroni se deplasează la un nivel energetic mai îndepărtat. În starea neexcitată, atomul are cea mai mică energie E_0 . Într-o stare excitată (instabilă), un atom poate rămâne pentru o perioadă foarte scurtă de timp ($\approx 10^{-7} - 10^{-8}$ s) și tinde întotdeauna să ocupe o stare normală. În acest caz, atomul eliberează excesul de energie sub formă de radiație fonică.

Sensibilitatea și acuratețea ASEA depinde în principal de caracteristicile fizice ale surselor de excitare ale spectrelor, cum ar fi temperatura, concentrația de electroni, timpul de ședere al atomilor în zona de excitare a spectrelor, stabilitatea modului sursă etc.

$$I = a + c$$

unde a este coeficientul care depinde de condițiile procesului;
 c este concentrația elementului din probă.

Spectroscopia emisiilor atomice cu plasmă cuplată inductiv. Elementele emit o cantitate de lumină cu o anumită lungime de undă atunci când acestea sunt excitate și ionizate cu tranziția ulterioară către o stare stabilă. Prin determinarea lungimii de undă, puteți efectua o analiză calitativă și prin determinarea intensității emisiilor – una cantitativă.

Principalele componente ale dispozitivului pentru această analiză sunt: sistemul de alimentare a probelor, atomizatorul, unitatea de atomizare a probelor (torță cu plasmă cuartică), camera optică și detectorul. Sursa de atomizare și excitare în această metodă este plasmă cuplată inductiv.

Avantajul metodei este capacitatea de a reglementa cu ușurință condițiile de atomizare și de excitare, și anume, este posibil să se găsească condiții care să asigure determinarea simultană a multor elemente. Dezavantajul acestei metode este consumul foarte mare de gaz de argon (arzător cu plasmă). De asemenea, este nevoie de argon cu o puritate de cel puțin 99,99%.



Principiul desfășurării tuturor metodelor de spectroscopie atomică:

2. Efectuați prelevarea probelor (selecți o parte a substanței din obiectul analizei, care reflectă compoziția sa chimică cât mai mult posibil).
3. Selecți o probă dintr-o probă solidă, dizolvați-o în solvenți potriviți pentru a converti elementul de testare în soluție. Prelevați un alicot lichid din proba lichidă și preparați o soluție de lucru pentru analiză în conformitate cu aceleași principii.
4. Preparați o serie de soluții de calibrare de lucru care să cuprindă intervalul de calibrare necesar.
5. Pregătiți spectrometrele pentru înregistrarea semnalului în condiții optime ale elementului studiat.
6. Introduceți analitul în atomizator, creați un strat absorbant de vapori atomici și faceți măsurători.
7. Soluțiile de calibrare sunt introduse secvențial în atomizator și se obține caracteristica calibrării (relația funcțională dintre semnalul analitic și concentrația elementului din soluția de calibrare).
8. Cu ajutorul acesteia determinați concentrația elementului de testare din soluția de probă și din proba originală.

1.7 Metode cromatografice de analiză

Cromatografia este un vast domeniu de metode de analiză fizico-chimice care combină atât metodele de concentrare și separare, cât și metodele de identificare și cuantificare a diferitor substanțe.

Metodele cromatografice au un loc special printre metodele eficiente de analiză analitică, deoarece sunt foarte utilizate din cauza versatilității lor. Acestea ne permit să analizăm un complex de substanțe anorganice și organice în stare gazoasă, lichidă și chiar solidă. Ultimele metode cromatografice pot fi utilizate pentru analiza substanțelor gazoase, solide și lichide cu o greutate moleculară cuprinsă între 1 și 106. Aceasta este una dintre cele mai importante metode analitice.

Cromatografia este o metodă analitică hibridă care combină separarea și determinarea.

Spre deosebire de alte metode bazate pe distribuția componentelor între faze, cromatografia este o metodă dinamică care asigură multiplicitatea proceselor de sorbție-desorbție ale componentelor separate, deoarece separarea are loc în fluxul de fază mobilă. Acest lucru se datorează eficienței ridicate a metodei cromatografice în comparație cu metodele de sorbție și extracție.

Cea mai comună definiție a cromatografiei este metoda fizico-chimică de separare a substanțelor, care se bazează pe distribuția componentelor între două faze - staționară și mobilă.

Faza staționară este un adsorbant solid cu o suprafață dezvoltată sau o folie de lichid adsorbită pe un purtător solid; funcția fazei staționare este adsorbția, reținerea substanțelor. Faza mobilă este debitul de gaz sau lichid care curge (filtrat) prin stratul sorbent, funcția fazei mobile este de a dizolva substanțele și de a le muta.

Analiza cromatografică este un criteriu pentru omogenitatea unei substanțe. Dacă, în orice mod cromatografic, analitul nu este separat, acesta este considerat omogen (fără impurități).

Diferența fundamentală dintre metodele cromatografice și alte metode de analiză fizico-chimice este capacitatea de a separa proprietățile strâns corelate ale substanțelor. După separare, componentele substanței

pot fi identificate (determinate după natură) și cuantificate (masă, concentrație) prin orice metodă chimică, fizică și fizico-chimică.

Cromatografia este utilizată în laboratoare și industrie pentru analiza calitativă și cantitativă a sistemelor multicomponente, controlul producției, în special în legătură cu automatizarea multor procese, precum și pentru separarea preparativă (inclusiv industrială) a substanțelor individuale (de exemplu, a metalelor prețioase), separarea elementelor lichide și dispersate.

În unele cazuri, cromatografia în combinație cu alte metode fizico-chimice și fizice, cum ar fi spectrometria de masă, spectroscopia IR, UV etc., este utilizată pentru identificarea substanțelor. Principalele avantaje ale analizei cromatografice:

- determinarea expresă;
- eficiență ridicată;
- posibilitatea automatizării și obținerii unor informații obiective;
- asocierea cu alte metode fizico-chimice;
- o gamă largă de concentrații de compuși;
- capacitatea de a studia proprietățile fizico-chimice ale compușilor;
- efectuarea analizei calitative și cantitative;
- cererea de control și reglementarea automată a proceselor tehnologice.

Există diferite tipuri de clasificare a metodelor cromatografice:

1. După starea agregată a fazelor (primul cuvânt din această clasificare caracterizează starea agregată a fazei mobile).

- Cromatografie gaz-lichid
- Cromatografie gaz-solid (adsorbție de gaz)
- Cromatografie lichid - lichid
- Cromatografie lichid-solid (adsorbție de lichid)
- Cromatografie lichid-gel

2. Prin natura interacțiunii, care cauzează distribuția componentelor între faza eluentă și cea staționară (și anume, natura interacțiunii dintre sorbent și sorbat).

- Cromatografia de adsorbție. Separarea se bazează pe diferențele în capacitatea de adsorbție a substanțelor separabile de adsorbantul solid (corp solid cu suprafață dezvoltată);
- Cromatografia de repartiție. Separarea se bazează pe diferențele de solubilitate a substanțelor în faza staționară (cromatografia de gaze) și pe diferențele de solubilitate a substanțelor în faza mobilă și staționară;
- Cromatografia de schimb ionic. Separarea se bazează pe diferențele în capacitatea de separare a substanțelor la schimbul de ioni;
- Filtrarea cu gel sau cromatografia de excluziune (cromatografia de gel-permeație, cu filtrare cu gel). Este un tip de cromatografie în timpul căreia moleculele substanței sunt separate de dimensiune datorită capacității lor diferite de a pătrunde în porii fazei staționare. Cele mai mari molecule (cu o greutate moleculară mai mare) sunt primele care părăsesc coloana, capabile să pătrundă în numărul minim de pori din faza staționară. Substanțele cu dimensiuni mici de molecule sunt ultimele care pot pătrunde liber în pori. Spre deosebire de cromatografia de adsorbție, în cazul filtrării cu gel, faza staționară rămâne inertă din punct de vedere chimic și nu interacționează cu substanțele separate.
- Cromatografia de sedimentare se bazează pe capacitatea diferită a componentelor de a se precipita în faza staționară solidă.
- Cromatografia complexă de adsorbție. Separarea se bazează pe formarea compușilor de coordonare cu diferite puncte forte în fază sau pe suprafața adsorbantului.

3. După starea agregată a eluentului:

- cromatografie de gaze (GC);
- cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC).

Cromatografia de gaze este o metodă de separare a componentelor volatile, în care gazul inert este faza mobilă (gazul purtător), care curge prin faza staționară cu o suprafață mare. Hidrogenul, heliul, argonul, dioxidul de carbon sunt utilizate ca fază mobilă. Gazul purtător nu reacționează în faza staționară și substanțele sunt separate. Există:

- cromatografia gaz-solid - faza fixă este un purtător solid (siliciu, cărbune, oxid de aluminiu).
- cromatografia gaz-lichid - faza fixă este lichidul de pe suprafața unui purtător inert.

Separarea se bazează pe diferențele de volatilitate și solubilitate (sau adsorbție) ale componentelor amestecului separabil. Această metodă este utilizată pentru separarea gazelor naturale, determinarea impurităților în aer, apă, sol, produse industriale; determinarea compoziției produselor sintezei organice și petrochimice de bază, gazelor de evacuare, drogurilor, precum și în medicina legală etc.



Cromatografia lichidă este una dintre cele mai avansate metode cromatografice pentru analiza multicomponentă. Caracteristicile sale distinctive sunt exprimarea, precizia mare și posibilitatea automatizării. Baza separării cromatografice este participarea componentelor amestecului separabil într-un sistem complex de interacțiuni van der Waals (de preferință intermoleculare) la interfața respectivă. HPLC este un grup de metode care includ separarea prealabilă a amestecului complex inițial în unul relativ simplu. Apoi amestecurile simple obținute sunt analizate prin metode fizico-chimice convenționale sau prin cromatografie lichidă.

O caracteristică a HPLC este utilizarea sorbenților cu presiune înaltă și fini cu granulație (de obicei 3-5 μm , chiar până la 1,8 μm). În conformitate cu mecanismul de separare a substanțelor analizate, HPLC se împarte în:

- cromatografia de adsorbție
- cromatografia de repartitie
- cromatografia de schimb ionic
- cromatografia de schimb de ligand



Cu toate acestea, în cadrul activității practice, separarea nu are loc deseori de una singură, ci de mai multe mecanisme în același timp. Această metodă este utilizată pentru analizarea, separarea și purificarea polimerilor sintetici, drogurilor, detergenților, proteinelor, hormonilor și altor compuși importanți din punct de vedere biologic. Utilizarea detectorilor extrem de sensibili permite lucrul cu cantități foarte mici de substanțe, care sunt extrem de importante în cercetarea biologică.

4. Prin natura tehnicii:

- **Cromatografia pe coloană.** Separarea substanțelor se realizează în coloane speciale. Sorbentul este umplut cu tuburi speciale - coloane, iar faza mobilă se deplasează în interiorul coloanei din cauza scăderii presiunii. Un tip de cromatografie pe coloană este capilară, atunci când se aplică un strat subțire de sorbent pe pereții interiori ai tubului capilar.

- **Cromatografia planară.** Cromatografia planară se divizează în cromatografia în strat subțire și pe hârtie. În cromatografia în strat subțire se aplică un strat subțire de sorbent granular sau peliculă poroasă pe o placă de sticlă sau metal; în cazul cromatografiei pe hârtie, se utilizează hârtie cromatografică specială. Cromatografia în strat subțire (TLC) și cea pe hârtie sunt utilizate pentru analiza grăsimilor, carbohidraților, proteinelor și altor substanțe naturale, precum și a compușilor anorganici.

Cromatografele sunt utilizate pentru analiză și pentru separarea preparativă (inclusiv industrială) a amestecurilor de substanțe. În analiza separării în coloana cromatografică a substanței, împreună cu eluentul, acestea cad într-un dispozitiv special instalat la ieșirea coloanei, așa-numitul detector, acesta înregistrează

concentrația în timp. Curba rezultată se numește cromatogramă. Pentru analiza cromatografică calitativă, se determină timpul dintre momentul introducerii eșantionului și ieșirea fiecărei componente din coloană la această temperatură și cu ajutorul unui eluent determinat. Pentru analiza cantitativă, se determină înălțimile sau zonele vârfurilor cromatografice, luând în considerare coeficienții de sensibilitate ai dispozitivului de detectare utilizat pentru analizi.

1.8 ELISA – testul imunoenzimatic

Testul imunosorbant legat de enzime (ELISA) este o metodă imunologică de determinare a prezenței anumitor antigeni prin reacție antigenă. Acesta este utilizat pe scară largă în cercetarea și diagnosticele clinice de laborator.

Această metodă este utilizată preponderent pentru supravegherea epizootică la scară largă și cercetare în implementarea programelor de control al bolilor. Este o metodă de testare de laborator extrem de sensibilă, specifică, simplă, rapidă și economică, care facilitează reproducerea și interpretarea rezultatului.

Există multe variante ale acestei metode, o varietate de principii obligatorii și o diversitate a condițiilor ELISA datorită diversității obiectelor studiate (de la compuși cu greutate moleculară scăzută, peptide și hormoni steroizi, preparate farmacologice, pesticide, până la viruși și bacterii, precum și la alți anticorpi). Cu o singură opțiune pentru înregistrarea activității enzimaticе, pot fi utilizate metode fotometrice, fluorometrice, bio - și chimiluminescente, iar senzorii electrochimici și microcolorimetrici au fost utilizați cu succes într-o serie de cazuri (în special în legătură cu problemele tehnologice).

1.8.2 Metode experimentale de determinare a activității enzimaticе

➤ Metoda fotometrică

Metoda fotometrică de înregistrare a activității enzimelor este cea mai frecventă în ELISA. Deoarece substraturile enzimelor, substanțele ale căror produse sunt compuși colorați sau, dimpotrivă, colorarea substraturilor se schimbă chiar în timpul reacției. Compușii colorați absorb lumina vizibilă, adică radiația electromagnetică cu lungimi de undă de 400-700 nm. Absorbția luminii respectă legea lui Beer – Lambert – Bouguer, conform căreia densitatea optică a unei soluții dintr-un anumit interval este direct proporțională cu concentrația substanței. Pentru măsurarea densității optice se folosește un spectrofotometru.

➤ Metoda fluorometrică

Recent, ELISA au devenit substraturi răspândite pe scară largă, care formează produse înregistrate prin metoda fluorometrică. Molecula din absorbția fotonului trece de la starea electronică de bază la cea excitată. Molecula excitată poate reveni la starea de bază, cu excesul de energie care intră în căldură, dar la nivelul solului poate exista un proces inversat de tranziție a electronilor, care este însoțit de eliberarea unei cuante de lumină, numită fluorescență. Din cauza pierderii parțiale de energie în tranziția moleculei de la starea excitată la lungimea de undă fundamentală a luminii, care este emisă întotdeauna mai mult decât lungimea de undă a luminii absorbite. Frația moleculelor care au trecut de la starea excitată la cea de bază cu emisie de lumină este determinată de randamentul cuantic ϕ . Intensitatea fluorescenței este proporțională cu cantitatea luminii absorbită de eșantion. Prin urmare, este direct proporțională cu concentrația substanței dizolvate și cu valoarea absolută a intensității inițiale a luminii, în timp ce în fotometrie se compară intensitățile relative adsorbite de eșantion. Acest fapt permite sporirea sensibilității determinării unei substanțe în soluție pentru 1-2 ranguri de magnitudine printr-o metodă fluorometrică în comparație cu una fotometrică.

➤ Bioluminiscența și chemiluminiscența

Reacțiile enzimaticе, a căror energie este realizată sub forma radiațiilor ușoare - reacția bio - și chemiluminescenței au fost utilizate ca sisteme de detectare în ELISA. Viteza acestor reacții este monitorizată de intensitatea luminozității sistemului de reacție, care este înregistrată de un luminometru. Reacțiile de bioluminiscență sunt catalizate de luciferazele de scioni și bacterii, iar reacția de oxidare a hidrazidelor ciclice cu peroxid de hidrogen (reacție de chemiluminescență) este catalizată de peroxidaza de hrean.

➤ Metoda electrochimică

Pentru determinarea activității enzimelor sunt, de asemenea, cunoscute metodele electrochimice, acestea sunt utilizate ca etichete în testele imunologice. Astfel de senzori vă permit să determinați rata reacțiilor enzimaticе în mediile turbide și acestea sunt convenabile pentru crearea celulelor enzimaticе care trec prin flux.

În cadrul testelor imunosorbante legate de enzime, atât enzimele, cât și substraturile acestora pot fi utilizate ca etichete ale antigenilor și anticorpilor. În cazul în care molecula enzimatică servește ca etichetă, atunci metoda de detecție aleasă trebuie să garanteze faptul că semnalul depinde proporțional de concentrația

enzimei și, în cazul etichetei substratului, de concentrația substratului. În primul caz, enzima acționează ca un indicator (este legată covalent de o moleculă de antigen sau anticorpi), în al doilea este un detector (enzimă liberă). După efectuarea tuturor stadiilor imunochimice ale oricărei metode ELISA, este necesar să se stabilească concentrația componentei marcate cu enzime a reacției imunochimice, adică să se determine activitatea catalitică a enzimei din eșantion. Viteza reacției este determinată de concentrația indicatorului enzimatic din sistem. Trebuie remarcat faptul că ELISA se bazează întotdeauna pe o determinare comparativă în condiții identice ale eșantionului standard și măsurat și, prin urmare, cerința proporționalității vitezei și concentrației este mai dezirabilă decât obligatorie. Este suficient să existe o corespondență de unu la unu între cantitatea produsului format al reacției enzimatică și cantitatea enzimelor din sistem. Cu toate acestea, îndeplinirea condiției proporționalității într-un anumit interval de concentrații asigură o mai mare precizie a experimentului și permite construirea unui model teoretic care descrie metoda de optimizare a acestuia.

Enzimele utilizate ca etichete în testul ELISA.

Posibilitatea fundamentală de utilizare a enzimelor ca etichete în ELISA se datorează sensibilității extrem de mari a înregistrării enzimelor în soluție. Dacă prin metode spectrofotometrice convenționale sau fluorometrice se poate înregistra formarea produsului la o concentrație de 10^{-7} mol/l, atunci concentrația enzimei va fi de 10^{-13} mol/l.

Există o serie de cerințe generale pentru selectarea enzimelor ELISA. Cele mai importante sunt: 1. Specificitate ridicată și activitate catalitică specifică, care permite detectarea etichetei în concentrații mici; 2. Disponibilitatea enzimei, capacitatea de a obține preparate enzimatică suficient de pure care mențin o activitate mare după modificarea chimică la primirea conjugatului cu antigeni sau anticorpi; 3. Stabilitatea în condiții optime pentru interacțiunea antigenului cu anticorpii; 4. Simplitatea și sensibilitatea metodei de determinare a concentrației enzimelor.

1.8.3 Clasificarea metodelor ELISA

A fost dezvoltat un număr mare de diverse variante ELISA, care au diferențe fundamentale și minore. În mod tipic, din punctul de vedere al separării, metodele ELISA sunt transformate în eterogene și omogene, adică pe principiul îndeplinirii tuturor etapelor de analiză cu participarea unei faze solide sau numai în soluție.

Procesul primar din ELISA este faza „recunoașterii” compusului analizat specific la anticorpii săi. Întrucât procesul de formare a complexelor imunochimice are loc într-un raport strict cantitativ din cauza afinității, concentrațiilor componentelor și condițiilor de reacție, este suficient să se determine concentrația inițială a compușilor analizați este o evaluare cantitativă a complexelor imunitare formate. În cazul analizei antigenelor, există două abordări ale acestei evaluări:

1. Măsurarea directă a concentrației complexelor formate;
2. Determinarea concentrației de anticorpi liberi rămași (nereacționați).

Metodele clasice ELISA se bazează pe formarea de anticorpi în prezența antigenului precipitat (precipitat), însă, pentru înregistrarea vizuală a procesului de precipitație necesită concentrații mari de componente și timp de reacție îndelungat. În plus, rezultatele unei astfel de analize nu pot fi întotdeauna interpretate în mod unic și, în majoritatea cazurilor, sunt de natură calitativă sau semi-cantitativă. În plus, pentru mulți antigeni monovalenți (haptene), cum ar fi hormonii și compușii drogurilor, aceste metode nu sunt aplicabile. Indicarea formării complexului antigenic în soluție poate fi realizată prin introducerea unei etichete într-una dintre componentele inițiale ale sistemului de reacție, care este ușor detectată printr-o metodă fizico-chimică extrem de sensibilă corespunzătoare. Izotopul, enzimele, fluorescența, etichetele paramagnetice, care au făcut posibilă sporirea sensibilității metodelor imunochimice de milioane de ori și reducerea timpului de analiză la câteva ore, s-au dovedit a fi foarte convenabile în acest scop. Întrucât procesul de complexare este strict cantitativ, concentrația etichetei care face parte din complex este legată de concentrația inițială a antigenului.

- Testul ELISA eterogen în format de microplăci

Pentru a analiza eficiența complexării, este necesară curățarea complexelor de componentele libere. Această problemă este ușor de soluționat dacă o componentă a perechii de antigeni este legată ferm (imobilizată) de un purtător solid. Imobilizarea permite prevenirea agregării în soluție și realizarea separării

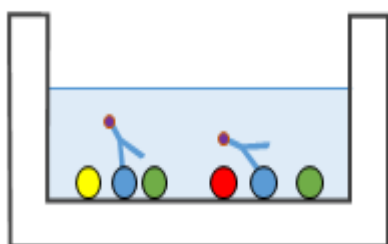
fizice a complexelor formate din componente libere. Utilizarea imobilizării anticorpilor pe un purtător solid a inițiat metodele ELISA în fază solidă (eterogenă).

Dezvoltarea anticorpilor și antigenilor plăcilor speciale din polistiren care conțin 96 de godeuri ca purtători pentru imobilizarea sorbției a avut o importanță specială pentru introducerea în practică a testului ELISA în faza solidă.

Testul ELISA eterogen (în fază solidă) în versiunea cu microplăci a devenit cel mai răspândit în sistemele de testare pentru studiile clinice de laborator. Ca fază solidă, se utilizează suprafața godeurilor microplăcii din polistiren, antigenii sau anticorpii cunoscuți (în acest caz - imunosorbant), care fac parte din sistemul de testare care este adsorbit. În timpul reacției specifice a imunosorbantului cu anticorpii sau antigenii specificați în proba de testare, se formează complexe imunitare, care sunt fixate în faza solidă. Substanțele care nu au participat la reacție, precum și excesele de reactivi, sunt îndepărtate prin spălare repetată. Acest sistem permite simplificarea procesului de separare efectivă a componentelor de reacție.

Testul *ELISA* direct. În imunotestul enzimelor directe, materialul introdus (antigen) este fixat în timpul incubăției la suprafața godeurilor curate. Cantitatea materialului de testare este detectată cu anticorpi până la găsirea antigenului cuplat cu o etichetă specifică care oferă o reacție enzimatică.

Principiul testului ELISA direct



cercuri multicolore - antigeni diferiți față de serul introdus în gaură
Y cu un punct mov - anticorpi marcați cu o enzimă care oferă o reacție de culoare (conjugată).

Schemă scurtă: **(Antigen) → Anticorp**

Deoarece eticheta specifică adăugată este legată de anticorpi, concentrația produsului de reacție colorată este egală cu concentrația de anticorpi. Iar concentrația de anticorpi este egală cu concentrația de antigeni.

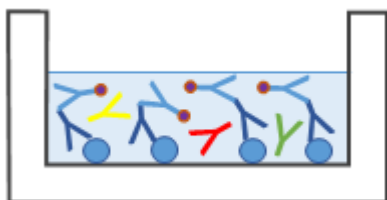
Testul *ELISA* indirect. În imunotestul enzimelor indirecte, se folosesc anticorpii la antigenul detectat asociat cu o etichetă specifică. Această etichetă specifică este substratul reacției enzimatic.

Se disting după tipul de interacțiune imunochimică din prima fază de analiză (în care se realizează legarea substanței care se determină) între metodele eterogene:

2. Metoda necompetitivă. Dacă sistemul conține doar compusul de testare și centrele de legare corespunzătoare (antigen și anticorpi specifici);
3. Metoda competitivă. În cazul în care un compus de testare și analogul acestuia (compus cu etichete enzimatic sau cu fază solidă imobilizat) sunt prezente în sistem în prima fază, concurând pentru un număr limitat de centre de legare specifice.

Testul *ELISA* indirect necompetitiv. Materialul biologic testat (serul sau plasma umană din sânge) este introdus în godeuri, pe a căror suprafață solidă este un antigen pre-adsorbit care conține anticorpi împotriva antigenului. Proba este testată pentru conținutul de anticorpi.

Principiul testului ELISA indirect necompetitiv



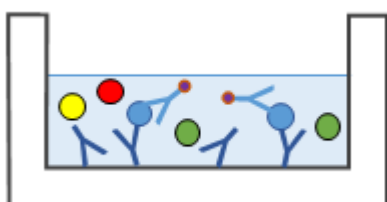
cercuri albastre - antigen imobilizat pe suprafața găurii;
Y, Y, Y, Y - anticorpi din serul introdus în godeu
Y cu un punct mov - anticorpi marcați cu o enzimă care oferă un răspuns de culoare (conjugat).

Schemă scurtă: **Antigen → (Anticorp) → Anticorp-K**

Prin urmare, diferența față de metoda directă este că anticorpii testați nu sunt lipiți de suprafața godeului curat și se leagă de antigenul imobilizat al comprimatului.

„Sandwich” este o variantă a testului ELISA eterogen indirect necompetitiv în care anticorpul acționează ca imunosorbant.

Principiul testului ELISA indirect necompetitiv „sandviș”



cercuri multicolore – antigeni diferiți față de serul introdus în gaură;
Y - imobilizat la suprafața anticorpilor godeului;
Y cu punct mov - anticorpi marcați cu o enzimă care oferă un răspuns de culoare (conjugat)

Schemă scurtă: **Anticorp → (Antigen) → Anticorp-K**

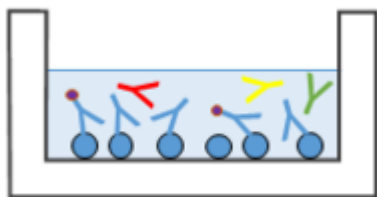
În etapa de detecție a unui anumit imunocomplex, antigenul care urmează să fie plasat în formă de sandwich între moleculele anticorpilor imobilizați și etichetați, a dus la răspândirea generalizată a metodei cu numele „sandviș”. În mod similar, sistemele de testare a anticorpilor funcționează, dar folosesc antigenul ca imunosorbant, iar conjugatul conține o soluție a antigenului etichetat de enzimă.

Competitiv. În cazul testului ELISA competitiv, antigenii sau anticorpii care sunt detectați concurează cu antigenii sau anticorpii conjugați cu etichete similare în locurile de legare la imunosorbant. Testele de acest tip sunt adesea folosite pentru a identifica antigenii prezenți în concentrații mari sau hormoni care au un singur centru de legare a antigenului.

Există două formate principale pentru sistemele testului ELISA competitiv: direct și indirect.

Testul ELISA competitiv direct. Se utilizează un antigen specific imobilizat într-o fază solidă, iar anticorpii marcați cu enzime și fără etichete concurează pentru legarea de antigenul imobilizat.

Principiul testului ELISA competitiv direct



cercuri albastre - imobilizate pe suprafața antigenului găurii;
Y, Y, Y, Y - anticorpi din serul introdus în godeu;
Y cu un punct mov - anticorpi marcați cu o enzimă care oferă un răspuns de culoare (conjugat).

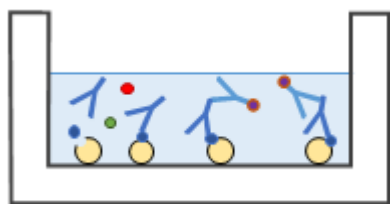
Schemă scurtă: **Antigen → (Anticorp) + Anticorp-K**

Astfel, cantitatea de semnal detectabil obținută de un test ELISA competitiv direct depinde invers de concentrația antigenului.

Avantajul unui sistem direct este numărul mic de măsuri care facilitează automatizarea analizei. Dezavantajele sistemului includ complexitatea metodelor de sinteză a conjugatilor enzimatici, precum și posibila influență a componentelor eșantionului asupra activității enzimei.

Testul ELISA competitiv indirect. Anticorpii antigeni specifici cu etichete enzimactice (specfici sau secundari) și purtătorul de antigen și proteină conjugată în fază solidă sunt imobilizați în testul ELISA competitiv indirect, una dintre cele mai frecvente scheme ELISA. Concurența are loc în etapa de legare a anticorpilor sau antigenilor din serul subiectului (liber, îndepărtat prin spălare) sau cu antigenul imobilizat în faza solidă (nu sunt îndepărtați). Apoi conjugatii de anticorpi marcați se afiliază la anticorpi și se determină densitatea optică. Aceasta înseamnă că, dacă nu există o substanță măsurabilă în probă, toți anticorpii se vor lega de antigenul imobilizat prin intermediul proteinei purtătoare de la suprafața godeului, în timpul spălării, aceștia vor rămâne în godeuri, iar semnalul detectat va fi ridicat. Dacă o mare parte din substanța măsurată este găsită în serul eșantionului de testare (va fi în stare liberă în soluție), o parte a anticorpilor se va lega de respectiva substanță și o parte va fi imobilizată; anticorpii în stare liberă (legați de antigen în afara serului) vor fi eliminați prin spălare, iar semnalul detectabil care va oferi anticorpi asociați cu imobilizarea în antigenul găurii, va fi scăzut, deoarece o parte din anticorpi sunt eliminați în timpul spălării.

Principiul testului ELISA competitiv indirect



cercuri mari de culoare galbenă - antigen și proteină conjugată imobilizate pe suprafața găurii;
cercuri mici, roșii, verzi și albastre sunt antigeni diferiți de serul introdus în gaură (de exemplu, droguri);
Y sunt anticorpi fără etichete specifici pentru un anumit antigen;
Y cu un punct mov este un anticorp secundar anti-specie etichetat cu o enzimă care oferă un răspuns de culoare (conjugat).

Schemă scurtă: **Antigen-K** → (**Anticorp**) + **Antigen** → **Anticorp-K**

Magnitudinea semnalului detectabil este invers proporțională cu concentrația determinată de antigen.

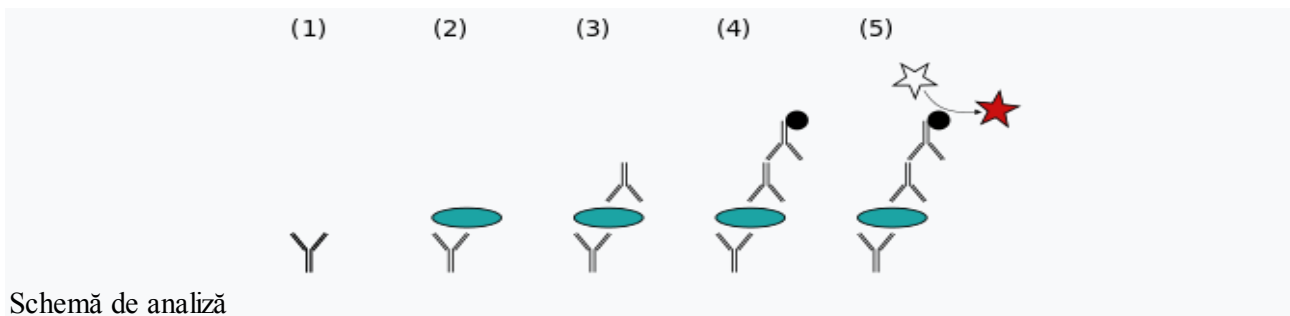
▪ Testul ELISA omogen

În 1972, Rubenschetin și personalul său au dezvoltat o nouă abordare pentru a efectua o analiză fără fază solidă. Metoda a fost denumită testul ELISA omogen (în engleză „EMIT” - tehnica de imunoanaliză multiplicată enzimatică) și s-a bazat pe examinarea diferențelor dintre proprietățile catalitice ale etichetei enzimatică în formă liberă și în complexul imunochimic. Principiul metodei este legarea unui antigen cu greutate moleculară scăzută de lizozimul enzimatic din apropierea centrului activ. În asociere cu anticorpii, centrul activ devine steril inaccesibil pentru substratul macromolecular, care reprezintă pereții celulelor bacteriene. Pe măsură ce concentrația de antigen este determinată, concentrația complexului inactiv de anticorpi conjugat scade și, prin urmare, parametrul de răspuns enzimatic a înregistrat creșteri. Pe baza acestei abordări, au fost elaborate pachete pentru identificarea unei game largi de produse toxice, medicamentoase și medicinale. Un avantaj semnificativ al analizei EMIT este capacitatea de a utiliza volume mici din eșantionul analizat (5-50 μl) și o viteză mare de determinare (2-5 min) datorită absenței stadiului de separare a compușilor analizați liberi și etichetați. Dezavantajele metodei includ o sensibilitate mai scăzută decât cea din testul ELISA eterogen (~ 1 μg/ml) și capacitatea de a detecta doar antigeni cu greutate moleculară scăzută.

Recent au fost dezvoltate noi variante ELISA care conțin reactivi neinfecțioși pe baza proteinelor virale recombinante p32, p54 și pp62. De asemenea, acestea demonstrează o sensibilitate și specificitate ridicată în studiul serului sanguin, chiar și la o calitate scăzută.

Principiul de bază al testului ELISA este reacția antigen-anticorp. Dacă antigenul (molecula țintă) este o proteină, atunci preparatul purificat al acestuia este utilizat de obicei pentru producerea anticorpilor, care contribuie apoi la detectarea țintei.

Există o serie de abordări pentru a determina dacă a avut loc legarea anticorpului de antigenul țintă. Unul dintre acestea este testul imunosorbant legat de enzime (ELISA), acesta este adesea utilizat pentru diagnosticarea unei varietăți de antigeni.



Schemă de analiză

1. Pregătirea unui tampon pentru fixarea probei;
2. Proba în care urmează să fie detectată o moleculă sau un microorganism specific se fixează pe un tampon solid, de exemplu, pe o placă de microtitrare din plastic, cu 96 de godeuri;

3. La proba fixă se adaugă un anticorp specific moleculei de marker (anticorp primar), apoi godeul se spală pentru a îndepărta moleculele de anticorpi primari care nu s-au legat;
4. Se adaugă un anticorp secundar care se leagă în mod specific de anticorpul primar și care nu interacționează cu molecula indicatorului. Un anticorp (de exemplu fosfataza alcalină, peroxidaza sau ureaza) este atașat la acest anticorp, care poate cataliza transformarea unui substrat incolor într-un produs colorat. Godeul se spală pentru a elimina moleculele nelegate;
5. Se adaugă substratul incolor recunoscut și utilizat de enzimă;
6. Determinarea calitativă sau cantitativă a produsului colorat se efectuează prin estimarea densității optice.

Testul imunosorbant legat de enzime este utilizat în mare măsură pentru diagnosticarea diferitor boli infecțioase, cancerului (în principal datorită anumitor proteine și peptide), determinarea concentrației diferitor compuși cu masă moleculară mică, cum ar fi toxinele, drogurile și altele.



1.9 Igiena și siguranța într-un laborator chimic

Normele privind siguranța, protecția muncii, supravegherea și reglementarea în domeniul manipulării în condiții de siguranță a substanțelor periculoase și a materialelor industriale sunt reglementate de un organism executiv central.

Condițiile pentru normele de siguranță din laboratorul chimic și igienă au fost discutate anterior. Secțiunea 1.1 „Pregătirea laboratorului pentru testare. Reguli de securitate.”

1.9.1 Echipamente de securitate

Testarea laboratoarelor ar trebui să asigure protecția confidențialității informațiilor și drepturilor de proprietate ale clienților săi, inclusiv procedurile de protecție a stocării electronice și de transmitere a rezultatelor. Laboratoarele au de asemenea echipamente de testare, de măsurare și auxiliare pentru efectuarea testelor. Prin urmare, fiecare șef de laborator urmărește să ofere protecție care să nu afecteze încrederea în competența, integritatea și conservarea proprietății de laborator prin instalarea sistemelor de securitate.

Sistemul de securitate este un complex automat pentru protecția diferitor obiecte de proprietate.

Clasificarea sistemelor de securitate:

1. prin interacțiunea cu amenințarea:

- Pasiv: un set de instrumente și acțiuni destinate atragerii atenției proprietarului sau serviciilor de securitate
- Activ: proiectat pentru a preveni penetrarea într-un obiect protejat sau sigur.

Pentru a organiza sisteme active este necesar să ne ghidăm de legislația în vigoare a țării. Dacă sănătatea atacatorului este afectată, atunci va avea loc un proces și ar putea fi inițiate proceduri penale.

1 După metoda de transmitere a informațiilor

- cu fir
- fără fir - senzorii de securitate transmit informațiile către dispozitivul receptor printr-un semnal radio.
- fără feedback

Dezavantajele sunt prezența multor modalități de a suprima semnalul radio de către „Generatoarele de Zgomot” speciale (și câteodată chiar și de aparatele de uz casnic obișnuite).

- cu un feedback cu receptor: permite monitorizarea continuă a tuturor senzorilor.

- Rețea prin GSM: utilizată atât pentru controlul la distanță (alarmă este transmisă la pupitrul companiei de securitate), cât și pentru informarea proprietarului obiectului protejat, care poate primi informații despre diverse evenimente (alarmă, incendiu, defecțiune etc.). ca un SMS la telefonul vostru mobil. În acest scop sunt utilizate comunicatoarele GSM.

Sistemele fără fir sunt de obicei utilizate în cazurile în care există posibilitatea de a produce cablaje. Uneori combină atât sistemele fără fir cu cele cu fir, cât și cele pasive cu cele active.

1.10 Gestionarea deșeurilor

Problema reciclării este relevantă în industrie. Unele întreprinderi caută ajutor de la companii specializate. Eliminarea trebuie să fie fără deșeuri și inofensivă atât pentru oameni, cât și pentru mediu.

Compușii chimici și amestecurile lor sunt toxice, active și multe dintre ele sunt inflamabile și explozibile. Evaporările produse de aceste substanțe volatile cauzează daune ireparabile oamenilor și naturii. Prin urmare, procesul trebuie abordat în conformitate cu normele de siguranță, inclusiv cu utilizarea echipamentelor individuale de protecție.

Clasificarea deșeurilor chimice:

Există multe tipuri de deșeuri chimice. În plus, determinarea deșeurilor de acest tip implică adesea substanțe organice frecvente contaminate cu orice substanță.

- deșeuri rezultate din producerea și utilizarea substanțelor alcaline și acizilor;
- deșeuri din produsele petroliere uzate și obținute din producția de petrol;
- deșeuri din producția vopselelor și solvenților;
- materiale chimice expirate;
- medicamentele expirate;
- produse de activitate ale laboratoarelor chimice;
- deșeuri pirotehnice și halogene;
- produse care conțin mercur;
- deșeuri de lemn care conțin impregnare chimică.
- alimente contaminate cu pesticide.

În funcție de gradul de gravitate al impactului asupra organismelor vii, toate deșeurile din industria chimică sunt divizate în 4 clase de pericol.

De ce ar trebui să eliminăm deșeurile chimice în mod adecvat? Orice grup de deșeuri chimice conține un set periculos de substanțe chimice și subproduse eliberate în timpul producției unui produs.

Interpretarea juridică a noțiunii de deșeuri chimice periculoase pe lângă CMP (concentrația maximă permisă) a substanțelor periculoase utilizează la scară largă acești termeni:

- iritabil;
- toxic;
- explozibil și inflamabil;
- cancerigen;
- coroziv.

Potrivit legislației din aproape toate țările lumii, deșeurile care conțin asemenea substanțe ar trebui neutralizate și eliminate obligatoriu. Dacă acest lucru nu se întâmplă, substanțele dăunătoare care se descompun treptat pot provoca daune ireparabile tuturor ființelor vii de pe planetă.

Eliminarea adecvată a deșeurilor chimice periculoase începe printr-un proces de sortare amănunțit. Substanțele care pot reacționa în contact apropiat trebuie separate. A doua etapă a demarării reciclării este depozitarea separată a acestora în recipiente închise etanș, fără posibilitatea interacțiunii între ele și mediul înconjurător.

Orice producător, care folosește reactivi chimici pentru nevoile sale trebuie să dețină un document, care să confirme permisiunea de utilizare, așa-numitul pașaport pentru deșeuri periculoase (PPD). În conformitate cu cerințele acestui document puteți alege o metodă sigură de eliminare. Pentru situațiile nestipulate în PPD, se aplică teste suplimentare.

Pe lângă eliminarea reactivilor reziduali din laboratoare, conductele, efluenții de canalizare trebuie curățați periodic de depunerile deșeurilor nocive.

Legea privind producerea și consumul deșeurilor stabilește în detaliu normele privind eliminarea deșeurilor industriale periculoase, precum și a reactivilor chimici care și-au pierdut proprietățile de lucru din cauza termenului de expirare al acestora.



Cea mai bună soluție pentru laboratoare este încheierea unui acord de furnizare a serviciilor de reciclare de către companiile specializate.



La eliminarea deșeurilor dintr-un laborator, regulile de manipulare a reactivilor trebuie respectate cu strictețe. Metodele de procesare a deșeurilor:

1. Neutralizarea chimică pentru transformarea unei substanțe chimice dăunătoare într-o masă neutră.
2. Tratatamentul termic în camere speciale fără acces aerian.

Responsabilitatea pentru eliminarea necorespunzătoare a deșeurilor chimice.

Normele de eliminare a substanțelor dăunătoare sunt strict reglementate de Legea „Cu privire la protecția mediului”. Încălcarea legii implică responsabilitatea legală pentru făptași. Iar consecințele pot fi foarte grave, conform pedepselor penale.

Rigurozitatea legislației este ușor explicată de pericolul nerespectării normelor de eliminare pentru sănătatea umană și mediu.

Amenzi pentru nerespectarea cerințelor privind eliminarea deșeurilor chimice.

1. Compensații pentru daunele aduse mediului și recuperarea sănătății persoanelor sau animalelor afectate.
2. Penalități administrative, în funcție de daunele provocate.
3. Întreruperea temporară a activității pentru o perioadă maximă de 3 luni.
4. Înghețarea activelor laboratoarelor cu confiscarea ulterioară a acestora.

Eliminarea deșeurilor chimice reprezintă o afacere serioasă și responsabilă. Și aceasta ar trebui să fie tratată în mod corespunzător.

Capitolul 2. Bazele activității la laboratorul biologic

2.1 Clasificarea laboratoarelor în funcție de nivelurile de periculozitate

Nivelurile de siguranță biologică a laboratoarelor microbiologice și cerințele de bază pentru activitatea acestora. OMS s-a oferit să clasifice toate laboratoarele microbiologice în ceea ce privește

scopul, designul, echipamentul, instrumentele pe care le utilizează, practicile și procedurile operaționale pentru a lucra cu microorganismele ce aparțin diferitor grupuri de risc. Există 4 tipuri de laboratoare: Nivel de biosiguranță de bază 1 (BSL – 1), Biosiguranță de referință 2 (BSL – 2), Nivel de biosiguranță de izolare 3 (BSL – 3) și Nivel de biosiguranță maximă izolată 4 (BSL – 4). Se crede în mod eronat că, dacă microorganismul este atribuit unui anumit grup, este necesar un laborator cu același nivel de biosiguranță pentru a lucra în siguranță cu acesta. Cu toate acestea, pe baza cerințelor anumitor proceduri și altor factori, este mai bine să se utilizeze un nivel de biosiguranță mai ridicat sau mai scăzut.

Laboratorul cu Nivelul de Siguranță Biologică 1 (BSL-1). Nivelul de biosiguranță 1 este adecvat pentru lucrul cu microorganismele bine studiate, care nu provoacă boli umane și prezintă un pericol minim pentru personalul de laborator și mediu. De cele mai multe ori laboratoarele BSL–1 sunt laboratoare educaționale. Acestea nu vor fi separate de încăperile clădirii. Lucrul în laboratoarele BSL–1 se efectuează de obicei prin metode microbiologice standard. Nu sunt necesare condiții speciale pentru întreținerea echipamentelor sau instalațiilor.

În laboratoarele BSL-1 se utilizează măsurile obișnuite de igienă. Toți lucrătorii laboratorului ar trebui să fie în halate. Pe picioare trebuie să fie încălțăminte închisă. Dacă pe mâini sunt răni proaspete, este mai bine să îmbrăcați mănuși în timpul fabricării medicamentelor, colorării acestora, precum și în timpul lucrului cu substanțe chimice periculoase. Pentru a îndeplini procedurile standard de laborator în cazul respectării normelor de igienă, nu se utilizează mănuși. Igiena mâinilor trebuie efectuată imediat după finisarea lucrului și contactul cu microorganismele, spălându-le cu săpun și soluție hidro-alcoolică.

Podeaua, pereții și suprafețele întregului mobilier trebuie să fie netede și intacte. Laboratorul trebuie să aibă o chiuvetă pentru spălare. Ușa trebuie să fie încuiată. De asemenea, este necesar să se prevină dăunătorii în laborator. Bunurile personale sunt depozitate în afara zonei de lucru. Autoclavele trebuie să fie în laborator.

Pentru a lucra în laborator, puteți utiliza doar culturi obținute de la laboratoarele de referință etc. Se interzice utilizarea microorganismelor alocate din mediu, deoarece acestea pot fi organisme care necesită practica și echiparea BSL-2. Disponibilitatea informațiilor din document privind originea, proprietățile și circulația microorganismelor.

Înainte de a ieși din laborator, este necesar să vă spălați pe mâini, mesele trebuie tratate cu conservant înainte și imediat după lucru. Pentru circulația microorganismelor în laborator, trebuie utilizate tuburi de transport și trepiede, iar culturile trebuie păstrate într-un container etanș, după manipularea acestora.

Laboratorul cu Nivelul de Siguranță Biologică 2 (BSL-2). Nivelul de biosiguranță 2 se bazează pe BSL–1. BSL – 2 este adecvat pentru gestionarea agenților care reprezintă un pericol moderat pentru personal și mediu. Personalul laboratorului trebuie să aibă o pregătire specială în ceea ce privește colaborarea cu agenții patogeni. Accesul la laborator este limitat. Procedurile în care pot fi generați aerosoli infecțioși sau pulverizări sunt efectuate în boxe de siguranță biologică. Pentru dezinfecția și stocarea în siguranță a agenților biologici se aplică proceduri speciale.

În laboratoarele BSL-2 se folosesc numai ochelari de protecție și măști pentru față în timpul lucrului în condiții de picături și aerosoli, care sunt efectuate în afara secțiilor de siguranță biologică utilizate. În timpul lucrului într-un cabinet de siguranță biologică, nu se utilizează ochelari și ecrane de protecție/măști pentru față. Sunt disponibile îmbrăcăminte și încălțăminte specială, mănuși (numai în timpul lucrului cu microorganismele sau substanțele chimice cu nivelul 2 de risc, atunci când pielea mâinilor este afectată).

Trebuie să existe o ușă cu control de acces în laboratorul BSL–2. Ferestrele care se deschid în exterior trebuie echipate cu ecrane de protecție împotriva insectelor și rozătoarelor. Este necesar să se prevină intrarea dăunătorilor în laborator. Bunurile personale sunt depozitate în afara zonei de lucru. În laborator trebuie să existe autoclave. Accesul la laboratoarele BSL–2 este limitat. Personalul de laborator trebuie supus unui control sanitar și imunizării contra agenților cu care lucrează în laborator, dacă este necesar. Toate procedurile cu materialele care pot duce la formarea aerosolilor trebuie efectuate în boxe de siguranță biologică.

Laboratorul cu Nivelul de Siguranță Biologică 3 (BSL-3). Nivelul de biosiguranță 3 este utilizat în zonele clinice în care se lucrează cu agenți locali sau exotici, ceea ce poate duce la boli severe sau potențial letale cu mecanismul de transmitere respiratorie. Personalul laboratorului ar trebui să aibă o pregătire specială pentru a lucra cu agenți patogeni și care ar putea pune în pericol viața. Toate procedurile legate de materialele infecțioase trebuie să se desfășoare în boxe de siguranță biologică.

Nivelul de Biosiguranță 3 se bazează pe BSL-2 și pe măsuri suplimentare. Laboratorul ar trebui să fie separat de celelalte părți ale instalației. Accesul în laborator este restricționat și trebuie să fie prin două uși care se încuie. Schimbarea hainelor are loc în vestibulul dintre cele două uși. Laboratorul ar trebui să aibă o zonă separată unde se vor afla echipamentele și consumabilele curate, dușurile. Pe ușa laboratorului trebuie

să fie o fereastră de observare. Laboratorul ar trebui să aibă chiuvete automate pentru spălarea mâinilor localizate în apropierea ușii de ieșire sau în fiecare zonă de lucru. Laboratorul este proiectat pentru a fi ușor de curățat și de dezinfectat. Podeaua este antiderapantă, rezistentă la apă și la substanțe chimice. Suprafața pereților și plafoanelor trebuie acoperită cu materiale sigilate și netede ușor de curățat și de dezinfectat. Mobilierul laboratorului trebuie acoperit cu materiale capabile să reziste la dezinfectant și trebuie aranjat astfel încât să poată fi îndepărtat cu ușurință. Toate geamurile din laborator trebuie să fie oarbe. Boxele de siguranță biologică nu trebuie să fie în fața geamurilor și ușilor. Este obligatorie prezența unui sistem de ventilație în flux. Sistemul de ventilație trebuie să fie echipat cu filtre HEPA. Personalul laboratorului trebuie să schimbe mănușile după contaminare/încălcarea integrității acestora (dacă este necesar, persoana poartă două perechi de mănuși) EPI sunt utilizate în camerele în care sunt ținute animale infectate.

Laboratorul cu Nivelul de Siguranță Biologică 4 (BSL-4). Nivelul de biosiguranță 4 este utilizat pentru a lucra cu agenți periculoși și exotici, care prezintă un risc individual și social ridicat, aceștia sunt transmiși pe cale respiratorie, iar tratamentul și prevenirea acestor boli nu este dezvoltată. Agenții cu o structură antigenică similară cu agenții care necesită BSL-4 trebuie tratați, de asemenea, în laboratoarele cu acest nivel de securitate. Tot personalul de laborator și supraveghetorii trebuie să fie autorizați să lucreze cu agenți BSL-4.

Sunt două tipuri de laboratoare BSL-4: 1) toate manipulările cu agenți se efectuează în cabine de biosiguranță de clasa III (boxe de laborator); 2) toate manipulările cu agenți se efectuează în costume de protecție, care sunt sub presiune pozitivă (costume de laborator).

Locul de muncă trebuie sigilat cu posibilitatea fumigării acestuia. Lucrătorii de laborator trebuie să poarte salopete. Dacă este necesar, laboratorul poate fi echipat cu un cuptor pentru arderea carcaselor de animale.

Toate persoanele care intră în laborator trebuie avertizate cu privire la pericolul potențial și despre regulile de părăsire a laboratorului. În laborator pot intra persoanele care sunt implicate în cercetări științifice sau în lucrul de sprijin. Orice persoană care intră sau iese din laborator își înregistrează numele și ora. Personalul ar trebui să intre și să iasă din laborator cu schimbarea obligatorie a tuturor hainelor și după duș. Personalul de laborator și personalul de deservire va fi supus examinării medicale și vaccinării obligatorii. Trebuie să existe un izolator pentru lucrătorii din laborator. Materialele care intră în laborator trebuie să fie pre-decontaminate într-o cameră cu autoclave/fumigare cu două uși. Trebuie efectuată verificarea tuturor sistemelor vitale, iar starea acestora trebuie să fie documentată înainte de a începe lucrul.

2.2 Echipamente „mici” de laborator pentru laboratoarele microbiologice.

2.2.1 Microscopicele.

Dispozitivele optice speciale, microscopicele, sunt utilizate pentru studierea celulelor microorganismelor invizibile cu ochiul liber (din greacă micros- mic, scopeo - eu privesc), care măresc obiectele studiate de sute de ori (microscopice optice) și de sute de mii de ori sau mai mult (microscopice electronice). Morfologia și structura celulelor microorganismelor, creșterea și dezvoltarea acestora, identificarea primară a organismelor studiate, dezvoltarea cenzozelor (comunităților) microbiene în sol și alte substraturi sunt studiate în microbiologie cu ajutorul unui microscop optic. Structura submicroscopică a celulelor microorganismelor, formele necunoscute anterioare ale celor mai mici microorganisme sunt detectate în microbiologie cu ajutorul unui microscop electronic.

Structura microscopelor.

În practica microbiologică se utilizează microscopicele optice ale următoarelor mărci: MBR-1, BRM-1, BRM-2, BRM-3, BRM-6, Biolam R-1, etc. Acestea sunt concepute pentru a studia forma, structura, dimensiunea și alte caracteristici ale diferitor microorganisme a căror valoare nu este mai mică de 0,2 – 0,3 microni. Un microscop optic este format din două părți - optică și mecanică. Partea mecanică include un trepied, o platformă și un tub. Trepiedul constă dintr-o bază și un suport pentru tub fixat cu șurub. Trepiedul este îmbinat cu o cutie de mecanisme, un sistem de angrenaje pentru reglarea mișcării tubului. Sistemul este condus de rotația șuruburilor macrometrului și, respectiv, a micrometrului, concepute pentru o focalizare grosieră și precisă asupra specimenului. Atunci când șuruburile se rotesc în sensul acelor de ceasornic, tubul se deplasează spre specimen; atunci când se rotesc în sens invers acelor de ceasornic – tubul se deplasează dinspre specimen. Platforma servește pentru plasarea preparatului pe ea cu obiectul de studiu. Platforma poate fi mutată cu șuruburi în plan orizontal. Pentru iluminarea preparatului este o gaură rotundă de dedesubt cu fascicule de lumină direcționate de o oglindă microscopică în centrul platformei. Pe platformă sunt montate cleme cu doi poli (borne), plăcuțele cu arcuiri metalice sunt destinate pentru fixarea preparatului.

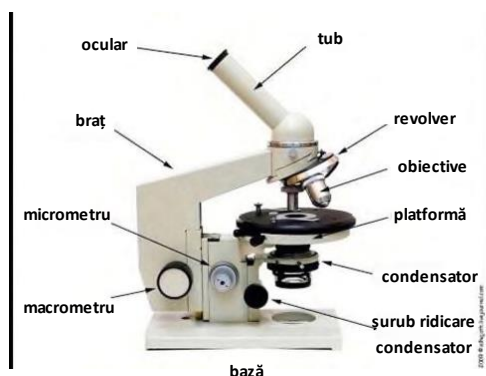


Fig. 1 Structura microscopului optic.

Tubul este un cadru în care sunt incluse elementele sistemului optic ale unui microscop. Un revolver (suporter de lentilă) cu sloturi de lentilă este atașat de partea inferioară a tubului. În partea superioară a tubului se introduce ocularul. Modelele moderne de microscopie au un tub înclinat cu un suport pentru tub în formă de arc, care asigură poziția orizontală a platformei. Partea optică a microscopului constă dintr-o unitate optică principală (lentilă și ocular) și un sistem auxiliar de iluminat (oglină și condensator cu diafragmă iris).

Oglinda reflectă lumina incidentă de pe ea și o direcționează într-un condensator pentru a ilumina preparatul. Oglinda are două suprafețe: plată și concavă, pliată în spate și inclusă într-un singur cadru inelar, montată pe o furculiță semicirculară. Cu ajutorul ei, oglinda se mișcă în orice direcție. Partea plată este utilizată la orice sursă de lumină și la orice amplificare. Partea concavă este utilizată la amplificări mici fără condensator și, de regulă, cu iluminare artificială. În unele cazuri, oglinda este înlocuită cu un iluminator staționar.

Condensatorul este un sistem optic din două până la trei lentile cu rază scurtă de acțiune pentru a îmbunătăți luminozitatea obiectului. Condensatorul concentrează fasciculele care vin dintr-o oglindă plată și le direcționează într-un unghi mare spre obiect. Lentilele condensatoare sunt montate într-un cadru cilindric conectat la un mecanism de angrenaj, care permite deplasarea condensatorului în sus și în jos de-a lungul axei microscopului cu un șurub special. La coborârea condensatorului, câmpul de vedere al microscopului este întunecat, când este ridicat, acesta este iluminat. Pentru a regla intensitatea iluminării, condensatorul este echipat cu o diafragmă iris (petală), compusă din plăci subțiri opace în formă de seceră. La deplasarea manetei diafragmei localizate în partea inferioară a cadrului condensatorului, plăcile pot fi mutate împreună și separat, schimbând treptat diametrul orificiului activ. În multe tipuri moderne de microscopie, un condensator și o sursă de lumină sunt montate într-un microscop.

Lentilele (din greacă Objectum - obiectul cercetării) sunt cea mai importantă parte a microscopului, în principal imaginea obiectului depinde de calitatea lor. Acestea sunt înșurubate în orificiile revolverului și constau dintr-un sistem de lentile inclus într-un cadru metalic. Lentila din față este cea mai mică și singura care dă amplificare. Restul lentilelor din obiective corectează doar imperfecțiunile imaginii rezultate și se numesc corective.

Lentilele se împart în lentile uscate și de imersiune. În timpul lucrului cu lentilele uscate, există aer între lentila din față și obiectul de studiu. În cazul utilizării lentilelor de imersiune, între lentila din față a dispersorului și obiectul de studiu trebuie să fie un lichid cu indice refractiv în apropierea indicelui refracției sticlei. În acest scop, cel mai bun este uleiul de imersiune (uleiul de cedar) cu un indice de refracție de 1.515 (indicele de refracție a sticlei de 1.52). Datorită acestor fascicule de lumină, acestea nu se refractă la trecerea de la sticlă la un strat de ulei de cedar (deoarece rămân într-un mediu omogen din punct de vedere optic) și pătrund în lentilă fără a fi reflectate.

Ocularul (de la Lat. Oculus - ochi) se inserează în partea superioară a tubului. Ocularul este un sistem de două lentile plane convexe spre lentilă. Lentila cu care se confruntă ochiul se numește oftalmică, în timp ce lentila cu care se confruntă preparatul se numește câmp sau lentilă colectivă. Scopul unei lentile de câmp este acela de a colecta fasciculele care vin de la lentilă astfel încât acestea să treacă printr-o mică gaură în lentila oculară. O lentilă oculară, ca o lupă simplă, mărește imaginea reală dată de lentilă. Distanța dintre lentile este egală cu jumătate din suma lungimilor focale ale acestora. Scopul ocularului este de a direcționa mărirea imaginărilor a imaginii reale inversate și lărgite pe care lentila o oferă. Ocularele sunt marcate cu numere care prezintă propria amplificare $\times 5$, $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. În timpul lucrului cu un microscop pentru o lungă perioadă de timp, trebuie să utilizați oculare duble - o duză binoculară.

Reguli de bază pentru lucrul cu un microscop

Pentru microscop se alege un loc ferit de lumina directă a soarelui. Lucrul la o masă cu o suprafață întunecată contribuie la reducerea oboselii ochilor. Se recomandă să priviți în ocular cu ochiul stâng și să nu-l închideți pe cel drept. În cazul lucrului cu o duză binoculară, distanța dintre oculare se ajustează mai întâi în funcție de distanța dintre ochii observatorului, astfel încât câmpurile vizuale ale ambelor oculare să se contopească într-unul singur. Microscopul trebuie dus cu două mâini: o mână trebuie să fie ținută de trepied, cealaltă să susțină baza microscopului. Este inadmisibil să înclinați microscopul într-o parte, deoarece ocularul poate cădea din tub. Microscopul ar trebui protejat împotriva șocurilor, contactului cu substanțe potente precum acizii și alcalii. Nu atingeți suprafața lentilelor, oglinzilor și filtrelor cu degetele. Nu se recomandă să scoateți ocularul din tub pentru ca tubul și lentilele să nu se murdărească cu praf. În timpul lucrului, este recomandabil să protejați microscopul de respirația voastră, deoarece condensarea vaporilor duce la deteriorarea acestuia. Microscopul trebuie protejat de praf, umiditate și păstrat într-o carcasă cu acoperire din sticlă sau acoperit cu pânză.

În timpul microscopiei preparatelor cu o lentilă uscată, ar trebui să luați anumite măsuri:

1. microscopul se plasează pe masa de lucru cu un suport pentru tub la o distanță de 3-5 cm de marginea mesei;
2. se pune o lentilă cu amplificare mică ($\times 8$) și la această amplificare se setează cea mai bună iluminare; cea mai bună iluminare se obține prin ajustarea poziției oglinzii, condensatorului și diafragmei; la vizualizarea preparatelor necolorate, se utilizează o diafragmă restrânsă și un condensator redus; atunci când se monitorizează preparatele colorate, se utilizează o diafragmă deschisă și un condensator ridicat. Câmpul de vedere al microscopului cu instalarea corectă a luminii va avea forma unui godeu și cerc luminat proporțional.
3. puneți preparatul pe platformă sub lentilă și fixați-l cu cleme;
4. coborâți cu atenție lentila ($\times 8$) cu un șurub macroscopic, păstrând partea laterală a lentilei, la o distanță de aproximativ 0,5 cm de platformă;
5. privind în ocular, întoarceți încet șurubul macroscopic în sus și ridicați tubul până când în câmpul de vedere apare imaginea obiectului de studiu. După aceea, lentila este focalizată prin rotirea șurubului micrometrului, astfel încât imaginea obiectului să fie clară. Șurubul micrometrului poate fi rotit nu mai mult de jumătate de viraj într-o direcție sau în alta pentru a preveni deteriorarea firului șurubului.
6. rotind tija, setați lentila cu o amplificare medie ($\times 20$; $\times 40$; $\times 60$);
7. când lucrul este finisat, trebuie să îndepărtați preparatul de pe platformă, să dați jos condensatorul, să plasați lentila $\times 8$ sub tub, să ștergeți microscopul cu o pânză moale și să-l puneți în carcasă.

În timpul lucrului cu o lentilă de imersiune, trebuie respectate următoarele reguli și proceduri:

1. așezați oglinda pe partea plată, ridicați condensatorul și reglați lumina sub amplificarea mică a microscopului (lentilă $\times 8$);
2. aplicați o mică picătură de ulei de imersiune în stratul preparat și colorat (fără a-l împrăști pe sticlă) și puneți preparatul pe platformă;
3. rotiți tija la marcajul 90 al lentilei de imersiune;
4. păstrând partea laterală, coborâți cu atenție tubul microscopului până când lentila din față a lentilei de imersiune se scufundă pe o picătură de ulei;
5. privind în ocularul microscopului și acționând cu un șurub macroscopic, ridicați încet tubul microscopului până când în câmpul de vedere va apărea obiectul studiat;
6. realizați focalizarea finală a preparatului cu șurubul micrometrului, rotindu-l într-o singură rotație;

7. la sfârșitul microscopiei, ridicați tubul, coborâți condensatorul, mutați tija pe o lentilă mică uscată $\times 8$, îndepărtați preparatul și ștergeți cu atenție lentila din față $\times 90$, mai întâi cu o pânză uscată de bumbac, apoi cu aceeași pânză, dar puțin umezită cu benzină sau alcool.

2.2.2 Autoclava

Autoclava este un vas cu pereți groși care funcționează sub presiune, cu un capac masiv, închis cu cleme cu șurub sau cu o bară specială. Autoclava este echipată cu un tub cu abur, un indicator de presiune, o supapă de siguranță și un indicator de nivel. Apa este încălzită cu lămpi electrice incandescente în spațiul din interiorul autoclavei, de unde aburul intră în planul de lucru. În autoclave se sterilizează mediile de culturi, laptele, vasele, articolele din cauciuc etc.. Înainte de sterilizare, apa distilată sau fiartă se toarnă în autoclavă printr-o pâlnie specială (după utilizarea apei nefierse se formează rapid depuneri) până la marcajul superior al indicatorului de nivel. Autoclava este încărcată cu materialul care urmează să fie sterilizat și este închisă etanș cu un capac, strângând șuruburile sau întorcând bara în sensul acelor de ceasornic.

Porniți autoclava, lăsând tubul deschis pentru a elibera aerul și aburul. Nu închideți tubul până când tot aerul din autoclavă nu este scos de abur, iar aburul curge într-un flux continuu. Dacă în autoclavă rămâne aer, efectul sterilizant va scădea, deoarece temperatura amestecului de abur și aer este mult mai scăzută decât temperatura aburului saturat.

Acul indicatorului începe să se ridice după închiderea robinetului. Când este atinsă presiunea dorită, gradul de încălzire al autoclavei se reduce astfel încât acul indicatorului de presiune se oprește la nivelul necesar. Începutul sterilizării este considerat momentul în care săgeata atinge presiunea dorită. Manometrul de presiune indică o temperatură specifică. La sfârșitul sterilizării, încălzirea este oprită, iar acul indicatorului de presiune scade la zero. Numai după ce supapa de aerisire cu abur este deschisă, atunci capacul este deșurubat și materialul sterilizat este îndepărtat.

Reguli de bază pentru lucrul cu Autoclava. Deschideți supapa care leagă cazanul de camera de sterilizare. Camera de sterilizare a autoclavei se încarcă cu materialul care urmează să fie sterilizat. Apa veche este turnată din autoclavă prin supapa inferioară care leagă cazanul de tubul de apă, iar apa nouă este turnată prin pâlnie până la linia roșie de pe tubul de apă. Capacul autoclavei este închis, înfiletat pe caroserie cu șuruburi, după care deschideți supapele de condensare și evacuare și porniți autoclava. Pe panoul de comandă al autoclavei, comutatorul a pornit poziția „Încălzire”. Bulele mari de aer încep să iasă cu un sunet de bolboroseală atunci când apa care fierbe din supapa de evacuare este coborâtă printr-o conductă de scurgere într-o găleată de apă. Apoi, doar un număr mic de bule mici constând din abur care nu au avut timp să se condenseze încep să iasă cu aburul. Apoi, un flux de abur pur uscat începe să iasă din tub cu o pocnitură ascuțită. Debitul jetului de abur corespunde punctului de fierbere al apei - 100°C . Acest punct indică eliminarea aerului din autoclavă. După aceasta, supapa de ieșire este închisă, tubul de ieșire este scos din găleata cu apă rece și presiunea este mărită până la valoarea necesară de 2 atm.

Începutul sterilizării este considerat a fi momentul în care acul indicatorului de presiune indică presiunea necesară. După aceasta, intensitatea încălzirii trebuie redusă astfel încât presiunea să nu mai crească. Pentru a face aceasta, întoarceți comutatorul în poziția „Sterilizare”. La sfârșitul timpului de sterilizare, comutatorul de pe panoul de comandă este setat în poziția „off”, autoclava este oprită, supapa care leagă camera de sterilizare de cazan este închisă și așteptați până când presiunea scade la presiunea atmosferică, iar săgeata va arăta zero pe indicatorul de presiune. Deschideți robinetul de evacuare a aburului și eliberați tot aburul. Deschideți capacul autoclavei, astfel încât aburul rămas să ajungă în partea laterală și să nu provoace arsuri. Materialul sterilizat este îndepărtat și condensatul format în camera de sterilizare este evacuat printr-un robinet de condensare, după care robinetul este închis. Nu deschideți supapa înainte de timp, deoarece mediile fierbinți fierb violent, nu umeziți și nici nu împingeți dopuri de bumbac, făcând mediile nesterile.

Nu deschideți încet robinetul la scufundarea conductei de scurgere într-un vas cu apă rece. În rezultatul diferenței de presiune creată, apa din găleată este aspirată în autoclavă (camera de sterilizare) și o blochează. Materialul sterilizat trebuie lăsat cu capacul autoclavei deschise pe jumătate, timp de 3-5 minute pentru a usca dopurile din bumbac din recipientele sau tuburile de testare. După lucru, apa este turnată din autoclavă. Aceasta trebuie păstrată uscată.

În mod regulat este necesar de verificat dacă indicațiile indicatorului de presiune corespund temperaturii din camera de sterilizare. Pentru a realiza aceasta, folosiți substanțe chimice pulverizate cu un punct de fuziune strict definit, amestecați-le cu o cantitate mică de vopsea (albastru de metilen, fucsină, safranină). Amestecul este turnat în tuburi mici, bine închise cu dop de plută și plasate în poziție verticală între materialul care urmează să fie sterilizat. Atunci când pulberea este distribuită, se formează un aliaj vopsit în culoarea vopselei adăugate. Următoarele substanțe sunt de obicei utilizate ca indicatori de temperatură:

Material	Punct de fuziune, °C
Benzonaftol	110
Antipirină	115
Flori de sulf	115
Rezorcinol pur	118
Acid benzoic	121

2.2.3 Termostatele

Tipuri de termostate de laborator

Termostatul de laborator este un dispozitiv care are ca principal scop obținerea și menținerea unei temperaturi stabile.

Acestea sunt dulapuri speciale care mențin o temperatură constantă, utilizate pentru cultivarea microorganismelor. Termostatele pot fi cu baie de aer cald și baie de apă. Primul dulap este încălzit cu aer cald care trece prin conducte sau cu încălzitoare electrice. În termostatele cu apă, între pereții dubli, apa este încălzită de curentul electric. Pentru a menține o temperatură setată cu precizie, termostatele sunt echipate cu termometre de contact.

Laboratorul trebuie să aibă patru termostate: la o temperatură de 25-30°C pentru cultivarea microorganismelor mezofile, de 40-45°C pentru cultivarea microorganismelor termofile, la temperaturi de 37°C și 43°C pentru detectarea și identificarea E. coli.

Baia de aer. Reprezentantul termostatelor de laborator cu aer este TVL-K120. Cu ajutorul său, dispozitivul menține temperatura necesară. Termostatul de laborator cu aer TVL-K120 este utilizat activ în timpul studiilor bacteriologice și serologice. Acestea sunt efectuate de laboratoarele de diagnostic clinic, de mediu și de cercetare. Pentru funcționarea normală a termostatului, temperatura aerului din cameră trebuie să se situeze între 10 și 35°C, iar umiditatea relativă nu trebuie să depășească 80%. Activitatea controlului microprocesorului permite obținerea stabilității termice cu o precizie mare. Termostatul de laborator TVK L cu răcire este un dispozitiv care are diferite modele care diferă după volumul de lucru, dimensiuni și greutate.

Termostatul cu aer uscat. Reprezentantul termostatelor cu aer uscat este TSvL-160. Este necesar să se obțină și să se mențină o temperatură stabilă în volumul de lucru, care este necesar pentru studiul tipurilor bacteriologice, microbiologice, sanitare-bacteriologice, virusologice și biochimice.

Termostatul cu apă. Termostatul de laborator reductazniltr 24 este cu apă. Are o capacitate suficientă pentru a fi utilizat în scopuri de cercetare. În acesta pot fi plasate 24 de tuburi de testare, 24 de butiometre, 24 de recipiente a căror diametru nu depășește 17 cm. Acesta poate menține o temperatură de până la +95 °C. Mostrele de lapte sunt încălzite și apoi măsurate într-un analizator special din acest tip de termostat cu apă. Acesta analizează grăsimile. Volumul camerei de lucru este de 8 litri, fiind fabricată din oțel inoxidabil șlefuit. Aceasta are, de asemenea, o unitate de control cu care se setează temperatura necesară și un ecran pentru modificări sau pentru modificarea modului de funcționare.

Termostatul cu circulație. Un termostat cu circulație are răcire cu aer sau apă. Este econom. Trebuie remarcat faptul că termostatul de laborator cu circulație este XP și, prin urmare, poate fi utilizat în camere de diferite tipuri.

Principiul de lucru al termostatului

Termostatele de laborator funcționează pe baza principiului răcirii aerului din interior cu ajutorul unui compresor de refrigerare. Dacă vorbim despre modelele cu aer uscat, acestea sunt caracterizate prin amestecarea forțată a aerului, astfel încât temperatura din interiorul camerei să fie distribuită în mod uniform.

Termostatele sunt periodic deschise, ceea ce duce la precipitarea diferitor microfloruri aeropurtate de pe suprafața pereților lor. Acestea sunt înseminate cu sporii de ciuperci microscopice și actinomicete atunci când sunt cultivate în vase Petri în cantități mari. Toate acestea duc la contaminarea culturilor microbiene pure cultivate în termostate și în special la placarea în cupe realizate din diferite obiecte de mediu: sol, apă, aer, lapte, carne. Aceste plăcări sunt ciuperci care formează adesea spori - mucor, aspergillus, peniciline.

Este necesar să sterilizați termostatul o dată pe săptămână pentru a preveni consecințele negative și pentru a obține rezultate nedaturate. Efectuați curățarea umedă în termostată și îndepărtați culturile din acesta.

După uscarea termostatului, luați o pensetă lungă și înfășurați-o cu vată de bumbac cu o spirală. Penseta cu vată se înmoaie în alcool și se aprinde. Alcoolul din flacăra șterge pereții termostatului și grilajelor. În zona de amplasare a termostatului trebuie să lucrați fără supraîncălzire. În caz de supraîncălzire, acesta ar putea exploda. După sterilizare termostatul este închis. Ușile sunt de asemenea șterse cu alcool dintr-o flacăra.

2.2.4 Desicatorul

Desicatoarele sunt utilizate pentru multe procese dintr-un laborator modern. Printre aceste procese se numără uscarea, condiționarea, vulcanizarea, incendiarea ușoară și alte operațiuni asociate cu tratamentul termic sau pregătirea preliminară a unui eșantion sau a unei substanțe.

Desicatorul este utilizat pentru sterilizarea vaselor, echipamentelor etc. cu căldură uscată. Desicatorul se încarcă atunci când este neîncălzit. Materialul care urmează să fie sterilizat este înfășurat cu atenție cu hârtie sau plasat în lăzi de metal (pipete, vase Petri). Vasele ar trebui să fie uscate, gâturile baloanelor și tuburilor se închid cu dopuri de bumbac. Materialul este plasat în dulap astfel încât să nu se atingă de pereți. Durata sterilizării la o temperatură de 160-170°C este de 2 ore (începutul sterilizării este considerat momentul în care temperatura din interiorul dulapului atinge 160°C). Materialul sterilizat este descărcat din desicator după ce este răcit.

2.2.5 Centrifugele

O centrifugă constă din trei componente principale:

- Rotor
- Arbore de acționare
- Motor

Rotorul este partea rotativă a centrifugii. În acesta se pun tuburi, sticle sau pungi conținând lichide care trebuie centrifugate. Rotoarele de diferite tipuri și dimensiuni sunt interschimbabile. Acestea sunt instalate pe arborele de acționare, care este conectat la motor. Motorul alimentează centrifuga cu energia necesară pentru rotația rotorului.

Pe perete sunt controale și indicatoare de viteză și timp. Majoritatea centrifugelor au un sistem de frânare care pune rotorul în repaus la scurt timp după încheierea lucrului său.

Există două configurații de centrifuge: pentru podea și masa de lucru. Diferența dintre cele două este în capacitate. Principiile de lucru sunt aceleași.

Metoda de centrifugare se bazează pe comportamentul diferit al particulelor într-un câmp centrifugal creat de o centrifugă. Eșantionul din vasul de centrifugare este plasat în rotor, care este condus de o unitate de centrifugare. Pentru a separa un amestec de particule este necesar să alegeți un set de condiții, cum ar fi viteza de rotație, timpul de centrifugare și raza rotorului. Pentru particulele sferice, viteza de depunere (sedimentare) depinde nu numai de accelerare, ci și de raza și densitatea particulelor, precum și de viscozitatea mediului în care este depus eșantionul.

Centrifugarea poate fi împărțită în două tipuri: preparativă și analitică. Centrifugarea preparativă este utilizată atunci când este necesară izolarea parțială a eșantionului pentru cercetări ulterioare. Această metodă este utilizată pentru izolarea celulelor de o suspensie, macromolecule biologice etc.

Centrifugarea analitică este utilizată pentru studierea comportamentului macromoleculelor biologice într-un câmp centrifugal. Această metodă vă permite să obțineți date despre masa, forma și dimensiunea moleculelor în volume relativ mici ale eșantionului. Centrifugarea preparativă este cea mai frecventă în lucrul de laborator de zi cu zi.

La rândul lor, centrifugele preparative de laborator sunt împărțite în grupe în funcție de scopul lor: ultracentrifuge preparative, centrifuge de uz general și centrifuge de mare viteză. În toate scopurile generale,

rotoarele sunt montate cu rigurozitate pe arborele de acționare, astfel încât capacitatea centrifugată să fie echilibrată cu acuratețe. Pentru a evita deteriorarea, nu încărcăți un număr impar de tuburi în rotor; dacă încărcarea este incompletă, rezervorul trebuie plasat în fața celui alt.



Centrifugele de mare viteză au o viteză maximă de 25 de mii de rpm și o accelerație de până la 89000g. Camera în care se află rotorul și eșantioanele centrifugate este echipată cu un sistem de răcire pentru a preveni încălzirea cauzată de fricțiuni atunci când rotorul se rotește la viteze mari. În mod tipic, aceste centrifuge pot funcționa cu volume de până la 1,5 litri și sunt echipate cu rotoare sau rotoare unghiulare cu cupe interschimbabile.

Ultracentrifugele preparative accelerează până la 75.000 rpm și au o accelerație centrifugală maximă de 510000g. Acestea sunt echipate cu unități de refrigerare și vacuum pentru a împiedica supraîncălzirea rotorului de la fricțiunea aerului. Rotoarele pentru aceste centrifuge sunt fabricate din titan de mare rezistență sau aliaje de aluminiu. Spre deosebire de centrifugele de mare viteză și preparative, arborele ultracentrifugelor este flexibil pentru a reduce vibrațiile atunci când rotorul este dezechilibrat. Capacitățile rotorului trebuie echilibrate cu atenție până la 0,1 grame.

2.2.6 Aparatele pentru măsurarea pH-ului

Aparatul pentru măsurarea pH-ului este utilizat pentru măsurarea pH-ului mediilor și reactivilor nutrienți, precum și pentru verificarea calității acestora după sterilizare.

Instrumentul poate fi utilizat, de asemenea, pentru măsurarea valorilor pH-ului eșantioanelor și suspensiilor de eșantioane. Utilizarea unui aparat pentru măsurarea pH-ului este prevăzută în standardul pentru analizarea unui anumit produs, în care sunt definite condițiile de măsurare a valorii pH-ului și condițiile de obținere a valorii dorite a pH-ului.

Aparatul pentru măsurarea pH-ului se reglează în conformitate cu instrucțiunile producătorului la o temperatură standard de 25°C. Valoarea pH-ului se ia în considerare după stabilizarea valorii de testare. Valoarea pH-ului se înregistrează cu două zecimale.

Aparatele pentru măsurarea pH-ului trebuie să fie calibrate. Calibrarea aparatului pentru măsurarea pH-ului se efectuează cu ajutorul soluțiilor gata fabricate cu un anumit nivel de pH. În funcție de modelul dispozitivului, calibrarea este posibilă utilizând unul sau mai multe puncte. Cu cât punctele de calibrare sunt mai mari, cu atât mai exacte sunt citirile și eroarea aparatului pentru măsurarea pH-ului este mai mică.

Linkuri utilizate:

<https://www.laboratorii.com/stati/vidy-laboratornykh-tsentrifug.html>

<https://chem21.info/info/1279477/>

<http://www.activestudy.info/oborudovanie-mikrobiologicheskoy-laboratorii-specialnoe-oborudovanie/>

<http://old.stttrk.ru/book/page10.html>

2.3 Clasificarea microorganismelor și pericolul acestora

Clasificarea bacteriilor

Microorganismele sunt organisme invizibile pentru ochiul liber din cauza dimensiunii lor mici. Acest criteriu este singurul care le unește. *Sistematica microorganismelor* este o știință a cărei sarcină este de a descrie și organiza diferite microorganisme, divizarea (clasificarea) lor în anumite grupuri sistematice (taxon). Acest lucru ne permite să dezvoltăm o clasificare care este utilizată pentru stabilirea agentului patogen (Fig. 1).

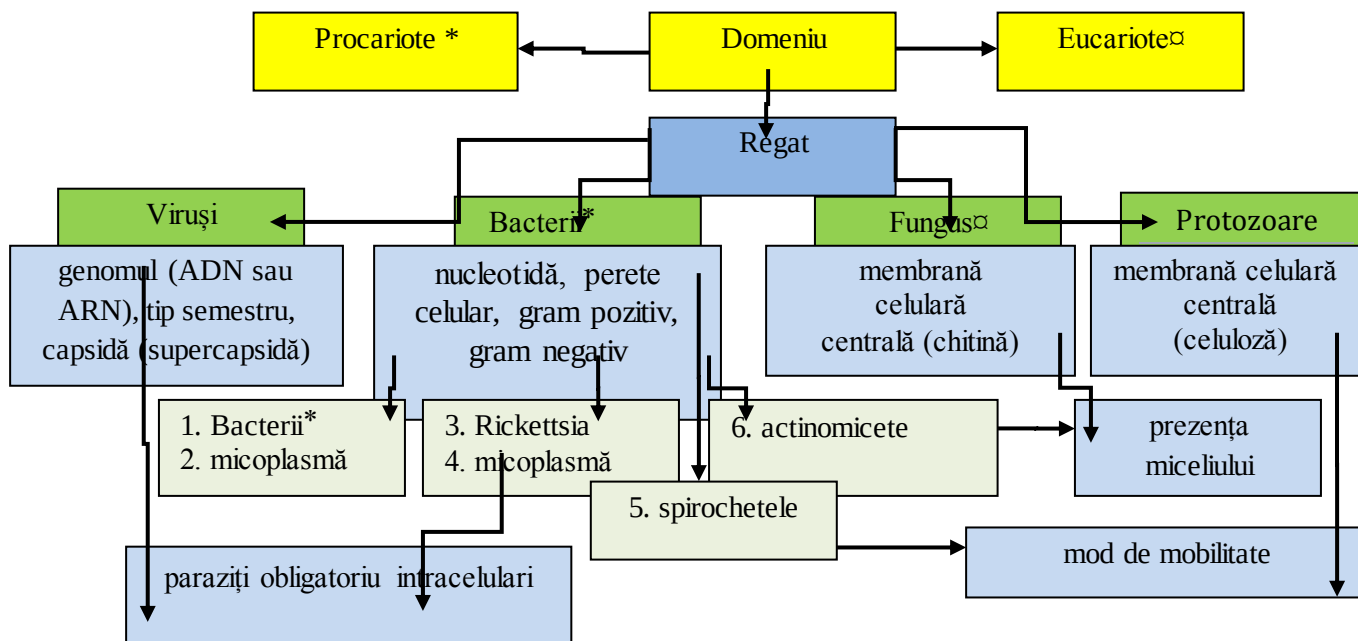


Fig. 1. Clasificarea microorganismelor patogene

Notă: * dimensiunile procariotelor și eucariotelor sunt de la 0,01-0,4 μm până la 20,0 μm ; □ - dimensiunea virusilor de la 10 până la 400 nm.

Principiile clasificării sunt studiate într-o secțiune separată a sistematiei - taxonomia. Pentru microorganisme au fost adoptate următoarele categorii de ierarhie taxonomică (taxon):

Clasificarea procariotelor: Speciile sunt unite în genuri, genurile (Genus) în familii, familiile (Familia) în ordine, ordinele (Ordo) în clase, clasele (Classis) în diviziuni (Divisio), în regnuri (Regnum). Principala unitate taxonomică în microbiologie este specia.

Speciile reprezintă un ansamblu evolutiv de indivizi care au un singur tip de organizare și care prezintă, în condiții standard, caracteristici fenotipice similare (structură morfologică, fiziologică, biochimică, antigenică), au propriul lor fond genetic și se pot încrucișa. Microorganismele cu puține proprietăți ereditare se numesc *variații*.

O tulpină este un grup de bacterii din aceeași specie izolate din diferite surse sau dintr-o singură sursă în diferite momente. Tulpinile pot să difere în unele caracteristici care nu depășesc caracteristicile speciilor.

Serovarul (Serotipul) este un grup de microorganisme din aceeași specie, unite de structura antigenică comună și determinate de metodele serologice de diagnosticare. Serovarul nu este o categorie taxonomică și permite sistematizarea microorganismelor oportuniste patogene, necesară pentru studiile epidemiologice. Sistematizarea acestora se bazează pe virulență, lipopolizaharide, colorația Gram, prezența exotoxinelor, trăsăturilor genetice sau alți factori care permit distingerea a două mostre din aceeași specie. Un grup de serovare cu aceiași antigeni se numește *serogrup*.

Clona e o colecție de indivizi formată dintr-o singură celulă mamă.

Cultura este colectarea indivizilor dintr-o specie sau dintr-o variație într-o fază de separare sau de odihnă într-un anumit volum de mediu nutritiv.

Toate microorganismele sunt divizate în *procariote* (celule care nu au nucleu) și *eucariote* (celule care au nucleu).

Pentru clasificarea microorganismelor se aplică 2 principii:

- Principiul fiziologic: microbian aparținând unui anumit grup este determinat în funcție de structura genomului.

- Principiul fenotipic este unificarea microorganismelor cu proprietăți similare (patogenitate, morfologie, fiziologie, proprietăți enzimatice, structură antigenică).

Regnul procariotelor include diviziunea cianobacteriilor și diviziunea eubacteriilor, care este împărțită în ordine: bacterii (Gracilicutes, Firmicutes, Tenericutes, Mendosicutes), actinomicete, spirochete; Rickettsia, chlamydia.

Principalele criterii taxonomice pentru atribuirea tulpinilor bacteriene unui sau altui grup sunt: morfologia celulelor microbiene (coci, bacili, spirile); atitudinea față de colorația Gram, adică proprietățile tinctoriale (gram pozitiv și gram negativ); capacitatea de sporogeneză. Toate microorganismele sunt împărțite în aerobe și anaerobe prin proprietățile fiziologice.

După tipul de respirație, microorganismele sunt clasificate în:

1. *Aerobii obligați* sunt microorganisme care necesită 21% oxigen pentru o creștere optimă. Printre acestea se numără agenții tuberculozei, ciuma, vibriionul holerici. De obicei, acestea cresc sub forma unei membrane pe suprafața mediilor de nutrienți lichizi;
2. *Anaerobii obligați* sunt bacterii care cresc în absența oxigenului molecular liber din cauza proceselor de fermentație. Ei produc oxigen din compuși organici în timpul metabolismului lor. Unii dintre ei nu tolerează nici măcar o cantitate mică de oxigen liber. Asemenea bacterii sunt agenții tetanosului, botulismului, infecției anaerobe cu gaze, bactericidelor, fusobacteriilor și altor. Unele clostridii pot fi aerotolerante. Pentru cultivarea lor sunt folosite medii și aparate nutritive speciale (anaerostate) în care sunt create condiții anaerobe;
3. *Anaerobii opționali (aerobii opționali)* s-au adaptat, în funcție de condițiile de mediu (prezența sau absența oxigenului), pentru a-și schimba procesele metabolice utilizând oxigen molecular pentru fermentație și viceversa. Grupul de anaerobi opționali este format din numeroși reprezentanți ai familiei bacteriilor intestinale (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*), stafilococilor și altor bacterii;
4. *Microaerofilii* sunt un grup special de microbi pentru care concentrația de oxigen în timpul cultivării poate fi redusă până la 2%. Concentrațiile mai mari sunt capabile să rețină creșterea. Acest grup este reprezentat de bacterii acidolactice și fixatoare de azot;
5. *Capneice* sunt un microorganism care, pe lângă oxigen, necesită până la 10% din dioxidul de carbon. Reprezentanții tipici sunt agenții patogeni de bruceloză bovină.

După formă, microorganismele se divizează în trei grupe: sferice (coci), în formă de tijă și spirale. Cele sferice: monococi (plasați individual), micrococi (mici), diplococi (două microorganisme), tetracoci (patru), sarzine (pachete de 8-16 și mai mult), streptococi (sub formă de lanțuri) și stafilococi (acumulare de microorganisme sub formă de struguri). (Reg. 2).

Microorganismele în formă de tijă se împart în: bacterii - tijă, bacili - spori cu tijă și clostridii - tijă cu spori al căror diametru depășește diametrul microorganismului. Acestea sunt plasate doar în perechi, în lanțuri, într-un unghi sau în grupuri. Capetele tijei pot fi rotunjite, dreptunghiulare, ascuțite sau îngroșate. Sporii se află în centrul celulei, mai aproape de sfârșit (subterminal) sau la sfârșit (terminal). Unele bacterii sunt ramificate, altele par a fi fire interconectate.

Formele sinuoase de bacterii se împart în trei grupe: vibrioni în formă de viruglă, spirale cu 2-4 bucle mari și spirochete având peste 5 forme buclate, curbate.

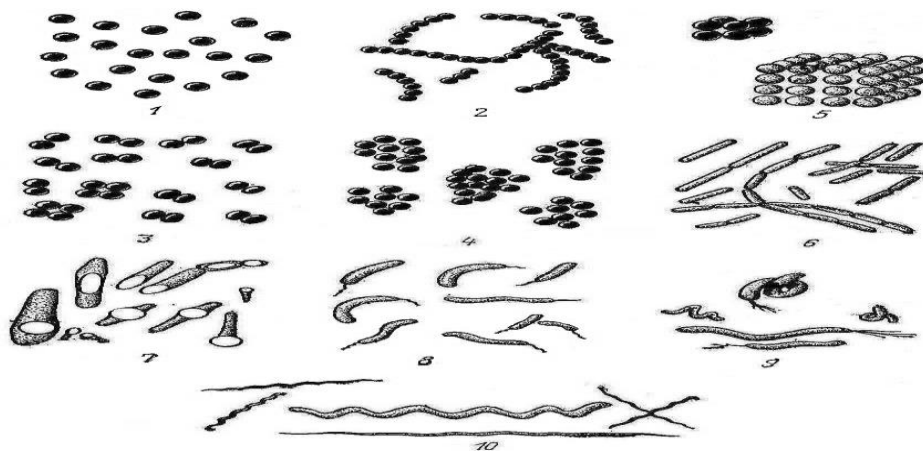


Fig. 2 Formele bacteriilor

Sferice (cocci):

1 - monococi

2 - streptococi

În formă de tijă:

6 - bacterii (tijă fără spori)

Sinuoase:

8 - vibrioni

9 - spirile

3 - diplococi și tetracoci
4 - stafilococi
5 – Sarcina

7 - bacilli, clostridia
(tijă cu spori)

10 - spirochete

Există alte forme de bacterii care nu îndeplinesc criteriile principalelor grupuri morfologice descrise mai sus. *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* - tije drepte sau curbate, uneori filamentoase sau în formă de miceliu, pot fi distinse ca grup morfologic separat. Ultimele două structuri se descompun cu ușurință în tije sau coci. Există bacterii numite filamentoase. Bacteriile filamentoase sunt în principal organisme unicelulare și multicelulare în formă de tijă, filamentele lor sunt formate din multe celule conectate prin mucus, capace, plasmodesme și așa mai departe.

Bacteriile care arată ca un inel închis sau deschis (formă toroidală), o stea hexagonală obișnuită, un triunghi, plăci pătrate plate, gantere și bacterii care formează excrescențe - prosteca. Acestea sunt în principal organisme unicelulare de formă triunghiulară sau de alt tip. Simetria lui Ray este detectată în unele dintre ele. Ele stau pe loc, nu produc spori. Forma celulelor procariote este determinată de cochilia solidă (rigidă). Forma este o caracteristică permanentă pentru majoritatea celulelor bacteriene. În ciclul dezvoltării unei serii de bacterii există o modificare a formei celulelor, de exemplu la nivelul membrilor genului *Arthrobacter*.

Mycoplasma și formele-L ale bacteriilor nu au o coajă densă, dar sunt înconjurate de o membrană, au capacitatea de a lua diferite forme, și anume pleomorfismul este caracteristica lor distinctivă. În multe cazuri, o formă depinde de mediul microorganismului. Multe tipuri de bacterii cultivate pe suporturi nutritive artificiale sunt semnificativ diferite de cele găsite la om sau animale (agenți cauzatori de antrax etc.).

Clasificarea bacteriilor după Bergey este, de asemenea, comună. Toate bacteriile sunt unite în regnul Procariotelor, care este împărțit după structura peretelui celular și colorația Gram în 4 diviziuni: *Gracilicutes* (gram negative); *Firmicutes* (gram pozitive), *Tenericutes* (nu au pereți celulari) (micoplasma), *Mendisicutes* (arhebacteriile (nu sunt patogene)).

Diviziunea *Gracilicutes* îmbină bacteriile, tijele ovale, drepte sau curbate, spiralele, filamentele lungi care sunt colorate gram negativ. Acestea se înmulțesc în principal prin diviziune binară, gemiparitate, diviziuni interne multiple cu formarea celulelor sferice mici (beocite (nanocite)).

Se disting microorganisme motile și fixe. Organele de mișcare ale bacteriei sunt flagelii, care par a fi formațiuni filamentoase curbate spiralat și, din cauza rotației helice, determină mișcarea haotică înainte, deși sunt capabile de tacticism. Aceștia sunt derivați ai membranei citoplasmice, plecând de la corpul său bazal și constând din subunități de proteine flageline, care sunt un antigen complet. Aceștia sunt construiți din filamente spirale, cârlig și corpusculi bazali, care par a fi niște cilindre subțiri (cu diametrul 12-18 nm) și lungi, ce pot uneori să depășească semnificativ lungimea microorganismului (de la 10 până la 20 micrometri și, în unele cazuri, până la 80-90 micrometri). Prin urmare, ei nu sunt vizibili într-un simplu microscop optic și sunt folosiți pentru metodele de colorare a impregnării în vederea stratificării vopselelor sau reactivilor pentru a mări în mod artificial diametrul. Numărul flagelilor și localizarea acestora sunt caracteristice anumitor microorganisme.

În funcție de aceasta, bacteriile se divizează în: Lophotrichous cu un singur flagel polar, Amphitrichous cu flageli la 2 margini ale celulei (una sau mai multe); Lophotrichous - un grup de flageli este localizat la un capăt al celulei; Peritrichous – flagelii se află pe întreaga suprafață a celulei (Fig. 3).

Pentru a determina circulația germenilor, se utilizează culturi de bulion tinere de 18-24 ore sau condensate de agar; și se spală în soluția salină de la suprafața culturilor zilnice de agar cu extract de carne de vită.

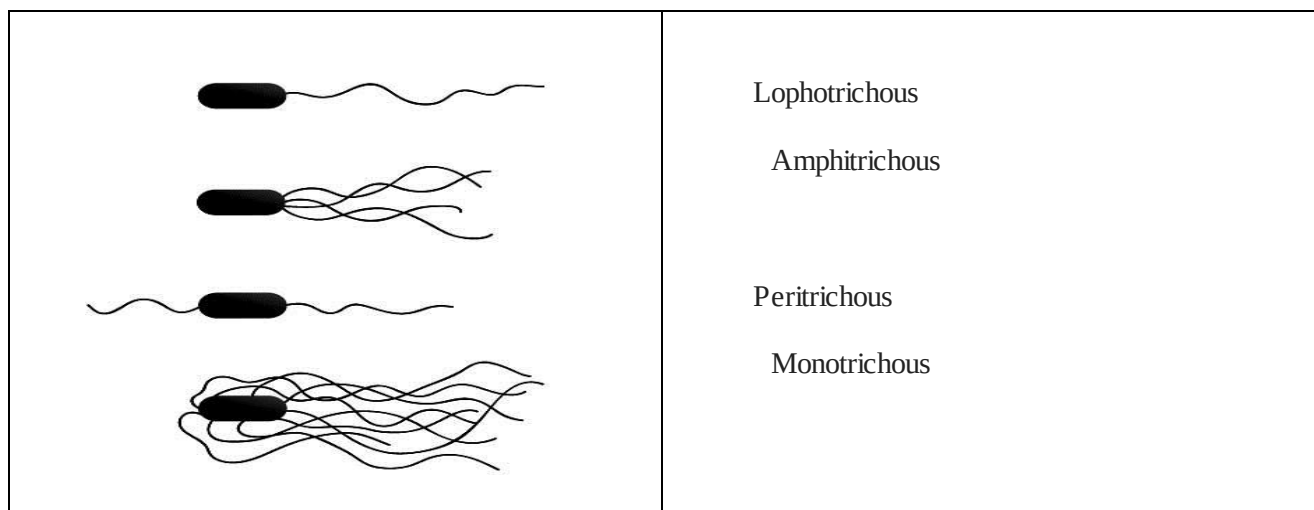


Fig. 3. Flagelii bacteriilor

Această diviziune include grupurile 1-16 din 35 de grupuri sistematice:

- Grupul 1. Spirochete;
- Grupul 2. Microorganisme gram-negative virale aerobe (microaerofilice, motile, sinuoase);
- Grupul 3. Bacterii gram-negative curbate fixe (uneori motile);
- Grupul 4. Tije gram-negative aerobe și coci;
- Grupa 5. Tije gram-negative anaerobe opționale;
- Grupul 6. Bacterii gram-negative, anaerobe, drepte, curbate și spiralate;
- Grupul 7. Bacterii care efectuează reducerea disimilativă a sulfului sau a sulfatului său;
- Grupul 8. Coci gram-negativi anaerobi;
- Grupul 9. Rickettsia și chlamydia;
- Grupul 10. Bacterii fototrofice anoxigenice;
- Grupul 11. Bacterii fototrofice oxigenice;
- Grupul 12. Bacterii chemolitotrofice aerobe și microorganismele conexe;
- Grupul 13. Bacterii care înmuguresc și/sau cresc;
- Grupul 14. Bacterii care au acoperire;
- Grupul 15. Bacterii nefotosensibile glisante care nu formează corpuri fructifere;
- Grupul 16. Bacterii care formează corpuri fructifere: mixobacterii.

Diviziunea Firmicutes include eubacteriile, bacteriile asporogene și care formează spori, actinomicetele, care sunt colorate gram pozitiv. Grupuri sistematice:

- Grupul 17. Coci gram-pozitivi.
- Grupul 18. Tije gram-pozitive și endospori care formează coci;
- Grupul 19. Tije gram-pozitive de formă corectă care nu formează spori;
- Grupul 20. Tije gram-pozitive de formă neregulată care nu formează spori;
- Grupul 21. Micobacterii;
- Grupa 22-29. Actinomicete.

Diviziunea Tenericutes include eubacteriile (micoplasmele) care nu au un perete celular, iar citoplasma este înconjurată doar de membrană. Celulele gram-negative polimorfice, predominant fixate, care se înmulțesc prin gemiparitate, diviziune binară, fragmentare filamentoasă sau prin transformări morfologice. Diviziunea dată include un singur grup:

- Grupul 30. Micoplasme (molicute).

Diviziunea Mendisicutes combină procariotele din peretele celular al căror peptidoglican lipsește. Bacteriile gram-pozitive diferă după formă (în formă de tijă, sferică, sinuoasă). Se disting bacterii termorezistente (cresc la temperaturi peste 100°C și se înmulțesc în apă hipersalină). Grupurile 31-35 includ:

- Grupul 31. Metanogeni;
- Grupul 32. Arhebacterii sulfat reducătoare;
- Grupul 33. Arhebacterii aerobe halofile extreme (halobacterii).
- Grupul 34. Arhebacterii lipsite de perete celular.
- Grupul 35. Termofili extremi și hipertermofili metabolizatori de sulf.

Diviziunea Gracilicutes combină 3 clase:

clasă 1 – *Scotobacteria* – bacterii care nu necesită lumină, nu există proces de fotosinteză;

clasă 2 – *Oxyphotobacterie* – bacterii care necesită lumină și eliberează oxigen;

clasă 3 – *Desoxyphotobacteria* – bacterii care necesită lumină și nu eliberează oxigen.

Clasificarea microorganismelor infecțioase (OMS) după grupurile de risc:

Grupul de risc I (risc individual și social scăzut). Microorganismele nu sunt cunoscute ca agenți etiologici a bolilor umane sau animale (*subtitrări Bacillus*);

Grupul de risc II (risc social moderat și limitat). Un agent patogen care poate provoca boli la oameni sau animale totuși nu prezintă un risc serios pentru personalul de laborator, societate, animalele domestice sau mediu. Lucrul imprudent în laborator poate provoca o infecție care poate fi eliminată cu agenți terapeutici și profilactici, iar riscul răspândirii acesteia este limitat (*Salmonella typhimurium*);

Grupul de risc III (risc individual ridicat și risc social scăzut). Agentul patogen provoacă boli grave la oameni și totuși, de regulă, acesta nu se răspândește de la pacient la o persoană sănătoasă (*virusul Brucella, Lassa*);

Grupul de risc IV (risc individual și social sporit). Agentul patogen provoacă boli grave la oameni sau animale și se răspândește ușor de la pacient la oamenii sănătoși (*virusul Ebola-Marburg, virusul FMD*).

Microorganismele sunt divizate după patogenitate (Fig: 4).

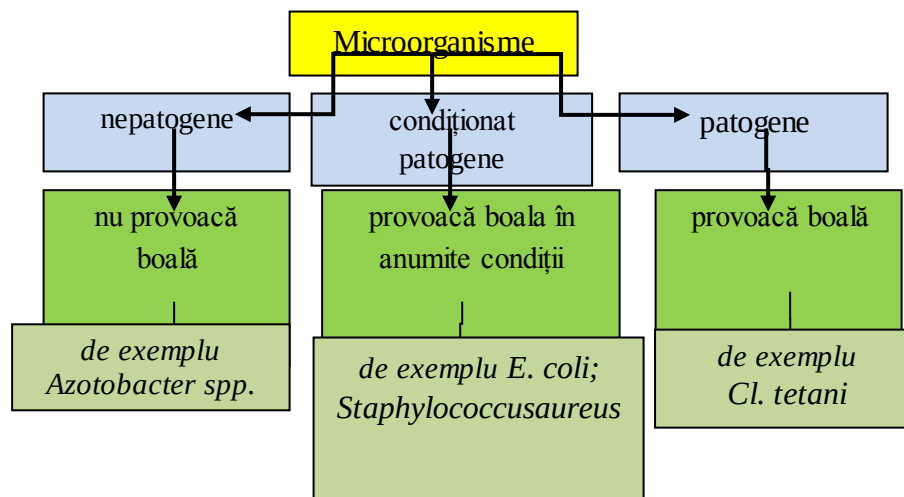


Fig. 4 Clasificarea microorganismelor în funcție de patogenitate

În țările CSI, agenții patogeni sunt clasificați în 4 grupuri în funcție de gradul lor de pericol:

Grupul I - agenți cu infecții deosebit de periculoase (răpciuga, ciurma, antraxul, variola neagră);

Grupul II - agenți patogeni ai bolilor epidemice bacteriene, virale, rickettsiale și fungice (bruceleză); extrem de contagioase

Grupul III – agenți patogeni ai bolilor infecțioase bacteriene, virale, rickettsiale, fungice, protozoare, izolate în forme nozologice independente (difterie);

Grupul IV – agenți patogeni ai septicemiei bacteriene, virale, fungice, meningitei, pneumoniei, enteritei, infecțiilor toxice, otrăvirii bacteriene acute.

2.4 Diferite medii de cultură. Particularitățile creșterii microorganismelor pe medii de cultură

2.4.1 Tipuri de medii de cultură

Există două tipuri principale de medii de cultură:

- teren sintetic, ale cărui componente principale sunt bine cunoscute (de exemplu, terenul de reproducere al glucozei și sării);
- teren de reproducere de origine naturală selectat în mod empiric al cărui conținut nu este cunoscut cu exactitate (de exemplu, peptone preparate din proteine parțial hidrolizate).

Alegerea mediului nutritiv depinde de scopul experimentului.

Inconveniențe practice pentru utilizarea suporturilor de nutrienți sintetici:

- Microorganismele cultivate pe astfel de medii de cultură diferă după fenotip de microorganismele cultivate pe medii de cultură naturale (de exemplu, compoziția și rata diviziunii).
- reproducerea microorganismelor în aceste medii este ușor de suprimat prin aerare excesivă sau cationi toxici; microorganismele sunt, de asemenea, mai sensibile la dezechilibrul dintre unele părți constituente ale mediului nutritiv, în special aminoacizii.

Mediile de cultură sintetice constituite din compuși chimici se utilizează în principal pentru studiul metabolismului într-o celulă microbiană. Mediile de cultură constituite din produse de origine vegetală și animală, în ciuda faptului că nu pot fi standardizate și nu au o compoziție chimică clară, sunt utilizate în mod obișnuit în microbiologia aplicată.

2.4.2 Cerințe pentru mediile de cultură

Mediile de cultură trebuie:

- Să păstreze nutrienții necesari pentru nutriția microbilor.
- Să aibă o reacție pH optimă pentru dezvoltarea microbilor.
- Să aibă suficientă umiditate, deoarece microbii se hrănesc conform legilor de difuzie și osmoză.
- Să aibă izotonicitate.
- Să fie sterile, pentru a asigura posibilitatea creșterii culturilor pure de microbi.

Compoziția terenurilor utilizate pentru creșterea bacteriilor include azot, carbon, hidrogen, oxigen, fosfor, potasiu, sulf, sodiu, magneziu și microelemente precum fier, cobalt, iod, mangan, bor, zinc, molibden, cupru și altele necesare pentru construcția proteinelor citoplasmei. Aceste elemente ar trebui să se afle pe terenul de reproducere în compuși disponibili pentru microorganisme, iar cerințele diferitor microbi nu sunt aceleași. Nevoia de oxigen și bacterii de apă este acoperită în principal prin fluxul de apă în celula lor.

Microorganismele patogene pot absorbi azot din compuși simpli de amoniu, altele necesită aminoacizi, iar altele împart substanțe macromoleculare, așa-numitele peptone, care sunt produse din digestia enzimatică incompletă a proteinelor. Speciile strict parazite de bacterii se înmulțesc numai dacă există proteine native.

Sursa de carbon pentru bacteriile patogene sunt diferiți carbohidrați, alcooli polichidrici, acizi organici și sărurile lor.

Elementele minerale ale bacteriilor se obțin prin adăugarea unor astfel de săruri precum NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , etc. în mediul de reproducere.

Microelementele care acționează ca catalizatori ai proceselor chimice intră pe terenul de reproducere cu peptonă, săruri anorganice și apă.

Pe lângă elementele organice și anorganice, bacteriile au nevoie de factori de creștere. Acestea pătrund în mediile de cultură din produsele de origine vegetală și animală care conțin nicotină, acid pantotenic, parabenzoic, vitaminele A, B, C și altele.

Nutrienții pot fi digerați de microbi numai după o anumită reacție a terenului de reproducere, deoarece permeabilitatea cochiliilor celulelor microbiene variază în funcție de pH-ul mediului. Din cauza diferitor cerințe față de nutrienți și pH-ul mediilor pentru diferite tipuri de microbi, posibilitatea creării unui teren universal de reproducere este exclusă.

2.4.3 Mediile de cultură cu scop general și special

La pregătirea terenului de reproducere se folosesc:

- produse de origine animală (carne, cazeină, lapte, ouă, sânge și altele);
- produse de origine vegetală (cartofi și altele);
- compuși organici și anorganici cu o anumită compoziție chimică.

Se disting medii de cultură dense și lichide. Nutrienții denși sunt preparați din lichid prin adăugarea substanțelor adezive, cum ar fi agar sau gelatină. Agar-agar (din Malay-Algae) este un produs de origine vegetală derivat din alge marine. Agar-agar se dizolvă la o temperatură de 80-86°C și se stabilește la 36-40°C în apă. Gelatina este o substanță de natură proteică de origine animală, care în apa caldă la o

temperatură de 32-34°C se umflă și se dizolvă și, la o temperatură mai scăzută, devine un jeleu. Cu toate acestea, la un pH sub 6,3 și peste 7,0, densitatea gelatinei scade și nu se stabilește bine.

Capacitatea agarului și a terenurilor gelatinoase de a menține o densitate de 37 °C a făcut posibilă cultivarea microbilor patogeni la temperaturi optime pe terenuri dense.

Toate mediile de cultură sunt împărțite în generale și speciale.

Mediile de cultură generală includ bulionul peptonat din carne, agarul peptonic din carne, gelatina peptonică din carne. Mediile de cultură generală sunt folosite pentru cultivarea multor microbi patogeni și sunt utilizate ca bază pentru prepararea unor terenuri speciale, adăugându-le sânge, zahăr, lapte, zer și alte ingrediente necesare pentru reproducerea acestui microb sau a respectivului tip de microb.

Mediile nutritive speciale includ terenuri de diagnostic selectiv și diferențial.

Terenurile selective. Principiul creării unui mediu nutritiv selectiv se bazează pe furnizarea necesităților biochimice și energetice de bază ale tipului de microb care urmează să fie cultivat. O anumită compoziție și concentrație de microelemente nutritive, factori de creștere și pH-ul corespunzător oferă condiții optime pentru creșterea unuia sau mai multor tipuri de microorganisme. Atunci când pe acestea se plasează un material care conține un amestec de diferite microorganisme, dezvoltarea speciilor pentru care a fost ales mediul ar fi cea mai bună.

Terenurile de diagnostic diferențial.

Mediile nutritive diferențiale și de diagnostic sunt utilizate pentru determinarea speciilor microbului studiat, pe baza caracteristicilor metabolismului acestuia. Mediile de cultură de diagnostic diferențial se divizează în:

- ✓ medii pentru detectarea capacității proteolitice și hemolitice a microbilor care conțin substanțe proteice: sânge, lapte, gelatină, ser din sânge coagulat și așa mai departe;
- ✓ medii cu substanțe chimice indiferente care servesc drept sursă de nutriție pentru anumite tipuri de microbi și care nu sunt absorbite de alte specii;
- ✓ medii cu carbohidrați și alcooli polihidrici pentru detectarea unor enzime adecvate;
- ✓ medii pentru determinarea capacității de reducere a microbilor.

Astfel de indicatori precum roșu neutru, albastru de metilen, litmus, fucsina acidă, albastru de bromotimol, colorantul albastru apos și acidul de azol sunt introduși în compoziția diferitor terenuri de diagnostic diferențial pentru detectarea enzimelor sugrolitice și oxido-reducătoare. Indicatorul indică prezența sau absența divizării, oxidării sau recuperării ingredientului introdus în mediu prin schimbarea culorii sale la diferite valori ale pH-ului. Cu toate acestea, indicatorul nu este o parte obligatorie a mediilor de detectare a enzimelor. Prin urmare, prezența gelatinazei și a altor enzime proteolitice în cultură este determinată de diluarea gelatinei, ouălor coagulate sau a proteinei din zer.

Terenul uscat de reproducere.

Pregătirea mediilor de cultură este una din cele mai critice și dificile zone ale activității bacteriologice de laborator. În acest sens, industria biologică produce medii nutritive standard, conservate și uscate pentru cultivarea microorganismelor.

Prepararea mediilor nutritive generale

Baza pentru prepararea mediilor nutritive generale este apa din carne care conține substanțe extractive.

Apa din carne

1. 100 g de carne de vită macră proaspătă sau vițel se dezoasează, grăsimile și tendoanele se mărunțesc printr-un tocător de carne, se adaugă 1 litru de apă de la robinet și se amestecă bine. Se lasă timp de o zi într-un loc răcoros sau se pune timp de 2 ore în termostat.

2. Masa cărnii este presată prin tifon, fiartă timp de 5 minute. Pentru coagulare, proteinele sunt răcite. Se filtrează printr-un filtru de bumbac, se adaugă apă la volumul inițial. Apa din carne este turnată în sticle, sterilizată timp de 20-30 minute la 120°C și depozitată într-un loc întunecat. Este transparentă, de culoare galbenă, cu reacție acidă slabă (pH 6,2-6,4), fără proteine. Apa din carne conține o cantitate mică de aminoacizi, săruri, carbohidrați, factori de creștere și extractivi. Peptona uscată care este produsul principal al hidrolizei proteice și constă dintr-un amestec de polipeptide și aminoacizi obținuți prin digestie peptică sau triptică se adaugă în apa din carne pentru prepararea mediului nutritiv obișnuit.

Fibrina, sângele și alte deșeuri sunt utilizate pentru producția peptonei uscate în fabricile de prelucrare a cărnii. Peptona se usucă într-un uscător cu vid de pulverizare. O peptonă lichidă poate fi preparată în laborator prin digestia peptică a proteinelor.

Peptona Martin

Stomacurile de porc (care nu sunt spălate cu apă) cu strat mucos abundent sunt curățate de membrană, grăsimi și trecute printr-un tocător de carne. La carnea tocată se adaugă apă și acid clorhidric în următoarea proporție: 250 g de carne tocată din stomacuri de porc, 1000 ml de apă de la robinet încălzită la 50°C, 10 ml de acid clorhidric (gravitate specifică 1,18). Amestecul este păstrat într-un termostat la 50°C. După 24 de ore, peptona este încălzită într-o autoclavă la 100°C și filtrată, la filtrat se adaugă o soluție NaOH de 10% la o reacție alcalină a turnesolului. După aceasta, filtratul este turnat în recipiente și sterilizat la 115°C timp de 30 de minute.

Bulionul peptonat din carne

Pentru a prepara bulionul peptonat din carne, Peptona Martin se amestecă cu un volum egal de apă din carne, se stabilește reacția necesară, se fierbe în decurs de 30 de minute, se filtrează și se sterilizează la 115°C timp de 30 de minute.

Cu ajutorul tripsinei pentru digestia cărnii, se obține bulionul Hottinger. O asemenea digestie provoacă utilizarea mai completă a proteinelor din carne, care se împart în peptone, polipeptide și aminoacizi liberi. În timpul digestiei triptice a cărnii, se primește de 10 ori mai multă supă decât prin metoda obișnuită.

Bulionul Hottinger

Carnea fără piele se taie în bucăți mici, se pune într-o cratiță cu apă clocotită (proporție 1:1.5) și se fierbe timp de 15-20 minute, apoi se scoate din lichid și se trece prin mașina de tocat. Lichidul se răcește până la 40-45°C, pH-ul este 8, iar apa se toarnă peste carnea tocată. La amestecul rezultat se adaugă pancreatină uscată în cantitate de 0,5-1% sau pancreas la 100 g de glandă la 1 litru de lichid. Apoi, în amestec se adaugă alcalină până la pH-ul 8 și se toarnă într-un recipient. Pe urmă adăugați 2-3% cloroform, închizând recipientul cu un dop de cauciuc, agitați conținutul de mai multe ori. Bulionul este plasat timp de 7-14 zile la o temperatură de 37°C.

În rezultatul digestiei, carnea tocată este transformată într-un precipitat omogen de culoare gri, iar lichidul de culoare galben-pai complet transparent este peste acesta. Un bulion Hottinger de bună calitate oferă o reacție pozitivă la triptofan și conține 560-860 mg % de azot aminal. Pentru a pregăti bulionul, adăugați 6-7 părți de apă la 1 parte de bulion.

Bulionul Tryptich Hottinger

Acest mediu conține un număr mare de aminoacizi și prin urmare sporește tamponarea acestuia și, din acest motiv, indicatorul reacției active a mediului este mai stabil.

Pentru a prepara acest bulion luați un kilogram de carne fără tendoane și grăsimi, tăiați-o în porțiuni mici de cca. 1-2 cm, așezați-le într-o tigaie cu un volum dublu de apă clocotită și fierbeți timp de 15-20 minute, până când carnea devine gri, indicând coagularea proteinelor. Aceasta se scoate din lichid și se trece printr-un tocător de carne. În lichidul rămas, se setează pH-ul 8,0, carnea tocată se pune acolo și se răcește la 40°C. Apoi se adaugă 10% (la volumul de lichid) din pancreasul proaspăt, pre-purificat de țesutul conjunctiv, grăsimi și se trece de două ori printr-un tocător de carne. În loc de glandă folosiți pancreatină uscată (0,5%). Amestecul rezultat se agită bine și se ajustează la pH-ul 7,8-8,0. Peste 30 de minute verificați pH-ul. Dacă reacția activă a mediului nu se modifică în acid, aceasta indică calitatea slabă a enzimei. Atunci când pH-ul mediului se stabilizează, amestecul se toarnă în sticle mari, umplându-le la nivelul de 1/3. Se adaugă până la 3% cloroform, se acoperă vasele cu dop de cauciuc și se agită puternic pentru a amesteca lichidele. Scoateți excesul de cloroform. Peste 1-2 ore, verificați din nou pH-ul mediului, setându-l la 7,4-7,6. Amestecul rezultat este lăsat la temperatura camerei timp de până la 16 zile. În primele 3-4 zile, verificați zilnic și ajustați pH-ul mediului și agitați sticlutele de cel puțin 3 ori pe zi. Ulterior, această procedură nu poate fi efectuată și mediul nu poate fi scuturat atât de des. Cu 1-2 zile înainte de sfârșitul ciclului de digestie agitarea mediului se oprește.

Digestia completă de calitate este demonstrată de iluminarea lichidului, care devine de culoare galben-pai, precum și de formarea în partea de jos a unui precipitat ca praful. Lichidul este filtrat cu ușurință, se verifică la triptofan utilizând o probă de apă bromină (3-4 picături de apă bromină se adaugă la 3-4 ml de filtrat). Dacă există triptofan (până la 2,0-3,0 g/l), culoarea mediului se va schimba în roz-mov. Determinați azotul total, care atinge în mod normal 11,0-12,0 g/l și azotul din amină (până la 7,0-9,0 g/l).

Hidrolizatul se filtrează printr-un filtru de hârtie sau pânză, îmbuteliat și autoclavat la 120° C timp de 30 min. În acest mod el poate fi depozitat pentru o perioadă lungă de timp.

Digestia Tryptic Hottinger este folosită pentru a obține bulionul Hottinger. Pentru aceasta la 100-200 ml de hidrolizat se adaugă 800-900 ml de apă distilată, 0,5% clorură de sodiu și 0,2% fosfat de sodiu monosubstituit. Ajustați pH-ul la 7,4-7,6, turnați în sticlute și sterilizați timp de 20 de minute la 120°C.

2.4.4 Creșterea microorganismelor pe medii de cultură

Pe mediile de cultură dense microorganismele cresc sub formă de colonii care diferă după: (tabelul 1).

Diferențierea coloniilor pe baza creșterii pe medii de cultură	
Colonii	O caracteristică a creșterii pe medii de cultură
<i>Dimensiune (diametru)</i>	mare (4-6 mm și mai mari); medie (2-4 mm); mică (1-2 mm); micuță sau punctată (mai puțin de 1 mm).
<i>Forma unei colonii</i>	corect rotundă, greșită (amoebică), rizoidă.
<i>Transparență</i>	transmitere de lumină transparentă; turbidă.
<i>Relieful și conturul formeii în secțiune verticală</i>	plată; convexă; bombată; sub formă de picătură; conică; convexă plată; plată pe suprafața mediului; cu un centru impresionant, cu un centru ridicat sub forma unui gurgui.
<i>Suprafață</i>	mată sau strălucitoare, cu luciu, uscată sau umedă; netedă sau dură. Coloniiile netede sunt numite forme-S și cele dure forme-R. Forma suprafețelor dure poate fi, de asemenea, diferită: încrețită, verucoasă, șagrină, cu o tentă radială și altele.
<i>Culoarea pigmentului sintetizat de</i>	alb, crem, galben, auriu, albastru, roșu, și altele.

bacterii

Consistență (determinată de contactul cu pastă;
colonia printr-o buclă bacteriologică) vâscoasă sau mucoasă,
uscată,
fragilă.

În mediile de cultură lichide sunt luate în considerare următoarele caracteristici de cultură:

- caracterul de creștere a suprafeței - prezența unui inel de perete, a ochiului de plasă, a unei membrane delicates, uscate, ridate, mucoase sau grosiere;
- intensitatea turbidității - slabă, moderată, puternică;
- volumul și structura precipitatului sunt semnificative și nesemnificative;
- dacă există precipitat, structura acestuia se înregistrează astfel - granular, fragil, afânat, spongios, mucos, sub formă de tampon de vată, etc.);
- schimbarea culorii mediului - nu s-a schimbat, s-a schimbat atunci când s-a format pigmentul.

2.5 Tehnica analitică și principiile de detecție ale acestora

Metodele chimiei analitice pot fi clasificate pe baza diferitor principii.

- 1) În funcție de masa substanței utilizate pentru analiză, aceste metode disting:
 - macrometode în cazul cărora pentru analiză sunt necesare cel puțin 0,1 g de substanță;
 - semi-microcrometode în cazul cărora sunt necesare 0,1-0,01 g de substanță;
 - micrometode în cazul cărora sunt necesare 10⁻²-10⁻³ g de substanță;
 - ultra-micrometode în cazul cărora sunt necesare ~ 10⁻⁶ g de substanță;
 - sub-micrometode, în cazul cărora sunt necesare ~ 10⁻⁹ g de substanță.

- 2) În funcție de tipul de analiză, se disting metodele de separare și metodele de determinare.

În *metodele de separare*, principala sarcină constă în separarea componentelor care interferează sau izolarea componentului care urmează să fie determinat într-o formă adecvată pentru cuantificare.

În *metodele de determinare*, conținutul componentului analizat se găsește în eșantion fără separare prealabilă.

- 3) Se disting metodele chimice și fizico-chimice de analiză, uneori metodele fizice se disting ca grup separat.

Metodele chimice includ metodele gravimetrice și titrimetrice, metodele fizico-chimice (instrumentale) includ metodele spectrofotometrice, electrochimice, cromatografice etc.

2.5.1 Analiza gravimetrică constă în extragerea unei substanțe în forma sa pură și cântărirea acesteia. Extracția se efectuează prin precipitații sau izolare sub forma unui compus volatil (metoda distilării).

Esența metodei: masa este semnalul analitic în gravimetrie. Masa este descoperită prin compararea cu o altă masă cunoscută cu ajutorul greutăților.

Principiul metodei: masa este semnalul analitic în gravimetrie. Masa este descoperită prin compararea cu o altă masă cunoscută cu ajutorul greutăților.

Metoda gravimetrică este utilizată pentru:

- determinarea substanțelor anorganice (pot fi cuantificați cationii anorganici, anionii, compuși neutri de tipul I₂, H₂O, CO₂, SO₂). În agronomie, se determină conținutul de fosfor din îngrășămintele pe bază de fosfor și soluri (în acest caz, PO³⁺ este precipitat sub formă de sare NH₄MgPO₄, care se transformă în pirofosfat de magneziu Mg₂P₂O₇ după calcinare). Apa de cristalizare în săruri, apa higroscopică din sol, îngrășămintele și materialul vegetal sunt determinate prin metoda de distilare. În timpul metodei de distilare, un component specific este izolat sub forma unui compus volatil prin acțiunea temperaturii și acidului. Se determină conținutul de substanță uscată din fructe, legume, fibre, cenușă „brută” din materialul vegetal.

- determinarea substanțelor organice are utilizare limitată (de exemplu, acidul salicilic se determină prin reacția cu iod: precipitatul galben este filtrat, uscat, cântărit).

Metodele de prelevare a unui eșantion mediu depind de caracteristicile materialului analizat și de scopul determinării. În producție, este necesar să se determine compoziția chimică medie a unui lot mare de material eterogen (pesticide, îngrășământ, sol).

2.5.2 Analiza titrimetrică bazată pe măsurarea exactă a cantității de reactiv utilizat pentru reacția cu analitul. Următoarele definiții vor fi necesare pentru a revizui materialul din prezentul capitol.

Soluție titrată sau standard este o soluție a cărei concentrație se cunoaște cu precizie.

Titrare adaugă o soluție titrată la cea analizată pentru a determina exact cantitatea echivalentă.

Soluția de titrare se numește adesea *soluție de lucru sau titrant*. De exemplu, dacă un acid este titrat cu alcali, soluția alcalină se numește titrant.

Momentul titrării, când cantitatea de titrant adăugată este echivalentă din punct de vedere chimic cu cantitatea substanței titrate, se numește *punctul de echivalență*.

Nu toate reacțiile chimice pot fi utilizate în analiza titrimetrică. Reacțiile utilizate în titluri trebuie să îndeplinească următoarele condiții de bază:

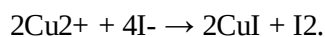
- 1) reacția ar trebui să continue cantitativ, și anume constanta de echilibru a reacției ar trebui să fie suficient de mare;
- 2) reacția trebuie să se desfășoare la o viteză mare;
- 3) reacția nu ar trebui să fie complicată de apariția proceselor secundare;
- 4) trebuie să existe o modalitate de a determina sfârșitul reacției.

În cazul în care reacția nu satisface cel puțin una dintre aceste cerințe, aceasta nu poate fi utilizată în analiza titrimetrică.

În metodele de titrare directă, analitul reacționează direct cu titrantul. O soluție de lucru este suficientă pentru analiza prin această metodă.

În metodele de titrare inversă (sau așa cum se numesc metodele de titrare după reziduuri) se folosesc două soluții de lucru titrate: principală și auxiliară. De exemplu, este cunoscută pe larg, titrarea inversă a ionilor de clorură în soluțiile acide. Un exces deliberat de soluție de nitrat de argint titrată se adaugă în primul rând la soluția de clorură analizată (soluție de lucru de bază). În acest caz, reacția formării clorurii de argint solubile în ulei: $\text{Ag} + + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl}$. AgNO_3 în exces, nereacționat, este titrat cu o soluție de tiocianat de amoniu (soluție de lucru auxiliară): $\text{Ag} + + \text{SCN}^- \rightarrow \text{AgSCN}$. Conținutul de clorură poate fi calculat ca fiind cantitatea totală a substanței (mol) din soluție și se cunoaște cantitatea substanței de AgNO_3 care nu a reacționat cu clorura.

Al treilea tip principal de determinare titrimetrică este titrarea unui substituent (titrare prin substituție, titrare indirectă). În această metodă la analit se adaugă un reactiv special, care reacționează cu acesta. Unul dintre produsele de reacție este titrat cu o soluție de lucru. De exemplu, cu determinarea iodometrică a cuprului, se adaugă un exces cunoscut de KI la soluția analizată. Are loc reacția



Iodul evoluat este titrat cu tiosulfat de sodiu.

2.5.3 Analiza spectrofotometrică se referă la metodele de absorbție, adică se bazează pe măsurarea absorbției luminii de către o substanță.

Aceasta include spectrofotometria, fotocolorimetria și fotometria vizuală, denumită în mod obișnuit colorimetrie.

Fiecare substanță absoarbe emisiile cu lungimi de undă specifice (caracteristice doar pentru aceasta), adică lungimea de undă a emisiilor absorbite este individuală pentru fiecare substanță, iar o analiză calitativă a absorbției de lumină se bazează pe aceasta.

Baza analizei cantitative este legea lui Beer – Lambert – Bouguer:

$$A = e l c$$

unde $A = -\lg(I/I_0) = -\lg T$ – densitatea optică;

I_0 și I – intensitatea luminii direcționate către soluția de absorbție și care trece prin aceasta;

c – concentrația substanței, mol/l;

l – grosimea stratului de absorbție a luminii;

e – coeficientul de absorbție molară a luminii;

T – transmisia.

Pentru determinarea concentrației unui analit cel mai adesea se utilizează următoarele metode: 1) coeficientul de absorbție molară a luminii; 2) graficul de calibrare; 3) aditivii; 4) fotometria diferențială; 5) titrarea fotometrică.

Metoda coeficientului de absorbție molară. Atunci când se lucrează cu această metodă, se determină densitatea optică a mai multor soluții standard A_{ct} , pentru fiecare soluție se calculează $e = A_{ct}/(lc_{ct})$ și pentru valoarea obținută e se calculează media. Apoi este măsurată densitatea optică a soluției analizate A_x și concentrația de c_x este calculată prin formula

$$C_x = A_x/(el).$$

O limitare a metodei este supunerea obligatorie a sistemului analizat la legea Beer – Lambert – Bouguer, cel puțin în domeniul concentrațiilor studiate.

Metoda curbei de calibrare. Se prepară o serie de diluări ale soluției standard, se măsoară absorbția acestora și se construiește un grafic în coordonatele $A_{ct} - C_{ct}$. Apoi, absorbția soluției analizate este măsurată și concentrația acesteia este determinată de curbă.

Testul Spike. Această metodă este utilizată pentru analiza soluțiilor cu compoziție complexă, deoarece aceasta vă permite să luați în considerare în mod automat influența componentelor „terți”. În primul rând, densitatea optică A_x se determină pentru soluția analizată care conține componenta determinată a concentrației necunoscute c_x , după care o cantitate cunoscută de component determinat (c_{ct}) se adaugă la soluția analizată, iar densitatea optică A_{x+st} se măsoară din nou.

Densitatea optică A_x a soluției analizate este egală cu

$$A_x = e l c_x;$$

și densitatea optică a soluției analizate cu adăugarea de standard

$$A_{x+ct} = e l (c_x + c_{ct}).$$

Concentrația soluției analizate se constată prin formula

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

Tehnica fotometriei diferențiale. Dacă în fotometria obișnuită intensitatea luminii care trece prin soluția analizată de concentrație necunoscută este comparată cu intensitatea luminii care trece prin solvent, în fotometria diferențială, al doilea fascicul de lumină nu trece prin solvent, ci printr-o soluție colorată de concentrație cunoscută, așa-numita soluție de comparație.

Tehnica fotometrică poate determina, de asemenea, componenții unui amestec din două sau mai multe substanțe. Aceste definiții se bazează pe proprietatea de dependență a densității optice:

$$A_{cm} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

unde A_{cm} este densitatea optică a amestecului; A_1, A_2, A_n - densități optice pentru diferite componente ale amestecului.

Metodele de analiză fotometrică sunt utilizate pentru a controla o varietate de procese de producție. Aceste metode pot fi utilizate pentru analiza conținutului mare și scăzut, dar caracteristicile lor deosebit de valoroase sunt capacitatea de a determina impuritățile (până la 10^{-5} ... $10^{-6}\%$). Metodele spectroscopiei de absorbție sunt utilizate în industria chimică, metalurgică, farmaceutică și de alte tipuri, precum și în medicină și producția agricolă.

Industria produce instrumente pentru spectroscopia de absorbție: colorimetre, fotometre, fotoelectrocolorimetre, spectrofotometre etc., care utilizează diferite combinații de iluminatoare, monocromatoare și detectoare de lumină.

2.5.4 Metodele electrochimice de analiză se bazează pe studierea și utilizarea proceselor care au loc pe suprafața electrodului sau în teaca electrodului. Orice parametru electric (potențial, curent, rezistență etc.), legat de concentrația soluției analizate din punct de vedere funcțional și supus măsurătorilor adecvate, poate fi un semnal analitic.

Se disting metodele electrochimice directe și indirecte. Dependența intensității curentului (potențialului etc.) de concentrația componentului determinat este utilizată în metodele directe. Intensitatea curentului (potențialului etc.) se măsoară pentru a stabili punctul final de titrare al componentului care

urmează să fie determinat cu un titrant adecvat în metodele indirecte și anume să se utilizeze dependența parametrului măsurat de volumul titrantului.

Pentru orice fel de măsurători electrochimice, este necesar un circuit electrochimic sau o celulă electrochimică, soluția analizată este o componentă a acestuia.

Metodele potențimetrice se bazează pe măsurarea diferenței potențiale dintre electrodul indicatorului și electrodul de referință sau *forțele electromotoare* (FEM) ale diferitor circuite, deoarece FEM este diferența potențială măsurată experimental.

Potențialul de echilibru al electrocului indicator este asociat activității și concentrației de substanțe cu *ecuația Nernst* implicată în procesul electrocului:

$$E = E^{\circ} + R T / (n F) \ln (a_{oxidă} / a_{redusă})$$

$$E = E^{\circ} + RT / (nF) \ln ([oxid] \gamma_{oxid} / ([redus] \gamma_{redus})),$$

R este constanta universală a gazului egală cu 8,31 J/(mol. K); T este temperatura absolută; F - constanta Faraday (96500 C/mol); n este numărul de electroni care participă la reacția pe electrod; $a_{oxidă}$, $a_{redusă}$ sunt activitățile formelor oxidate și reduse ale sistemului redox; $[oxidă]$ și $[redusă]$ sunt concentrațiile lor molare; γ_{oxid} , γ_{redus} sunt coeficienți de activitate; E° este potențialul standard al sistemului redox.

Înlocuind $T = 298,15$ K și valorile numerice ale constantelor din ecuație, obținem:

$$E = E^{\circ} + (0,059/n) \lg (a_{oxidă} / a_{redusă})$$

$$E = E^{\circ} + (0,059/n) \lg ([oxid] \gamma_{oxid} / ([redus] \gamma_{redus}))$$

Metodele potențimetrice directe se bazează pe aplicarea ecuației Nernst pentru a găsi activitatea sau concentrația unui participant la o reacție pe electrod dintr-un circuit electromagnetic sau potențial electrodul măsurat experimental. Metoda de determinare a pH-ului este cea mai utilizată metodă dintre metodele potențimetrice directe, însă crearea unor electrozi fiabili selectivi de ioni a extins considerabil posibilitățile practice ale metodelor directe. PH-ul se măsoară, de asemenea, prin titrare potențimetrică.

Electrodul de sticlă este utilizat cel mai adesea pentru determinarea pH-ului. Principalele avantaje ale electrocului de sticlă sunt ușurința utilizării, echilibrul rapid și capacitatea de a determina pH-ul în sistemele redox. Dezavantajele sunt fragilitatea materialului electrocului și complexitatea lucrului la trecerea la soluții puternic alcaline și puternic acide.

Pe lângă concentrația de ioni pe bază de hidrogen, metoda potențimetrică directă cu electrozi selectivi de ioni poate determina conținutul câtorva zeci de ioni diferiți.

Titarea potențimetrică se bazează pe determinarea punctului de echivalență din măsurătorile potențimetrice. În apropierea punctului de echivalență are loc o schimbare bruscă (salt) a potențialului electrocului indicatorului. Ca și în alte metode titrimetrice, reacțiile de titrare potențimetrică trebuie să continue strict stoechiometric și să aibă o viteză mare și să meargă până la sfârșit.

Un lanț este asamblat din electrocului indicator în soluția analizată și electrocului de referință pentru titrarea potențimetrică. Electrozii de calomel sau de clorură de argint sunt utilizați cel mai adesea ca electrozi de referință.

Tipul de electrod indicator utilizat pentru titrarea potențimetrică depinde de proprietățile amestecului titrimetric și de interacțiunea acestuia cu electrocului. Electrodul de sticlă este utilizat în titrarea bazelor acide; electrocului inert (platină) sau electrocului reversibil în ceea ce privește unul dintre ionii din amestecul titrimetric este utilizat în redox; electrocului de argint este utilizat în sedimentare; electrocului metalic reversibil la ionul metalic titrabil este utilizat în titrarea complexometrică.

Pentru a găsi punctul de echivalență, o curbă diferențială este adesea construită în coordonatele $E/V - V$. Punctul maxim al curbei obținute indică punctul de echivalență, iar citirea de-a lungul abscisei care corespunde acestei valori maxime oferă volumul de titrant cheltuit pentru titrare la punctul de echivalență. Determinarea punctului de echivalență față de curba diferențială este mult mai precisă decât dependența simplă $E - V$.

Principalele avantaje ale metodei de titrare potențimetrică sunt precizia și capacitatea acesteia de a efectua determinări în soluții diluate, în medii turbide și colorate, precum și de a determina mai multe substanțe într-o singură soluție fără separare prealabilă. Domeniul de aplicare practic al titrării potențimetrice cu utilizarea solvenților neapoși este în creștere semnificativă. Aceștia permit analizarea sistemelor multicomponente care nu pot fi determinate într-o soluție apoasă, analizarea substanțelor insolubile sau descompuse în apă etc. Titrarea potențimetrică poate fi ușor automatizată. Industria produce mai multe tipuri de autotitratoare cu ajutorul senzorilor potențimetrici.

Dezavantajele titrării potențimetrice includ stabilirea nu întotdeauna rapidă a potențialului după adăugarea de titranți și un număr mare de citiri în timpul titrării.

În analiza potențimetrică, principalele mijloace de măsurare sunt diferite tipuri de potențiometre. Acestea sunt concepute pentru a măsura forțele electromotoare (FEM) ale sistemului de electrozi. Deoarece FEM depind de activitatea ionilor corespunzători în soluție, multe potențiometre pot măsura direct pX , și anume logaritmul negativ al activității ionilor X . Asemenea potențiometre cu electrodul identic selectiv de ioni se numesc ionomeri. Dacă potențimetrul și sistemul de electrozi sunt concepute doar pentru a măsura activitatea ionilor pe bază de hidrogen, dispozitivul se numește aparat pentru măsurarea pH-ului.

2.5.5 Metodele de analiză cromatografică

Cromatografia este un proces bazat pe repetarea multiplă a actelor de sorbție și desorbție a unei substanțe atunci când o deplasează într-un flux de fază mobilă de-a lungul unui sorbant staționar. Separarea amestecurilor complexe printr-o metodă cromatografică se bazează pe diferite capacități de adsorbție ale componentelor amestecului.

Așa-numita fază mobilă (eluentă) conținând eșantionul analizat trece prin faza staționară în timpul cromatografiei. În mod tipic, faza staționară este o substanță cu suprafață dezvoltată, iar faza mobilă este un flux de gaz sau lichid filtrat pe un strat de sorbent. În acest caz, are loc o repetare multiplă a actelor de sorbție-desorbție, care constituie o caracteristică a procesului cromatografic și determină eficacitatea separării cromatografice.

Analiza cromatografică calitativă și anume identificarea unei substanțe prin cromatograma sa, poate fi realizată comparând caracteristicile cromatografice, cel mai adesea *volumul păstrat* (și anume volumul fazei mobile care trece prin coloană de la începutul intrării amestecului până când acest component apare la ieșirea coloanei), constatat în anumite condiții pentru componenții amestecurilor analizate și pentru referință.

Analiza cromatografică cantitativă se realizează de obicei pe un cromatograf. Metoda se bazează pe măsurarea diferiților parametri ai vârfului cromatografic, în funcție de concentrația substanțelor cromatografice – înălțime, lățime, suprafață și volumul de reținere sau de produsul volumului de reținere până la înălțimea vârfului.

În cromatografia cantitativă cu gaze, se utilizează metode de calibrare absolută și normalizare internă sau scalare. De asemenea, se utilizează metoda standard internă. Prin *calibrare absolută*, dependența înălțimii sau a suprafeței vârfului de concentrația substanței se determină experimental și se calculează grafice de calibrare sau se calculează coeficienții corespunzători. În continuare se determină aceleași caracteristici ale vârfurilor din amestecul analizat, iar concentrația analitului se determină din curba de calibrare. Această metodă simplă și exactă este fundamentală pentru determinarea cantităților de urme.

Atunci când se utilizează metoda de normalizare internă, suma oricăror parametri de vârf este considerată 100%, de exemplu, suma înălțimilor tuturor vârfurilor sau suma suprafețelor acestora. Apoi raportul dintre înălțimea unui vârf individual și suma înălțimilor sau raportul dintre suprafața unui vârf și suma suprafețelor înmulțită cu 100 va caracteriza fracția masică (%) a componentului în amestec. Prin această abordare, este necesar ca dependența parametrului măsurat de concentrație să fie aceeași pentru toți componenții amestecului.

2.5.6 Tipuri de metode cromatografice

M. Tsvet a elaborat legea, pe care a numit-o legea înlocuirii adsorbției:

Substanțele dizolvate într-un anumit lichid formează o anumită serie de adsorbție A, B, C,... exprimând afinitatea relativă de adsorbție a membrilor săi la adsorbant. Fiecare membru al seriei de adsorbție, cu o afinitate mai mare de adsorbție decât cea următoare, îl înlocuiește din compus și, la rândul său, îl înlocuiește cu cel anterior.

Astfel, M. Tsvet a considerat diferența de adsorbabilitate ca o condiție principală pentru punerea în aplicare a procesului cromatografic - procesul de separare a substanțelor pe o coloană.

În cromatografia modernă, pe lângă adsorbția moleculară, pentru separarea substanțelor sunt utilizate și alte fenomene fizico-chimice. Există mai multe clasificări bazate pe diverse principii. În general sunt acceptate următoarele.

În funcție de starea de agregare a fazelor utilizate. Conform acestei clasificări, cromatografia este împărțită în cromatografia de gaze și lichidă. Cromatografia de gaze include cromatografia gaz-lichid și gaz-adsorbție. Cromatografia lichidă este divizată în lichid-lichid, lichid-adsorbție și lichid-gel. Primul cuvânt din această clasificare caracterizează starea de agregare a fazei mobile.

În funcție de mecanismele de separare, și anume prin natura interacțiunii dintre sorbent și sorbat. În conformitate cu această clasificare, cromatografia se divizează în următoarele tipuri:

1. cromatografia de adsorbție: separarea se bazează pe diferența de adsorbabilitate a substanțelor care urmează să fie separate de un adsorbant solid;
2. cromatografia de repartitie: separarea se bazează pe diferența de solubilitate a substanțelor care urmează să fie separate în faza staționară (cromatografia de gaze) și pe diferența de solubilitate a substanțelor care urmează să fie separate în faza lichidă mobilă și staționară;
3. cromatografia prin schimb de ioni: separarea se bazează pe diferența dintre capacitatea substanțelor care urmează să fie schimbate în schimbul de ioni;
4. cromatografia de permeație: separarea se bazează pe diferența de dimensiune sau formă a moleculelor substanțelor care urmează să fie separate, de exemplu, utilizând site moleculare (zeolite);
5. cromatografia sedimentelor: separarea se bazează pe formarea precipitațiilor cu solubilitate diferită cu un sorbent;
6. cromatografia de adsorbție-complexare: separarea se bazează pe formarea compușilor de coordonare ai diferitor concentrații în faza sau pe suprafața adsorbantului.

Foarte des, procesul de separare se desfășoară în conformitate cu mai multe mecanisme.

În conformitate cu tehnica aplicată:

1. cromatografia pe coloană: separarea substanțelor se realizează în coloane speciale;
 2. cromatografia de suprafață: a - hârtie - separarea substanțelor se realizează pe o hârtie specială;
- b - strat subțire - separarea substanțelor se efectuează într-un strat subțire de sorbent.

Oricare dintre mecanismele de separare menționate mai sus poate fi utilizat în cromatografia pe coloane și în cromatografia pe strat subțire; mecanismele de distribuție și schimb de ioni sunt cel mai adesea utilizate în cromatografia pe hârtie.

Conform metodei fazei relative, se distinge cromatografia frontală sau eluentă și cea de deplasare.

Metoda frontală. Aceasta este cea mai simplă metodă de cromatografie. Amestecul analizat se trece continuu printr-o coloană adsorbantă, de exemplu, componentii A și B în solvent Solv. În soluția care curge din coloană, se determină concentrația fiecărui component și se desenează un grafic în coordonatele concentrației substanței – volumul soluției trecute prin coloană. Această dependență se numește de obicei *cromatogramă* sau *curbă de ieșire*.

Din cauza sorbției substanțelor A și B, solventul Solv se va scurge mai întâi din coloană, iar apoi solventul și componentul mai puțin adsorbit, și mai apoi componentul B, și astfel, după un timp, compoziția soluției nu se va schimba atunci când va trece prin coloană. Metoda este utilizată, de exemplu, pentru purificarea unei soluții de impurități dacă acestea sunt sortate mai bine decât componentul principal sau pentru izolarea substanței cel mai rău adsorbite dintr-un amestec.

Metoda de dezvoltare a eluției. Atunci când se utilizează această metodă, o parte din amestecul analizat conținând componentii A și B din solventul Solv este introdusă în coloană, iar coloana este spălată continuu cu gaz transportator sau solvent Solv. În acest caz, componentii amestecului analizat sunt împărțiți în zone: o substanță bine absorbită B ocupă partea superioară a coloanei, iar partea inferioară va fi ocupată de un component mai puțin absorbit.

Componentul A apare inițial, apoi un solvent pur, și apoi componentul B într-un gaz sau o soluție care curge din coloană.

Cu cât concentrația componentului este mai mare, cu cât atât vârful acestuia este mai înalt și zona mai mare, ceea ce stă la baza analizei cromatografice cantitative. Metoda de dezvoltare permite separarea amestecurilor complexe; aceasta este utilizată cel mai adesea în practică. Dezavantajul acestei metode este scăderea concentrației soluțiilor care se îndepărtează din cauza diluării cu un solvent sau gaz purtător.

Metoda de deplasare. În această metodă, amestecul analizat de componentii A și B în solventul Solv se introduce în coloană și se spală cu o soluție de substanță D (dispersant), care se absoarbe mai bine decât oricare dintre componentii amestecului analizat.

Concentrația soluției în timpul cromatografiei nu scade, spre deosebire de metoda de dezvoltare. Un dezavantaj semnificativ al metodei de deplasare este posibila suprapunere a zonei unei substanțe în zona celeilalte, deoarece zonele componentilor din această metodă nu sunt separate de zona solventă.

Analiza de dezvoltare (eluentă) este cea mai des utilizată în cromatografie, în acest caz se observă vârful coordonatelor concentrației, volumul se numește *vârful cromatografic* și se caracterizează după înălțime, lățime și suprafață.

În practica analitică, metoda cromatografiei gaz-lichid (GLC) este utilizată la scară largă. Acest lucru se datorează varietății extreme de faze staționare lichide, care facilitează selectarea unei faze selective pentru această analiză. Este important să alegeți corect faza lichidă staționară pentru a asigura selectivitatea coloanelor. Această fază trebuie să fie un solvent bun pentru componentii amestecului (dacă solubilitatea este

redușă, componenții părăsesc coloana foarte rapid), nevolatil (pentru a nu se evapora la temperatura de lucru a coloanei), inert chimic, ar trebui să aibă o vâscozitate redusă (altfel procesul de difuzare se va încetini) și atunci când este aplicat pe purtător pentru a forma un strat uniform legat de acesta. Capacitatea de separare a fazei staționare pentru componenții acestui eșantion trebuie să fie maximă.

Purtătorii fazelor lichide staționare. Purtătorii solizi pentru dispersarea unei faze staționare lichide sub formă de folie subțire omogenă trebuie să fie puternici din punct de vedere mecanic, cu o suprafață specifică moderată (aproximativ 20 m²/g), cu o dimensiune mică și identică a particulelor și, de asemenea, suficient de inerți, astfel încât adsorbția pe interfața dintre fazele solide și gazoase să fie minimă. Cea mai slabă adsorbție se observă la purtătorii de cromosorbat silanizat, granule de sticlă și fluoropac (polimer pe bază de fluorocarbon). În plus, purtătorii solizi nu trebuie să reacționeze la creșterea temperaturii și trebuie umeziți ușor prin faza lichidă. Purtătorii de diatomit silanizat – diatomit siliciu sau kieselguhr sunt cel mai des folosite ca suport solid pentru cromatografia de gaze a chelaților.

Cromatografia gaz-lichid (GLC) este una dintre cele mai avansate metode de analiză multicomponentă. Caracteristicile sale distinctive sunt expesivitatea, precizia mare, sensibilitatea și posibilitatea automatizării. Metoda permite soluționarea multor probleme analitice. Analiza cantitativă GLC poate fi considerată o metodă analitică independentă, mai eficientă în separarea substanțelor care aparțin aceleiași clase.

Cromatografia lichid-lichid este aproape de cea cu gaz-lichid. Se pune, de asemenea, un strat cu fază lichidă pe un suport solid, iar o soluție lichidă se trece printr-o coloană umplută cu un astfel de adsorbant. Acest tip de cromatografie se numește cromatografia de repartiție lichid-lichid. Lichidul depus pe purtător se numește faza lichidă staționară, iar solventul care trece prin purtător se numește faza lichidă mobilă. Cromatografia lichidă se realizează într-o coloană (versiunea pe coloană) sau pe hârtie (cromatografia pe hârtie).

Separarea unui amestec de substanțe în cromatografia lichid-lichid se bazează pe diferența dintre coeficienții de distribuție ai substanței dintre solvenții imiscibili. Coeficientul de distribuție al substanței este egal cu:

$$K_{m/s} = c_m / c_s$$

Unde c_m și c_s este concentrația substanței în faza mobilă și în faza staționară.

Pentru membrii aceleiași serii omologe au fost stabilite unele neregularități ale valorilor $K_{m/s}$. De exemplu, se cunoaște dependența $K_{m/s}$ într-o anumită serie omoloagă de numărul de atomi de carbon.

Căutarea fazelor imiscibile care asigură separarea se realizează, de obicei, în mod empiric, pe baza datelor experimentale. Sistemele alternative formate din doi solvenți imiscibili și un al treilea solubil în ambele faze sunt utilizate pe scară largă în cromatografia lichid-lichid. Astfel de sisteme permit obținerea unui set de etape incontestabile ale diferitor selectivități. Un exemplu îl constituie un sistem imiscibili de heptan și apă, în care se introduce etanolul care se dizolvă în ambii solvenți.

Cu toate că solvenții imiscibili sunt selectați ca fază mobilă și staționară, în unele sisteme există totuși o anumită solubilitate reciprocă. Pentru a preveni procesele de dizolvare reciprocă a lichidelor în timpul cromatografiei, faza mobilă este pre-saturată cu una staționară. Metoda de fixare chimică a fazei staționare pe sorbent este utilizată, de asemenea, pentru a menține o compoziție constantă a fazei. În acest caz, se utilizează interacțiunea solventului cu grupurile OH-pe suprafața purtătorului. Adsorbanții cu fază lichidă fixată pe suprafața lor sunt produși de industrie.

Eficiența coloanei este legată de vâscozitate, coeficientul de difuzie și alte proprietăți fizice ale lichidelor. Purtătorul fazei staționare trebuie să aibă o suprafață suficient de dezvoltată, să fie inert chimic, să mențină ferm faza lichidă pe suprafața sa și să nu se dizolve în solvenții utilizați. Se folosesc substanțe de natură chimică diferită purtătoare de ss: purtători hidrofilici – gel de siliciu, celuloză etc. și hidrofobi – fluoroplast, teflon și alți polimeri.

2.6 Principiile diagnosticului molecular

2.6.1 Bazele teoretice ale metodelor de diagnostic molecular

Metodele de cercetare moleculară și biologică joacă un rol important în medicina și știința veterinară modernă, medicină legală, biologie. Datorită progreselor din domeniul ADN și ARN, o persoană este capabilă să studieze gena organismului, să determine patogenul, să distingă acidul nucleic din amestecul de acizi etc. Această metodă este cea mai fiabilă metodă pentru studiul bolilor ereditare. Avantajul diagnosticului ADN în comparație cu alte metode de genetică moleculară umană este că această metodă

permite identificarea și analizarea originii bolii (gena, localizarea acesteia, tipul de deteriorare). Această metodă poate detecta chiar și perturbările minime ale structurii primare ale ADN-ului (inclusiv substituțiile cu un singur nucleotid), care nu pot fi investigate prin alte metode. Diagnosticul ADN-ului este o procedură minimă invazivă (1-2 ml de sânge, epiteliu bucal sau chiar câteva celule din material sunt suficiente).

În prezent, tehnologia amplificării fragmentelor de ADN, așa-numita reacție de polimerizare în lanț (PCR), se implementează activ în sistemul practic de control al calității produselor agricole, ca instrument de cercetare la nivel molecular. Metoda se bazează pe replicarea selectivă multiplă a unui anumit strat de ADN care utilizează enzime în condiții simulate (in vitro). În acest caz, zona care îndeplinește condițiile date este copiată și numai dacă este inclusă în eșantionul care face obiectul studiului. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) a sporit diagnosticarea bolilor infecțioase la un nivel calitativ nou. Principalele prevederi ale PCR au fost formulate în 1983 de biochimistul american K. Mullis și acesta a primit Premiul Nobel în chimie pentru aceasta în 1993. Trebuie remarcat faptul că dezvoltarea metodei PCR a fost precedată de descoperirea microorganismelor *Thermus aquaticus* în apa gheizerelor și de extragerea acestora din enzima ADN polimerazei, care își menține activitatea biologică la temperaturi ridicate (72-80 °C).

Descoperirea unei noi metode a fost utilizată instantaneu, iar în 1985 Saiki R. K et al. a publicat un articol în care a fost descrisă amplificarea secvenței genomice a b-globinei. De atunci, numărul de publicații în care autorii au raportat utilizarea PCR în lucrul lor a început să crească în progresie geometrică. Metoda a devenit atât de populară încât astăzi este greu să ne imaginăm cercetările în biologia moleculară fără ea. Amploarea utilizării PCR este extrem de diferită, iar utilizarea sa pentru identificarea agenților patogeni ai bolilor infecțioase a început o nouă tendință denumită „diagnosticul ADN” atât în medicina umană, cât și în medicina veterinară.

Principiul de bază al PCR este creșterea exponențială a numărului de copii ale stratului inițial de ADN care utilizează enzime *in vitro*. În acest caz, se copiază numai suprafața care este flanșată de primeri și numai dacă este inclusă în eșantionul obiectului de studiu.

Compoziții principale ai reacției de polimerizare în lanț sunt:

1. Primerii sunt o pereche de oligonucleotide sintetizate artificial, de obicei având o dimensiune de la 15 până la 30 ppm, care sunt complementare segmentului de ADN vizat care este analizat. Primerele selectate corespunzător asigură specificitatea și sensibilitatea ridicată a sistemului de testare.
2. Taq-ADN polimeraza este o enzimă termostabilă care oferă completarea capătului 3' din lanțul ADN opus, în conformitate cu principiul complementarității.
3. Un amestec de deoxinucleotid trifosfat (dNTP) - trifosfat de deoxiadenozină (dATP), trifosfat de deoxiguanozină (dGTP), trifosfat de deoxicitidină (dCTP) și trifosfat de deoxitimidină (dTTP), este un „material de construcție” utilizat de Taq-ADN polimeraza pentru sinteza celui de-al doilea strat de ADN.
4. Soluția tampon este un amestec de cationi și anioni într-o anumită concentrație, oferind condiții optime pentru reacție, precum și un pH stabil. Ionii de clorură de magneziu necesari pentru Taq polimeraza sunt de asemenea incluși în tampon.
5. Matricea ADN este un amestec dintr-un acid nucleic total pregătit pentru aplicarea în amestecul de reacție care poate conține un component ADN care va reprezenta o țintă pentru copii multiple ulterioare (de exemplu, ADN-ul microorganismelor). Dacă ținta ADN este absentă, nu este format un produs specific al amplificării.

Fiecare ciclu PCR constă din trei etape. În prima etapă, matricea ADN dublu-catenară este denaturată la 94°C pentru a forma ADN-ul mono-catenar. În etapa a doua, temperatura scade la 55-65°C și are loc adăugarea (hibridizarea) primerelor la fiecare dintre cele două ADN-uri mono-catenare. În etapa a treia, la 72°C, se produce elongarea (extinderea) lanțurilor ADN cu enzima ADN polimerazei, care completează ambele primere în direcția de la capătul 3' până la capătul 5', și în rezultatul acestui fapt, apar două ADN-uri dublu-catenare. Această secvență de procese permite acumularea unui produs suficient PCR pentru vizualizarea timp de 25-40 cicluri (Fig. 1).

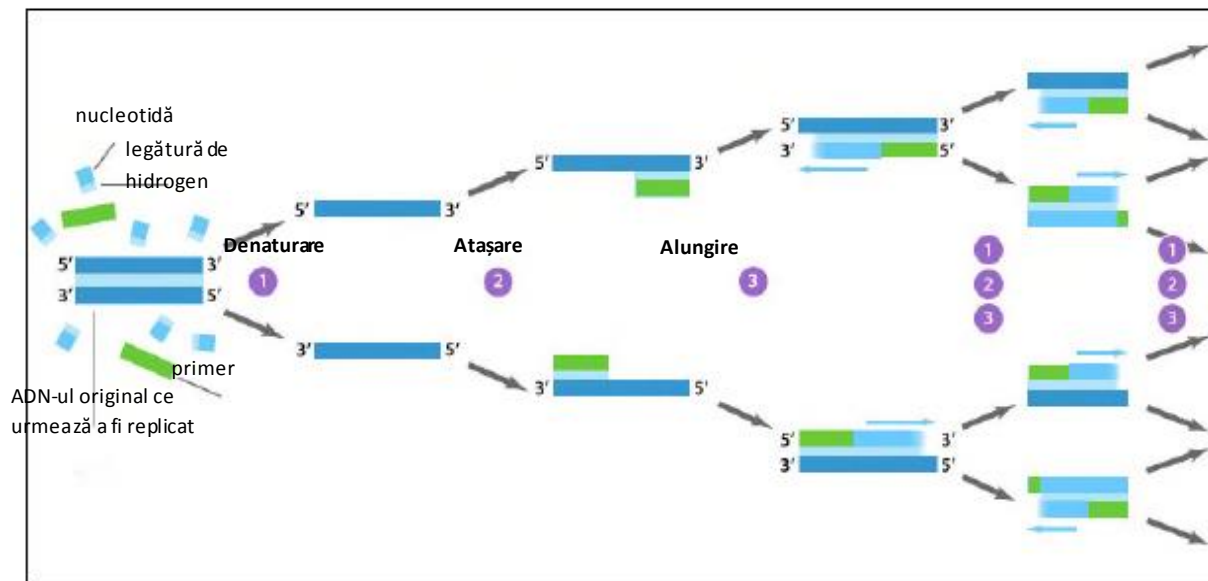


Fig. 1. Principiul reacției de polimerizare în lanț.

https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php

Interpretarea rezultatelor analizei poate avea loc prin separarea produselor de amplificare în gel de agaroză sau pe monitorul computerului cu ajutorul probelor de fluorescență.

Trebuie remarcat faptul că procesul de acumulare a anumitor produse de amplificare prin progresia geometrică durează doar o anumită perioadă, iar eficiența acestuia scade în mod critic. Acest lucru se datorează așa-numitului "efect de platou".

Termenul „efect de platou” este utilizat pentru a descrie procesul de acumulare a produselor de amplificare în ultimele cicluri de PCR. În funcție de condițiile și de numărul ciclurilor reacției de amplificare, următorii factori influențează perioada efectului de „platou”:

- fertilizarea substraturilor (dNTP și primere);
- stabilitatea unor reactivi separați ai mediului de reacție (dNTP și enzimă);
- cantitatea de inhibitori, inclusiv pirofosfați și duplexuri ADN;
- formarea primeri-dimeri;
- denaturarea incompletă a ADN-ului țintă la concentrația mare a produselor de amplificare.

Cu cât concentrația inițială a ADN-ului țintă este mai scăzută, cu atât mai mare este riscul reacției la platou. Acest moment durează până când numărul produselor de amplificare specifice va fi suficient pentru a fi analizat.

Astăzi există multe modificări ale reacției de polimerizare în lanț:

1. *PCR-RFLP (PCR-Polimorfismul lungimilor fragmentelor de restricție)*, inițial are loc PCR, și apoi restricționarea produsului PCR derivat
2. *PCR în timp real*. Observarea reacției în timp real, măsurând direct acumularea produsului PCR în fiecare ciclu. Caracteristica fundamentală a reacției PCR în timp real, în comparație cu PCR clasică, este capacitatea de a cuantifica ADN/ARN în materialul care face obiectul studiului, absența etapei electroforezei, cerințe mai puțin stringente pentru organizarea laboratorului PCR și înregistrarea automată și interpretarea rezultatelor.
3. *RT-PCR (Transcrierea inversă PCR)*. Produsul de pornire este ARN-ul, din care se primește enzima reverstranscriptazei ADN-ului. Acest lucru este convenabil, de exemplu, pentru a afla expresiile anumitor gene.

4. *Reacția PCR imbricată*. Aceasta este utilizată pentru a reduce proporția de subproduse ale reacției. Sunt utilizate două perechi de primere și sunt desfășurate două reacții consecutive. Catena ADN din cadrul produsului primei reacții este amplificată utilizând cea de-a doua pereche de primere.
5. *Reacția PCR inversă*. Se utilizează în cazul în care se cunoaște doar o suprafață mică din cadrul secvenței dorite. Această metodă este în mod special utilă pentru determinarea secvențelor de flanșare după introducerea ADN-ului în genom. Pentru a efectua o reacție PCR inversă, o serie de secțiuni ale ADN-ului sunt digerate prin digestie restrictivă urmată de legare. Prin urmare, fragmentele cunoscute sunt formate la ambele capete ale unui sit necunoscut, după care este posibilă efectuarea unei reacții PCR obișnuite.
6. *Reacția PCR asimetrică*. Aceasta se realizează atunci când este necesar să se amplifice unul dintre lanțurile ADN-ului inițial. Aceasta este utilizată în unele tehnici de secvențiere și analiză a hibridizării. Reacția PCR se efectuează în conformitate cu scenariul clasic, cu excepția faptului că unul dintre primeri este preluat într-un surplus mare.
7. *Reacția PCR cu rază lungă de acțiune*. Aceasta se utilizează pentru amplificarea intervalelor lungi de ADN (10 kbp și mai mult). Se folosesc două polimeraze, dintre care una este un factor de procesare ridicat Taq polimeraza (adică o polimerază capabilă să sintetizeze un lanț lung de ADN într-o singură trecere), iar cealaltă este ADN polimeraza cu activitatea 3'-5' endonuclează. A doua polimerază este necesară pentru corectarea erorilor făcute de prima.
8. *Reacția PCR multiplexă* (PCR Multiplex). Sunt utilizate mai multe perechi de primere și sunt amplificate simultan mai multe fragmente.

Una dintre principalele sarcini atunci când se utilizează metoda PCR pentru a soluționa o anumită întrebare este proiectarea corectă a primerului (în cazul probei PCR și fluorescenței în timp real). Primerii trebuie să îndeplinească următoarele cerințe.

1. Primerii ar trebui să fie specifici. O atenție deosebită se acordă capetelor 3'-ale primerilor, deoarece Taq-ADN polimeraza începe extragerea segmentului complementar de ADN din acestea. Dacă specificitatea acestora este insuficientă, există o probabilitate mare de sinteză a produselor de amplificare nespecificate (fragmente scurte sau lungi). Aceasta poate fi văzută sub forma unor benzi suplimentare grele sau ușoare pe electroforeogramă. Uneori aceasta interferează cu interpretarea rezultatelor amplificării. În plus, o parte din primeri și dNTP se cheltuiesc pe sinteza ADN-ului nespecific, ceea ce duce la o scădere semnificativă a sensibilității.

2. Primerii nu ar trebui să formeze diguri și bucle, ceea ce înseamnă că lanțurile duble stabile nu ar trebui să aibă loc în rezultatul atașării primerilor înșiși sau a unuia cu celălalt.

Diverse resurse on-line, precum și programe informatice, sunt utilizate pentru a lucra la construcția primerilor și secvențelor nucleotidice. Cele mai cunoscute sunt:

Proiectarea primerilor și probelor de fluorescență pentru reacțiile de polimerizare în lanț
<https://bitesizebio.com/18992/a-primer-for-designing-degenerate-primers/>,
http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi, <https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/genefisher2/>

Design de Primer și Spectrometrie Fluorescentă pentru PCR Primer Express în timp real
v. 2.0 <http://www.appliedbiosystems.com/support/apptech/>

Testarea virtuală și simularea unui sistem de reacție în lanțe <http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>

Căutarea și alinierea secvențelor de nucleotide BLAST <http://www.ncbi.nih.gov>.

Pentru alinierea multiplă a nucleotidelor și secvențelor de aminoacizi sunt utilizate
<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

Pentru analiza filogenetică și planificarea unui filogram <http://www.phylogeny.fr/version2/cgi/index.cgi/>

Cel mai frecvent program de calculator pentru analiza secvențelor de nucleotide obținute este (Chromas Lite 2.1.1).

2.6.2 Reacția PCR în timp real

Unul dintre tipurile de reacție PCR care este utilizat cel mai adesea în laboratoarele de diagnostic este reacția PCR în timp real (RT PCR). Secvența nucleotidică a segmentului complementar de ADN care este flancat de primere etichetate cu o etichetă fluorescentă (probă fluorescentă) este utilizată pentru acest tip de PCR, pe lângă componentii standard (tampon PCR, clorură de magneziu, trifosfați deoxinucleotide, ADN polimeraza, primere directe și inversate). Utilizarea probelor fluorescente asigură monitorizarea continuă a semnalului fluorescenței de pe ecranul computerului. Avantajul unei astfel de modificări a reacției PCR este de a reduce riscul contaminării, deoarece nu este necesară separarea produselor de amplificare a gelului strălucitor. În plus, utilizarea RT-PCR poate detecta două sau mai multe secvențe nucleotidice într-un singur tub de testare (analiza multiplexă) și poate cuantifica rezultatele studiului.

Amplificatorul înregistrează valorile fluorescenței și stabilește curbele de amplificare pe calculator, folosind un software de pe monitor în timpul reacției PCR în timp real. Principalul criteriu de evaluare a rezultatelor este determinarea ciclului-limită C_t (*limita ciclului*) care caracterizează un anumit ciclu de reacție de polimerizare în lanț în timp real, ceea ce indică o creștere semnificativă a fluorescenței din punct de vedere statistic în comparație cu nivelul de fond (Fig. 2)

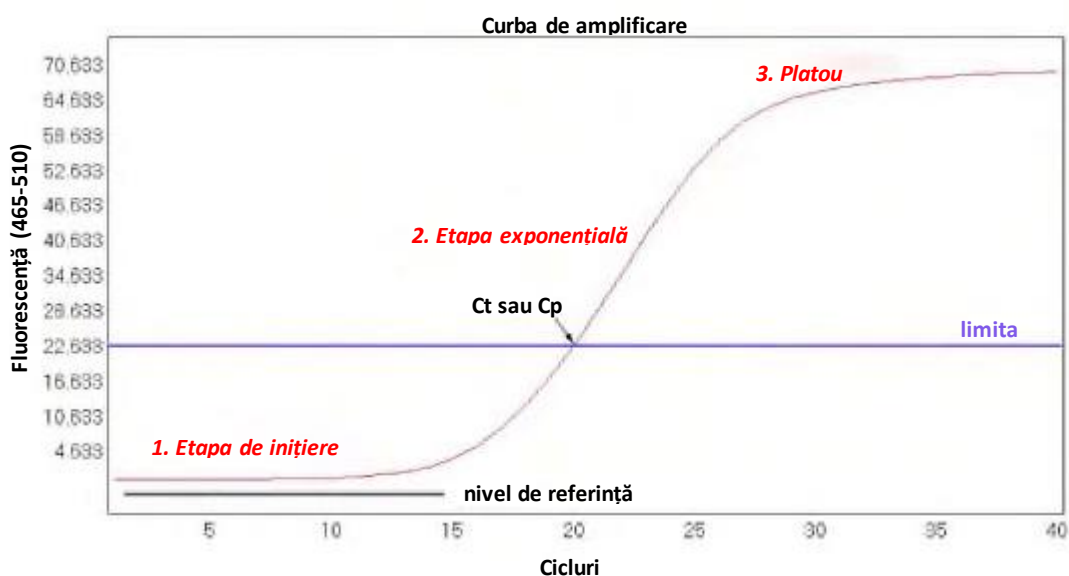


Fig. 2 Reprezentarea schematică a curbei cinetice a amplificării PCR în timp real.

(<https://www.highveld.com/pcr/real-time-pcr-quantification-analysis.html>).

Tehnologiile care diferă după metoda de generare a fluorescenței sunt utilizate pentru detectarea produselor de amplificare în timp real;

Următoarele modificări sunt cel mai frecvent utilizate:

1. **TaqMan.** Baza acestei modificări este utilizarea probelor oligonucleotide etichetate cu colorant fluorescent la capătul 5' și printr-un colorant fluorescent la capătul 3'. Aceste probe sunt complementare zonei de amplificare. Amotizorul absoarbe radiația emisă de eticheta fluorescentă, cu condiția ca proba să fie intactă. În etapa de alungire, Taq-ADN polimeraza sintetizează stratul complementar de ADN și începe să separe proba prin intermediul activității exonucleazei 5' la atingerea locului de hibridizare cu proba. În urma acestui fapt, eticheta

fluorescentă este separată de amortizor, iar radiațiile sale pot fi detectate de sistemul fotooptic al dispozitivului (Fig. 3).

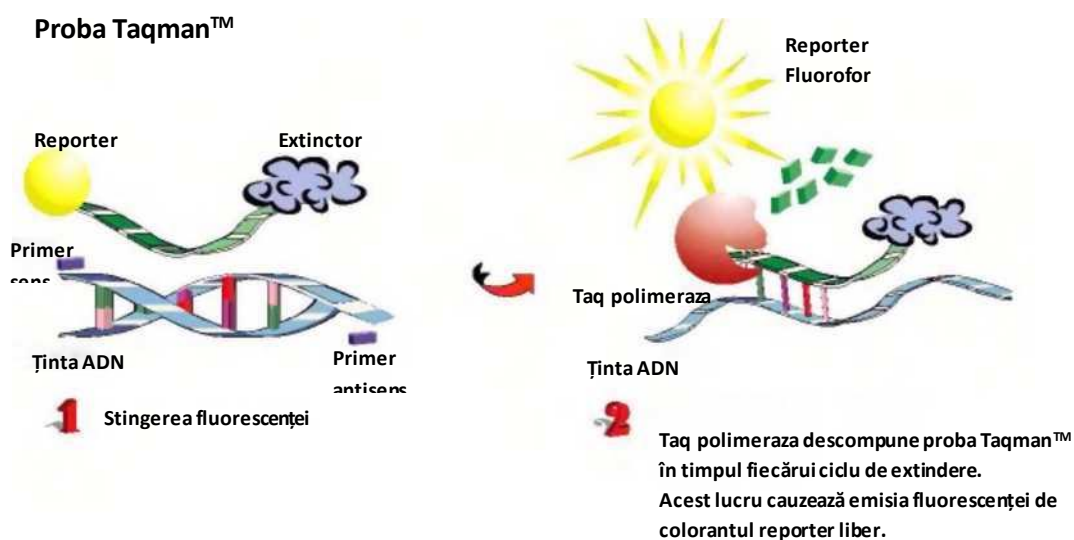


Fig. 3. Conceptul probelor TaqMan

<http://www.biogene.com/ApplicationNotes/Amplification/Methodology/Chemistries.htm>

2. **Balizele moleculare.** Diferența de TaqMan este că capetele probelor, care sunt etichete fluorescente și, respectiv, manechine fluorescente, sunt complementare una alteia. Atunci când primerii sunt atașați, aceștia se unesc și formează o structură sub formă de cui (tijă-bucă), în care zona complementarității probei cu matricea se află în buclă. În acest caz, amortizorul absoarbe radiația colorantului. Atunci când eșantionul este hibridizat cu matricea, structura secundară este distrusă, eticheta fluorescentă și amortizorul se dispersează la o distanță la care amortizorul nu mai absoarbe radiația colorantului și poate fi fixat semnalul fluorescenței (Fig. 4).

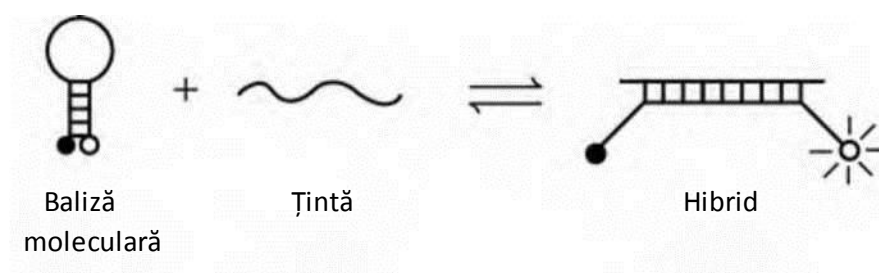


Fig. 4. Conceptul de Balize Moleculare

<https://www.pnas.org/content/96/11/6394>

3. **FRET (Transfer de energie prin rezonanță fluorescentă).** În această modificare sunt utilizate două probe etichetate cu marcaj fluorescent. Principiul metodei este de a transfera energia dintr-un fluorofor, situat la capătul 3' al primului eșantion în altul situat la capătul 5' al celui de-al doilea eșantion, în cazul în care distanța dintre aceștia este de 1-3 nucleotide. În timpul legării

simultane a ambelor probe cu ADN, matricea de radiație de la primul fluorofor este transmisă la cel de-al doilea, iar radiația acestuia este detectată de dispozitiv (Figura 5).

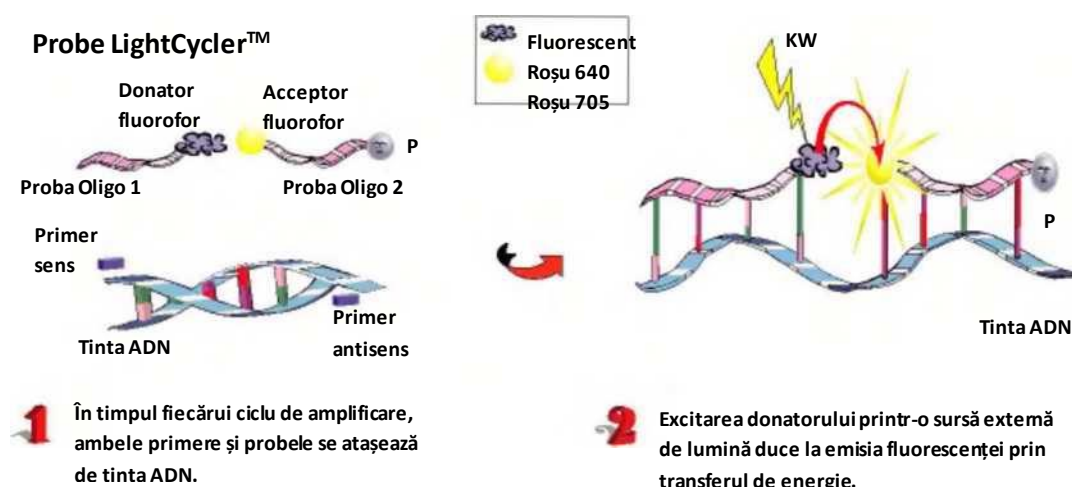


Fig. 5. Conceptul FRET

http://www.biogene.com/ApplicationNotes/Analysis/Application/Hybridisation_Probes.htm

Caracteristicile spectrale ale principalilor coloranți fluorescenți utilizați în sinteza probelor pentru reacția PCR în timp real sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1. Caracteristicile spectrale ale coloranților fluorescenți și ale amortizorilor de fluorescență

Caracteristică:	FAM	JOE	ROX	BHQ1
Proprietăți, λ_{max}	492 nm	520 nm	580 nm	534 nm
Fluorescență, λ_{max}	520 nm	548 nm	605 nm	-
Producția cuantică	~ 0,8	0,75	~ 0,8	-

Organizarea lucrului în laboratoarele de diagnostic PCR

Cerințe pentru încăperi

Organizarea adecvată a laboratorului PCR este crucială pentru obținerea unor rezultate de cercetare fiabile. Principiul organizării laboratorului depinde de metoda de detectare a produselor de amplificare. Există două modalități fundamentale diferite de obținere a rezultatelor cercetării în timpul PCR. Una dintre acestea este diviziunea produselor de amplificare în gel de agaroză, iar cealaltă este obținerea rezultatelor cercetărilor efectuate la un monitor computerizat sub forma curbelor de amplificare atunci când se efectuează testul PCR în timp real.

În general, ar trebui create ateliere separate pentru fiecare etapă a testului PCR.

1. *Camera de primire, înregistrare și prelucrare inițială a probelor*, care este destinată înregistrării probelor, depozitării temporare a acestora și pregătirii pentru extracția ADN-ului (omogenizare). Camera trebuie să fie

amplasată într-o unitate separată și echipată cu un dulap laminar (clasa de protecție II-III, în funcție de gradul de patogenitate al obiectelor studiate).

2. *Camera de extracție a acizilor nucleici* are ca scop extracția acizilor nucleici din materialul testat care a fost supus prelucrării în zona anterioară, precum și depozitarea mostrelor de ADN. Mostrele de acizi nucleici și reactivii lor trebuie depozitate în frigider separate.

3. *Camera de amestecare a reacțiilor* este concepută pentru a asambla componentii amestecului pentru PCR (această cameră poate fi absentă în cazul utilizării seturilor comerciale gata fabricate). O astfel de zonă poate fi aranjată cu ajutorul unei boxe separate pentru testul PCR. Cu toate acestea, dacă în laborator există camere neocupate, o asemenea cameră este recomandată.

4. *Camera PCR* este concepută pentru a efectua analiza PCR și detectarea în timp real a rezultatelor. În această cameră sunt plasați amplificatorii pentru testul PCR în timp real și/sau PCR clasic.

5. *O cameră pentru separarea produselor de amplificare în gel de agaroză (electroforeză)* este pentru vizualizarea rezultatelor studiului în timpul testului PCR clasic. Această zonă este cea mai periculoasă în ceea ce privește contaminarea cu produse de amplificare și obținerea rezultatelor fals pozitive ale studiului. Camera pentru electroforeză este plasată cât mai departe posibil de camerele principale.

Toate camerele laboratorului PCR trebuie să aibă o pre-boxă în care personalul să-și schimbe salopetele.

Planificarea generală a laboratorului PCR, amplasarea camerelor de lucru în acesta ar trebui să asigure deplasarea mostrelor studiate într-o singură direcție.

În ceea ce privește sarcina funcțională, toate camerele trebuie echipate cu un set de echipamente, reactivi și consumabile necesare.

Extracția acizilor nucleici trebuie efectuată în boxe PCR (sau în boxe de siguranță biologică, adică în dulapuri laminare din clasa de protecție II). Se recomandă mărirea numărului de boxe la sarcini ridicate.

Podeaua din laboratorul PCR se acoperă cu plăci care nu trebuie să fie alunecoase, iar pereții și plafoanele trebuie vopsiți cu vopsea de ulei rezistentă la detergenți și dezinfectanți. Lămpile bactericide cu o viteză de 2 W/m³ vor fi instalate în toate spațiile. Filmele de protecție ușoară rezistente la dezinfectanți sunt folosite pentru a proteja mesele de lucru de lumina directă a soarelui. Mobilierul de laborator ar trebui să aibă o acoperire rezistentă la detergenți și dezinfectanți, iar suprafața meselor nu ar trebui să aibă fisuri și încrețituri. Nu se recomandă utilizarea geamurilor oarbe din cauza acumulării prafului pe acestea.

Laboratorul PCR trebuie echipat cu un sistem de ventilație cu flux cu alimentarea aerului prin filtre, în conformitate cu cerințele sanitare și epidemiologice în vigoare.

Următoarele spații auxiliare trebuie, de asemenea, să fie disponibile în laboratorul PCR:

- 1) biroul Șefului de laborator;
- 2) camera personalului;
- 3) toaleta;
- 4) camere auxiliare;
- 5) o cameră cu autoclavă pentru dezinfectarea materialului de testare.

Încăperile laboratorului PCR trebuie să fie cu protecție împotriva rozătoarelor și insectelor și să fie echipate, de asemenea, cu echipamente de stingere a incendiilor.

Cerințe privind echipamentele de laborator

Fiecare cameră a laboratorului PCR trebuie să fie dotată cu un set adecvat de echipamente de laborator pe baza sarcinii sale funcționale, precum și în funcție de tehnicile utilizate.

Nu se permite să se transporte dispozitive, pipete automate etc. dintr-o cameră în alta.

Echipamentul utilizat în laborator trebuie să fie viabil din punct de vedere tehnic, să aibă pașaport tehnic și manual.

Instrumentele de măsurare, inclusiv pipetele automate, termometrele, vasele de măsurare ar trebui calibrate în instalații adecvate pentru controlul metrologic.

Este necesar să se controleze schimbarea ajutoarelor după fiecare manipulare, să se folosească micro-probe de unică folosință cu capace bine fixate, să se utilizeze termostate solide pentru extragerea acizilor nucleici din materialul biologic pentru a preveni contaminarea încrucișată și apariția rezultatelor fals pozitive.

Prelevarea probelor și pregătirea pentru cercetare

Prelevarea probelor se efectuează în conformitate cu documentele de reglementare, recomandările și orientările metodologice sau alte documente, care precizează cerințele de bază pentru selectarea unui anumit material. Cu toate acestea, în majoritatea cazurilor, aceste documente prevăd norme de selecție care vizează formarea unui eșantion reprezentativ pentru studiul unui anumit indicator. Principala condiție în selectarea probelor pentru studiile genetice moleculare este evitarea contaminării încrucișate a acestora. Un lucrător trebuie să selecteze probele cu mănuși de cauciuc și, dacă este posibil să utilizeze instrumente de unică folosință (prelevare de materiale biologice). Dacă se folosesc instrumente reutilizabile, acestea trebuie tratate cu detergenți și uscate cu atenție în cazul transferului de la o probă la alta. Probele sunt prelevate în vase curate sau din plastic, iar pungile dispensabile de plastic pot fi, de asemenea, utilizate.

Prelevarea probelor necesită omogenizarea probei pentru o mai bună extracție a acizilor nucleici. În funcție de tipul de secțiuni, aceasta poate fi amestecată la o moară de laborator sau blender, lovind cu un pistil. Anumite probe nu necesită pregătire preliminară (sânge, urină, spălături).

Extracția acidului deoxiribonucleic (ADN)

Există multe abordări diferite în ceea ce privește extracția ADN-ului. Cele mai utilizate metode sunt sorbția ADN-ului pe oxid de siliciu, extracția ADN-ului utilizând particule magnetice, extracția ADN-ului pe coloane. Metoda CTAB pentru extracția ADN-ului este adesea utilizată pentru extracția ADN-ului din plante.

Extracția ADN-ului prin sorbție pe oxid de siliciu după R. Boom.

Echipamente și consumabile

1. cutie laminară;
2. Microcentrifugă 13-14 mii rpm;
3. Centrifugă - Vortex;
4. Termostat solid pentru mostrele de tip „Eppendorf” de 25-100°C;
5. Un set de distribuitori automați de volum variabil;
6. Duze din plastic de unică folosință cu filtru de 200 μl;
7. Duze din plastic de unică folosință cu filtru de 10 μl;
8. Duze din plastic de unică folosință cu filtru de 1000 μl;
9. Microtuburi din plastic de tip Eppendorf de 1,5 ml;
10. Trepiede din plastic pentru microtuburi;
11. Recipient pentru plastic utilizat;
12. Mănuși de cauciuc de unică folosință fără talc;
13. Trepiede pentru microtuburi de 1,5 ml;
14. Reactivi pentru extracția ADN-ului

- Soluție de liză (guanidentiocionate, 0,1 M Tris-HCl (pH 6.4), 0,2 M Na-EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100);
- Sorbent de ADN (oxid de siliciu);
- Soluție de clătire 1 (6 guanidentiocionate, 0,1 M Tris-HCl (pH 6.4))
- Soluție de clătire 2 (etanol 70%, 10 mM Tris-HCl, (pH 7.5));
- Tampon pentru soluția tampon de eluție TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM Na-EDTA

Procedura de lucru

1. Soluția de liză și soluția de clătire 1 (dacă au fost păstrate la 2-8°C) se încălzesc la 65°C până când cristalele se dizolvă complet).
2. Numărul necesar de tuburi de unică folosință este instalat în trepied pe baza unui tub de testare pentru fiecare eșantion, după care acestea trebuie să fie marcate.
3. Un tub sorbent este agitat pe un vortex până când acesta este complet resuspendat.
4. Adăugați 300 μl de soluție de liză, 25 μl de sorbent și 100 μl de probe de testare la toate tuburile de testare, apoi amestecați bine tuburile de testare în vortex și încălziți-le în termostat la (65 ± 0,5)°C timp de 5 minute.
5. Tuburile de testare sunt vortexate și păstrate la temperatura camerei timp de 5 minute înainte de depunerea completă a sorbentului și apoi centrifugate timp de 30 de secunde la 10x10³g. Supernatantul este îndepărtat cu atenție, pentru a nu șterge absorbentul sedimentului (pentru lichidul selectat este comod să se folosească o pompă de vid cu obturator pentru balon).
6. Adăugați 300 μl din soluția de clătire 1, resuspendați-o pe vortex și precipitați-o prin centrifugare timp de 30 de secunde la 10x10³ g în fiecare tub, și îndepărtați supernatantul cu atenție.
7. Adăugați 500 μl din soluția de clătire 2 la fiecare tub de testare, resuspendați-o într-un vortex și precipitați-o prin centrifugare timp de 30 de secunde la 10x10³. Îndepărtați cu grijă supernatantul și repetați procedura de spălare cu soluția de clătire 2.
8. Precipitatul sorbent se usucă într-un termostat la (65 ± 0,5)°C timp de 5-7 minute, până când lichidul este complet evaporat.
9. Adăugați 50 μl de soluție tampon de eluție (soluție tampon TE) la fiecare tub, resuspendați-o cu atenție și plasați-o în termostat la (65 ± 0,5)°C timp de 5-6 minute și scuturați-o în vortex la fiecare minut.
10. Precipitați sorbentul pe microcentrifugă timp de 1 minut la 10x 10³g.

Lichidul supernatant conține mostre de ADN purificat, care sunt utilizate pentru studii ulterioare.

Extracția acidului ribonucleic (ARN)

De asemenea, se utilizează abordări diferite pentru extracția ARN-ului, de exemplu, sorbția ARN-ului pe oxid de siliciu, extracția ARN-ului cu particule magnetice, extracția cu fenol-cloroform etc.

Echipamente și consumabile

1. cutie laminară;
 2. Microcentrifugă 13-14 mii rpm;
 3. Centrifugă - Vortex;
 4. Termostat solid pentru mostrele de tip „Eppendorf” de 25-100°C;
 5. Un set de distribuitori automați de volum variabil;
 6. Duze din plastic de unică folosință cu filtru de 200 μl;
 7. Duze din plastic de unică folosință cu filtru de 10 μl;
 8. Duze din plastic de unică folosință cu filtru de 1000 μl;
 9. Microtuburi din plastic de tip Eppendorf de 1,5 ml;
 10. Trepiede din plastic pentru microtuburi;
 11. Recipient pentru plastic utilizat;
 12. Mănuși de cauciuc de unică folosință fără talc;
 13. Trepiede pentru microtuburi de 1,5 ml;
- Reactivi pentru legarea ARN-ului (guanidentiocionate, 0,35 M Tris-HCl (pH 6.4), 0,2 M Na-EDTA (pH 8.0), 3% Triton X-100, 6% MgCl₂);
 - Sorbent de ADN (oxid de siliciu);
 - Soluție de clătire 1 (guanidentiocionate, 0,1 M Tris-HCl (pH 6.4))

- Soluție de clătire 2 (etanol 70%, 10 mM Tris-HCl, (pH 7.5));
- Tampon pentru soluția tampon de eluție TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM Na-EDTA)

Procedura de lucru

1. Soluția pentru legarea ARN-ului și soluția de clătire 1 (dacă au fost păstrate la 2-8°C) se încălzesc la 65°C până când cristalele se dizolvă complet).
2. Numărul necesar de tuburi de unică folosință este instalat în trepied pe baza unui tub de testare pentru fiecare eșantion, după care acestea trebuie să fie marcate.
3. Un tub sorbent este agitat pe un vortex până când acesta este complet resuspendat.
4. Adăugați 300 μl de soluție pentru legarea ARN-ului, 25 μl de sorbent și 100 μl de probe de testare la toate tuburile de testare, apoi amestecați bine tuburile de testare în vortex și încălziți-le în termostat la $(65 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ timp de 5 minute.
5. Tuburile de testare sunt vortexate și păstrate la temperatura camerei timp de 5 minute înainte de depunerea completă a sorbentului și apoi centrifugate timp de 30 de secunde la $10 \times 10^3 \text{g}$. Supernatantul este îndepărtat cu atenție, pentru a nu șterge absorbantul sedimentului (pentru lichidul selectat este comod să se folosească o pompă de vid cu obturator pentru balon).
6. Adăugați 300 μl din soluția de clătire 1, resuspendați-o pe vortex și precipitați-o prin centrifugare timp de 30 de secunde la $10 \times 10^3 \text{g}$ în fiecare tub, și îndepărtați supernatantul cu atenție.
7. Adăugați 500 μl din soluția de clătire 2 la fiecare tub de testare, resuspendați-o într-un vortex și precipitați-o prin centrifugare timp de 30 de secunde la $10 \times 10^3 \text{g}$. Îndepărtați cu grijă supernatantul și repetați procedura de spălare cu soluția de clătire 2.
8. Precipitatul sorbent se usucă într-un termostat la $(65 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ timp de 5-7 minute, până când lichidul este complet evaporat.
9. Adăugați 50 μl de soluție tampon de eluție (soluție tampon TE) la fiecare tub, resuspendați-o cu atenție și plasați-o în termostat la $(65 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ timp de 5-6 minute și scuturați-o în vortex la fiecare minut.
10. Precipitați sorbentul pe microcentrifugă timp de 1 minut la $10 \times 10^3 \text{g}$.

Lichidul supernatant conține mostre de ARN purificat, care sunt utilizate pentru studii ulterioare.

Transcrierea inversă

Transcrierea inversă este un proces de sintetizare a ADN-urilor complementare utilizând ARN-ul ca matrice. Aceasta este numită „inversă” deoarece transcrierea are loc în majoritatea organismelor vii în altă direcție, adică transcrierea ARN-ului este sintetizată din molecula ADN. Procesul transcrierii inverse este furnizat de o enzimă specială, numită transcriptază inversă (revertază). Cu ajutorul invertazei, trifosfații dezoxiribonucleozidici sunt asociați în mod complementar cu matricea ARN-ului și este sintetizat un lanț de ADN. În acest caz, se formează o moleculă hibridă unită de ARN-ADN. Apoi enzima ribonuclează H elimină lanțul de ribonucleotide din molecula hibrid, iar sinteza celui de-al doilea lanț de ADN se realizează în mod complementar în prezența enzimei ADN polimerazei pe lanțul ADN.

Seturile comerciale sunt utilizate pentru transcrierea inversă.

Reacția PCR în timp real (privind exemplul determinării promotorului 35S în soia)

Promotorul 35S este unul din regulatorii expresiei de inserție transgenică pentru crearea plantelor modificate genetic și este utilizat pentru verificarea specimenelor de OMG-uri. De regulă, pentru controlul alocării ADN pentru fiecare instalație, se utilizează detectarea locului unei gene endogene specifice. Ca control endogen pentru soia, se utilizează cel mai frecvent gena care codifică lectina (lec).

Material pentru studiu: mostre de ADN de fasole sau de frunze de soia; mostre de ADN de control.

Echipament, reactivi, utensile.

1. Sistem PCR în timp real [ABi Prism 7 000 (Applied Biosystems), Rotor-Gene (Corbett Research), Q-Cycler (Bio-Rad) CFX 96 (Bio-Rad) sau similar;

2. Boxă PCB cu lampă cu raze UV;
3. Centrifugă Vortex;
4. Frigider cu temperatura de 2-8°C și un congelator cu temperatura de 20°C;
5. Un set de distribuitori automați de volum variabil;
6. Duze de unică folosință cu o barieră de aerosoli;
7. Benzi optice cu 8 găuri de 0,2 ml;
8. Panou izolant cu 96 de orificii pentru microtuburi;
9. Tuburi din polipropilenă de unică folosință cu o capacitate de 1,5 ml³ de tip „Eppendorf”.
10. Un set de reactivi pentru detectarea promotorului 35S și lecitinei de soia:
 - amestec PCR [tampon PCR (fără MgCl₂); soluție de MgCl₂ cu concentrația molară de 2,5 mmol; amestec de deoxiribonucleotide trifosfați (dNTP) cu concentrația molară de 2,5 mmol fiecare; primeri de 5 pmol pentru detectarea promotorului 35S și a lecitinei de soia, probă fluorescentă de 2,5 ppm pentru detectarea promotorului 35S (etichetat cu colorant fluorescent FAM) și lecitină de soia (etichetată cu colorant fluorescent JOE), apă deionizată.
 - Taq ADN polimeraza;
 - Uracil-ADN-glicolilaza

Procedura de lucru

Înainte de analiză pregătiți (sau dezghețați) un amestec PCR. Preparați un amestec de reacție pentru speciile de testare la 19,7 μl de amestec PCR, 0,2 μl de soluție Taq ADN polimerază și 0,1 μl de uracil-ADN-glicozilază pentru fiecare eșantion. Amestecul preparat se amestecă bine pe o centrifugă vortex.

Luați numărul necesar de tuburi de 0,2 ml, adăugați în fiecare gaură 20,0 μl din amestecul PCR obținut și 5,0 μl din probele de ADN examinate în fiecare gaură.

Pentru a împiedica primirea unor rezultate fals pozitive și fals negative ale unui test PCR în timp real, se utilizează următoarele controale:

- 1) pozitiv;
- 2) negativ;
- 3) controlul fără matrice (NTC, nici un control de model);
- 4) controlul selecției negative (CSN).

Se aplică 5.0 μl de reactivi de „Control Pozitiv” și „Control Negativ” în găurile corespunzătoare pentru controlul pozitiv și negativ (prevăzute pentru a monitoriza corectitudinea reacției PCR în timp real), iar pentru controlul NTC se aplică 5.0 μL de apă deionizată și pentru controlul NSC - 5.0 μL de NSC, care a fost obținut atunci când ADN-ul a fost izolat.

Studiile se efectuează în conformitate cu „Manualul de operare” respectiv la un anumit test PCR în timp real.

Profilul de temperatură al amplificării este dat în conformitate cu datele din **Tabelul 2.**

Tabelul 2. Protocolul privind amplificarea temperaturii

Stadiu	Mod de amplificare		Proces	Numărul de cicluri
	Temperatura, ° C	timp, min.		
1	50	2,0	Activarea ADN-uracil – glicozilazei	1
2	94	9,0	Activarea polimerazei	1
3	95	0,2	Denaturarea ADN-ului	45
	60	1,0	Ataşarea primerilor *	
	72	0,3	Alungirea lanțului ADN	

Notă: * - Datele privind fluorescența sunt colectate în această etapă

Pentru a interpreta rezultatele determinării calitative a conținutului de OMG-uri, se efectuează o analiză a curbelor de amplificare a eșantioanelor și a controalelor:

1. Un eșantion este considerat pozitiv dacă există o amplificare a colorantului fluorescent FAM (promotor 35S) și JOE (lecitină de soia) (Fig. 6).

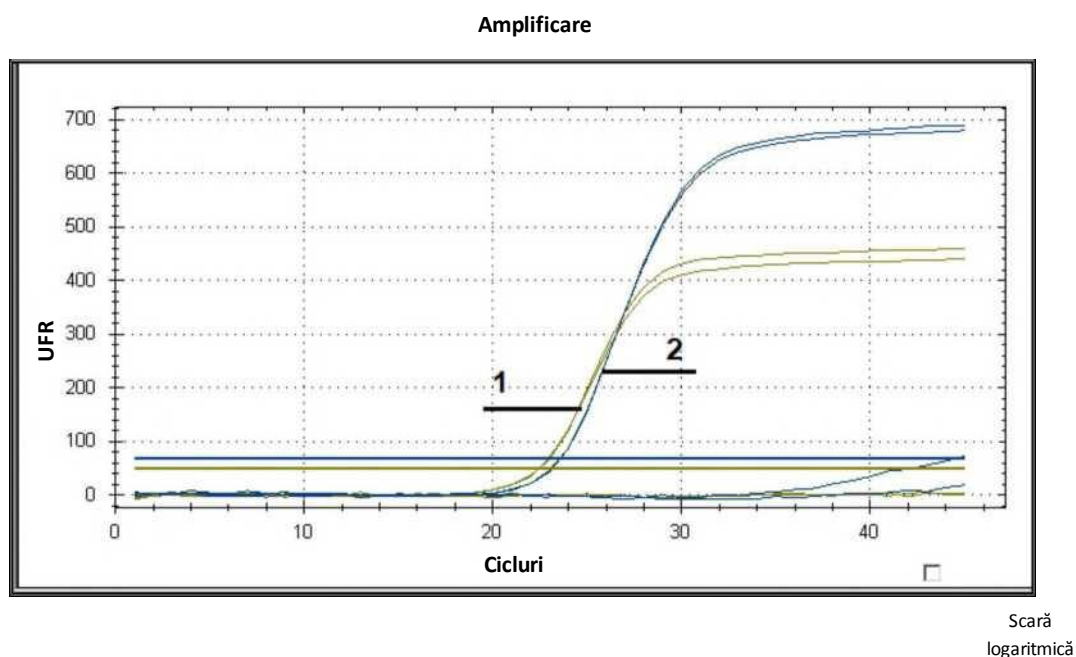


Fig. 6. Exemplu de eșantion de soia în care a fost detectat OMG-ul:

1. – curbe de amplificare a lecitinei de soia, 2. – Curbe de amplificare ale promotorului 35S;

UFR – unități fluorescente relative

2. Eșantionul este considerat negativ dacă există o amplificare a lectinei de soia (colorant JOE) cu valoarea Ct 23-24 (ciclu de limitare a reacției de polimerizare în lanț în timp real, care caracterizează un anumit ciclu de PCR, în care semnalul fluorescenței depășește o anumită valoare de bază) și nu există nici amplificare a promotorului 35S (Fig. 7).

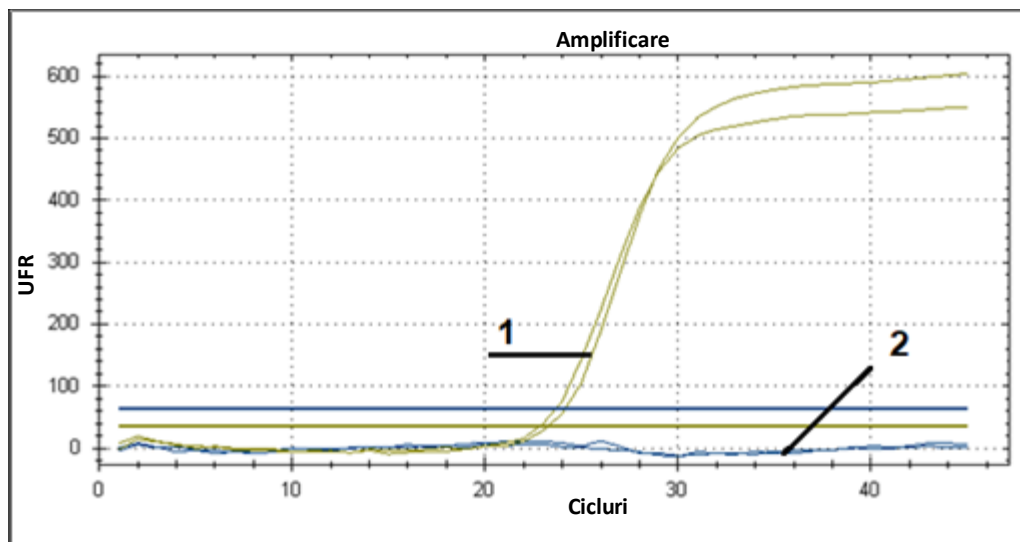


Fig. 7. Exemplu de eșantion de soia în care a fost detectat OMG-ul:

1. – curbe de amplificare a lectinei de soia
2. – Curbe de amplificare ale promotorului 35S UFR
3. Ar trebui să existe o amplificare pentru FAM (promotor 35S) și JOE (lectină de soia) în proba de control pozitiv;
4. Trebuie să existe o amplificare doar pentru JOE (lectină de soia) în proba de control negativ;
5. Controalele NTC și NSC nu au amplificare pentru nici unul dintre coloranți.

Analiza nu se ia în considerare:

1. În cazul în care nu există amplificarea colorantului JOE în proba testată;
2. În cazul în care nu există amplificarea coloranților FAM și JOE într-un control pozitiv;
3. În cazul în care există amplificarea colorantului FAM într-un control negativ;
4. În cazul în care există amplificarea colorantului FAM sau JOE în cadrul controalelor NTC și/sau NSC;
5. Dacă există diferențe mari în valoarea Ct în măsurătorile paralele ($SD \wedge 0,05$).

Electroforeza orizontală a produselor de amplificare în gel de agaroză

Reactivi și echipament

1. Camera pentru electroforeză orizontală;
2. Sursă DC;
3. Un set de distribuitori automați de volum variabil;
4. Duze universale din plastic de unică folosință cu filtru de 200 μ l;
5. Transiluminator pentru vizualizarea produselor de separare;
6. Agaroză;

7. Tampon de tris-borat (tampon TBE);
8. Bromură de etidiu;
9. Indicatorul greutății moleculare.

Prepararea gelului de agaroză

Pentru prepararea gelului, o greutate adecvată de agaroză, de exemplu, „Top Vision” (Fermentas, Lituania), se topește într-un tampon de tris-borat (TBE) într-un cuptor cu microunde. După topirea completă a agarozei în amestec se adaugă un colorant intercalant de bromură de etidiu la concentrația finală (2 mg/l), se amestecă bine și se răcește la 50-60°C. Gelul se toarnă într-o formă specială (cu o grosime de 5-6 mm) și se pune într-o spată pentru formarea godeurilor. După solidificarea completă a gelului (30 de minute la temperatura camerei) îndepărtați ușor spată fără a distruge godeurile.

Procedura de lucru

Gelul gata este transferat în camera de electroforeză astfel încât godeurile să fie orientate spre electrodul negativ (anod). ADN-ul din godeuri se mișcă către electrodul pozitiv (catod). Turnați tamponul TBE preparat pentru a acoperi gelul cu 4-5 mm deasupra acestuia. Mostrele cu produse de amplificare sunt amestecate cu un tampon de încărcare de 6x și sunt inserate cu atenție în partea inferioară a godeului. Simultan cu mostrele se introduce un indicator al lungimii fragmentelor de ADN. Conectați camera la sursa curentă, păstrând polaritatea. ADN-ul încărcat negativ începe să se miște în gel de la minus la plus. În acest caz, moleculele mai scurte de ADN se mișcă mai repede decât cele lungi.

Viteza de mișcare a ADN-ului în gel de agaroză este influențată de concentrația agarozei, tensiunea câmpului electric, temperatură și așa mai departe. Toate moleculele de aceeași dimensiune se mișcă cu aceeași viteză.

Electroforeza se efectuează într-un gradient de tensiune de 10 V/cm până când colorantul albastru (xilenetanol) trece aproximativ 1,0 cm de găurile din gel. După electroforeză, gelul este transferat în transiluminator, iar locația benzilor ADN este revizuită sub radiația ultravioletă. După separarea electroforetică, tamponul și gelul care conțin bromură de etidiu sunt dezactivate.

2.7 Analizele parazitologice

2.7.1 Diagnosticul de helmintiază și protozoare în fecalele animalelor. Selectarea soluțiilor și procedurii.

Analiza de laborator a materiilor fecale oferă informații ample privind prezența protozoarelor, helminților și a fragmentelor acestora.

Diagnosticarea helmintiazei și a protozoarelor se efectuează în scopuri de cercetare sau profilactice, pentru a stabili amploarea și intensitatea invaziei, precum și pentru diferențierea agenților patogeni. Metodele de cercetare calitative (identificarea compoziției speciilor de helminți paraziți) și cantitative sunt utilizate pentru a evalua intensitatea invaziei (slabă, medie, puternică), precum și eficacitatea dehelmintizării.

Diagnosticările pe durata de viață pe baza studiului datelor epizootice (caracteristicile zonale ale bolii, compoziția speciilor agenților patogeni, rasa și vârsta animalelor, sezonul, sursa de invazie), semnele clinice ale bolii și rezultatele testelor de laborator. Paraziții pot fi detectați în diferite sisteme ale corpului. Materialul biologic pentru cercetări privind prezența de helminți, fragmente, larve și ouă ale acestora, precum și a chistului de protozoare sunt materiile fecale, urina, conținutul duodenal, fierea, sputa, mucusul rectal și perianal, sângele, țesutul muscular. Cel mai adesea obiect de studiu sunt masele fecale, în care pot fi depistați helminți reproductivi, ouă, larve sau chisturi aflate în sistemul tractului gastro-intestinal și respirator, precum și căpușele înghițite de animale. Studiile helmintocoproscopecice sunt împărțite în helmintoscopecice (detectarea helminților maturi sau a fragmentelor acestora), helminto-ovoscopecice (din Lat. Ovum - ou) și helminto-larvoscopecice (din Lat. Larva – larva), în timpul căreia se depistează ouă sau larve. Cei mai mulți helminți și protozoare sunt similare după caracteristicile morfologice, acestea secretă ouă similare (de tip strohalid), oociști și acest lucru complică identificarea. Examinarea fecală poate indica, de asemenea, starea digestivă, cum ar fi fibrele musculare nedigerate, picăturile de grăsime, amidonul și așa mai departe.

Precizia prelevării probelor.

Pentru cercetare, se iau manual 4-10 g de fecale din rect sau de pe podea cu o mănușă de cauciuc. Acestea trebuie să fie proaspete și să se cunoască căruia animal îi aparțin. Fecalele trebuie luate cu degetul mijlociu și arătător din grajdurile de la porci, viței, oi, capre. Fecalele iepurilor (mai multe mingi) se obțin prin apăsarea peretelui abdominal în zona rectului. De la păsări, animale de blană, animale carnivore, prădători sălbatici (în grădini zoologice), fecale se colectează de pe podeaua cuștii (teste de grup). Pentru o analiză individuală, trebuie să existe câteva grame de fecale pentru a asigura identificarea adecvată a eșantionului prelevat de la animal. Fecalele trebuie să fie proaspete (până la 2 ore) și, de asemenea, pot fi refrigerate în pungi de plastic.

Eșantionul trebuie examinat înainte de a efectua aceste metode. Trebuie acordată atenție aspectului vizual, secvenței, culorii și prezenței sângelui sau mucusului, care pot indica infecții parazite specifice.

Flotația.

Metodele de flotație se bazează pe principiul utilizării soluțiilor de flotație în care densitatea este mai mare decât paraziții. Aceste metode sunt relativ ieftine de realizat.

Selectarea soluțiilor și metodelor.

Multe substanțe diferite pot fi folosite pentru a produce soluții de flotație. Cu cât este mai mare gravitatea specifică a soluției de flotație, cu atât se poate detecta o varietate mai mare de ouă de helminți și protozoare chistice. Intervalul lichidelor de flotație variază de la 1,18 la 1,3. Metodele de flotație utilizează în general sărurile de sulfat de zinc, clorura de sodiu saturată, sulfatul de magneziu și altele.

33% soluție de sulfat de zinc ($ZnSO_4$, gravitate specifică 1,18):

1. Dizolvați 330 g de sulfat de zinc cu apă până la un volum de 1000 ml.
2. Verificați gravitatea specifică utilizând areometrul.

Soluție saturată de clorură de sodiu ($NaCl$, gravitate specifică 1.2) sau sulfat de magneziu ($MgSO_4$, gravitatea specifică 1.32):

1. Adăugați sare în apa caldă până se dizolvă și excesul se așează la fund. Pentru a garanta saturația soluției, aceasta ar trebui lăsată peste noapte la temperatura camerei.
2. Verificați gravitatea specifică utilizând areometrul.

Soluția de zahăr (gravitate specifică 1.2 – 1,25)

1. Dizolvați 454 g de zahăr granulat cu 355ml de apă, amestecați.
2. După ce zahărul se dizolvă, adăugați 6 ml de formaldehidă pentru prevenirea proliferării microbilor (fie 30 ml de formalină 10% la volumul apei de 3300 ml)
3. Verificați gravitatea specifică utilizând areometrul.

În principal, metodele de flotație sunt aceleași.

Metoda Fulleborn

Adăugați 5 g de fecale în sticlă și amestecați cu un bețișor din sticlă sau lemn, adăugați o soluție saturată de sare (sulfat de magneziu, hiposulfid de sodiu, sulfat de zinc). Suspensia de fecale se filtrează printr-o sită metalică și se limpezește timp de 40-50 de minute. Ouăle de greutate ușoară plutesc în sus. Câteva picături din stratul de suprafață sunt transferate cu o buclă metalică la un slide și examinate sub microscop.

Test McMaster modificat

1. Pentru rumegătoare, trebuie agitate 4 g de fecale la 56 ml soluție flotantă pentru a obține un volum total de 60 ml. Testul poate fi efectuat, de asemenea, cu 2 g de fecale și 28 ml de soluție flotantă (în cazul unei cantități mici de fecale). Se amestecă bine și se strânge printr-un tifon sau sită. Amestecul nu trebuie să fie foarte saturat.

2. Folosind o pipetă de filtru, transferați materialul în camera de numărare și umpleți fiecare celulă a camerei McMaster. Întreaga cameră ar trebui să fie plină, dar nu doar zona de sub grilă.

3. Așteptați 5 minute și examinați sub microscop. Ouăle și oocistii de diferite tipuri de paraziți trebuie numărați separat. În unele cazuri, ouăle pot fi identificate pe sexe sau specii (de exemplu, *Strongyloides*, *Trichuris* și *Nematodirus*), iar altele trebuie considerate o categorie de paraziți (coccidia, ouă).

Pentru a determina numărul de ouă dintr-un gram de fecale, adăugați numărul din ambele camere și multiplicați cu 200. Cu toate acestea, deoarece în test au fost utilizate 4 grame de fecale, rezultatul trebuie împărțit la 4.

Centrifugarea.

Centrifugarea este mai eficientă decât metodele standard de flotație, indiferent de soluția de fluide flotante:

1. Amestecați 3-5 g (aproximativ 1 linguriță de ceai) de fecale cu o cantitate mică de soluție flotantă pe hârtie sau într-o sticlă din plastic. Materiile fecale de pisică și peletele mici de la rumegătoare pot fi măcinate cu un mojar sau înmuiate în apă până când vor deveni moi. Fecalele trebuie spălate cu apă dacă eșantionul conține o cantitate mare de grăsime sau mucus.

2. Strecurați amestecul de fecale și soluția de flotație printr-un strat dublu de tifon sau sită.

3. Turnați amestecul într-un tub de testare de 15 ml și centrifugați-l timp de 5 minute la 500-650 rpm, scurgeți supernatantul, resuspendați sedimentarea cu o soluție de flotație și repetați de 3 ori.

4. După centrifugare, scoateți tubul din centrifugă și plasați-l într-un coș. Adăugați soluția de flotație la menisc și puneți capacul de sticlă, așteptați 5-10 minute, plasați-l pe un diapozitiv și examinați-l.

Sedimentarea.

Metodele de sedimentare sunt utilizate pentru diagnosticarea helmintiazei, ale cărei agenți cauzali produc ouă cu densitate mare (trematode, acantocefalus și alți helminți și nematozi plați). Acestea sunt metode de flotație care consumă mai multă forță de muncă, din cauza dificultății spălării ouălor de helminți în sedimentul amestecului de testare.

Tehnici de spălare secvențiale. O cantitate mică de fecale (5-10 g) se amestecă într-un pahar cu cantitatea de apă de 10 gradații. Amestecul este filtrat printr-o sită metalică sau tifon și pus deoparte timp de 5 minute. Apoi stratul superior al lichidului se scurge, se adaugă din nou aceeași cantitate de apă și se precipită timp de 5 minute. Se spală de mai multe ori până când stratul de suprafață al lichidului este transparent. După limpezirea stratului superior al lichidului din pahar, acesta se scurge și precipitatul se aplică pe o lamelă pentru microscopie. Puteți adăuga o picătură de 0,1% albastru de metilen, care va face fundalul albastru, dar nu vapăta ouăle fasciol, care vor fi maro-gălbui.

Metoda de sedimentare centrifugală.

1. Amestecați 1 g de fecale cu 10 ml de formalină de 10% sau apă. Turnați amestecul într-un tub de centrifugare din sticlă de 15 ml (cu capac) până la trei sferturi.

2. Adăugați acetat de etil până când tubul este aproape plin.

3. Închideți tubul și agitați de aproximativ 50 de ori.

4. Centrifugați timp de 3-5 minute la 500 rpm.

5. După centrifugare trebuie formate trei straturi: (1) stratul superior va conține acetat de etil, grăsime și resturi; (2) stratul mediu va conține formalină sau apă; (3) stratul inferior de sedimente este format din particule solide fine. Îndepărtați supernatantul, lăsați doar precipitatul.

6. Resuspendați precipitatul în câteva picături de apă sau formalină, puneți una sau două picături pe o lamelă, acoperiți și examinați cu o amplificare de 10×.

Helminto-arvoscopia

Metodele helmintolarvoscopice sunt utilizate pentru detectarea larvelor de helminți paraziți din fecale (dictiocauloză), lapte (strongyloidosis, neascaroză), reumuri oculare (telazioză), piele (oncocerciază). Acestea se diferențiază după dimensiune, structură și formă.

Tehnica lui Bermann este utilizată pentru diagnosticarea dictiocaulozei, protostronilidozei și altor nematode la animale. Această metodă este utilizată pentru studierea materiilor fecale, se folosește un aparat format dintr-o pâlnie, un tub de cauciuc de 10-15 cm conectat la partea superioară a pâlniei și o clemă atașată la partea inferioară a tubului de cauciuc. Proba de fecale (10 g) se înfășoară cu tifon și se pune într-o pâlnie. Încălziți pâlnia în prealabil cu apă caldă (35-38°C). Aparatul cu proba de fecale pentru ovine și caprine se lasă la temperatura camerei timp de 3-5 ore, pentru bovine timp de 12 ore, pentru cai timp de 8-12 ore. În această perioadă, larvele de helminți ies din testul materiilor fecale în apă și cad în tubul de cauciuc până când acesta este închis cu o clemă. Apoi cleva de pe tub este slăbită și lichidul de evacuare este colectat într-un tub de testare și centrifugat timp de 2-3 minute la 1500 rpm. Apoi stratul superior al lichidului este extras și precipitatul este transferat pe o lamelă pentru microscopie. Larvele de helminți sunt mobile și văzute bine în lichid.

Tehnica lui Weid este utilizată pentru diagnosticarea helmintiazei pulmonare ale rumegătoarelor mici. Câteva boabe de fecale de animale sunt puse pe o lamelă sau sticlă de ceas și se adaugă o cantitate mică de apă la 40°C. După 40 de minute se îndepărtează materiile fecale și se efectuează microscopia lichidului rămas pe sticlă. Eficiența metodei nu depășește 70%.

2.7.2 Metode suplimentare de cercetare pentru identificarea invaziilor parazitare specifice

Se folosește un frotiu direct pentru detectarea trofozoitelor protozoale (giardiază, trichomonas, amoebas etc.) sau a altor elemente care nu plutesc bine sau care sunt ușor distorsionate de soluțiile de flotație. Calitatea acestei metode este scăzută din cauza cantității mici de material.

Procedură: 1. Amestecați pe o lamelă o cantitate mică de fecale cu o picătură de soluție salină. 2. Acoperiți cu sticlă și examinați la o amplificare de $10\times$ și $40\times$. 3. Principala caracteristică a recunoașterii trofozoite este circulația. Puteți adăuga o picătură din soluția lui Lugol care colorează structurile interne ale chisturilor. Puteți folosi câteva picături.

2.7.3 Diagnosticarea diferențială a pseudoparaziților

Probele de fecale pot conține „pseudoparaziți” înșelători și „paraziți falși”. Adesea fragmentele apar sub formă de ouă, ovule; acestea includ semințele de polen, firele de plante, cerealele, acarienii, sporii de mucegai și o varietate de resturi de plante și animale inofensive. „Paraziți falși” sunt ouă de helminți sau chisturi de protozoare găsite în materiile fecale și pot aparține altuia din cauza coprofagiei sau prădării. Una dintre cele mai bune modalități de a evita erorile în evaluarea mostrelor fecale este evaluarea diferitor paraziți care infectează în mod obișnuit animalele.

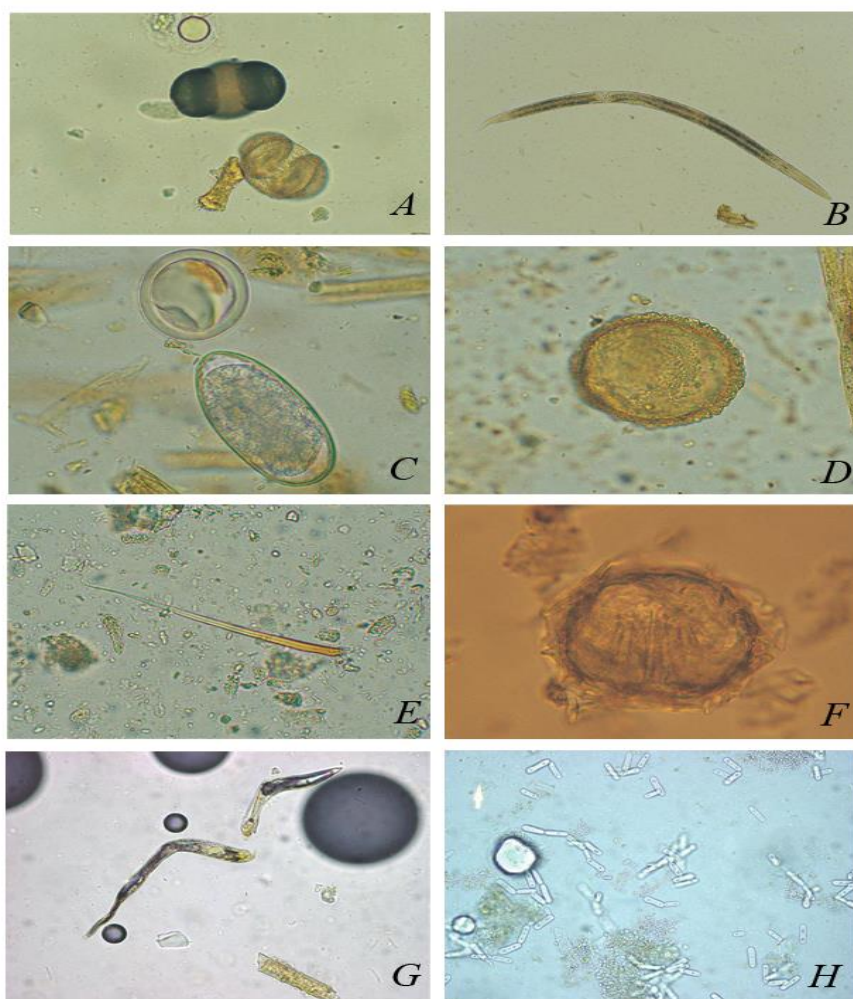


Fig. 1 Exemple de pseudoparaziți

(A) Polenul de pin este un pseudoparazit comun găsit în materiile fecale ale multor animale ($400\times$). (B) Nematode adulte libere găsite în materiile fecale colectate de la sol. (C) Ouă din materiile fecale ale ovinelor și pseudoparazit (indicat prin săgeată). Absența unei structuri interne clare și a rupturilor în stratul exterior este caracteristă pentru recunoașterea pseudoparaziților. (D) Granule de polen ($400\times$). (E) Insecția părului de la fecalele de păsări insectivore. (F) Artefactul în fecalele rumeșătoarelor are structuri asemănătoare cârlionilor unui embrion plat de helminț, dar nu există un embrion distinct, iar stratul exterior este slab definit ($40\times$). (G) Fire de păr vegetale și alte materiale fibroase care pot semăna cu larve nematode. Acestea pot fi prezente în diferite forme și culori, dar pot fi de obicei diferențiate ușor de nematode, deoarece nu au o structură internă clară, cum ar fi tractul digestiv. (H) *Saccharomycopsis guttulatus* este o drojdie nepatogenă în fecalele de iepure și este observată uneori la câini ($400\times$). (Preluat de la Zajac A. Parazitologie clinică veterinară/Anne M. Zajac, Gary A. Conboy. – ediția 8— Asociația Americană a Parazitologilor Veterinari.

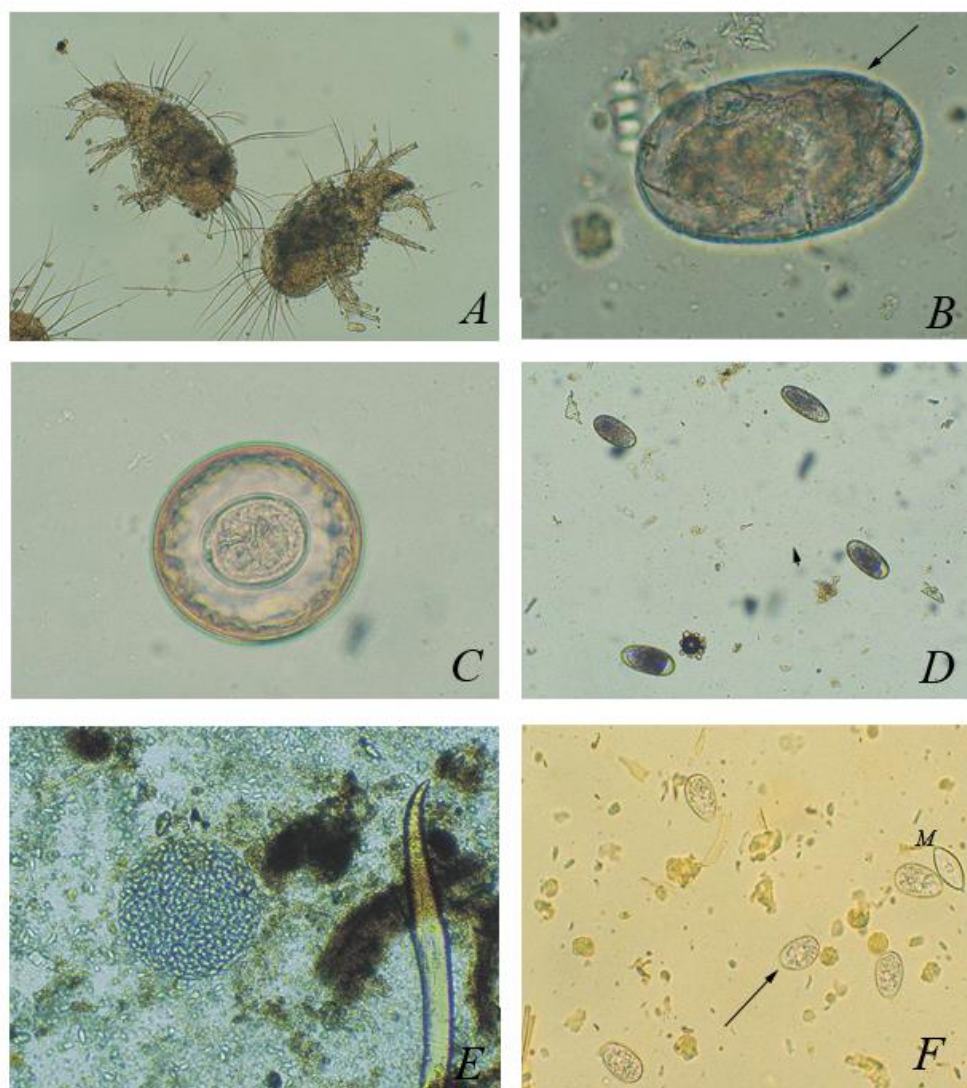


Fig. 2. Exemple de pseudoparaziți

(A) Acarieni liberi care contaminatează hrana animalelor. Spre deosebire de multe căpușe parazite, speciile care trăiesc liber nu au structuri specializate pe picioare (ventuze, creste etc.). (B) Ouăle de la acarienii care trăiesc liber. Acestea sunt de obicei foarte mari (> 100 microni). Picioarele dezvoltate ale căpușei din interiorul ouălor (săgeată). (C) Paraziți falși: Ou de tenia se găsește în proba de fecale a vițelului. Deși configurația cârlionilor din interiorul acestui ou îl identifică clar ca pe un bețișor, cel mai probabil este un rozător sau un ou de pasăre. (D) Paraziți falși răspândiți în mostrele prelevate de la câini, cum ar fi coprofagele. Ouăle rumegătoarelor și iepurilor arată ca cele ale câinilor, dar mai mari. (E) Paraziți falși: chist mare de *Monocystis*, cel mai simplu parazit al rămelor găsite în materiile fecale de șarpe (100×). (F) Oociștii de *Eimeria* spp. (săgeată) sunt un parazit tipic fals în fecalele câinilor. Această fotografie conține, de asemenea, un oocist separat de *Monocystis* (M) eliberat dintr-un chist mare (400×). (Preluat de la Zajac A. Parazitologie clinică veterinară/Anne m Zajac, Gary A. Conboy. - ediția 8. — Asociația Americană a Parazitologilor Veterinari: Wiley-Blackwell, 2012. - 19-23 p.)

2.8 Igiena și securitatea în laboratorul biologic

2.8.1 Principiile biosiguranței în laboratoare

Biosecuritatea este aplicarea practică a principiilor și metodelor de asigurare a biosiguranței care contribuie la protejarea angajaților de efectul lucrului în laborator.

Biosiguranța oferă măsuri de securitate pentru a reduce riscul pierderii, furtului sau utilizării agenților microbiologici sau toxinelor pentru sabotaj, ceea ce ar putea duce la utilizarea necorespunzătoare sau criminală a unui anumit agent ca armă biologică, cum ar fi bioterorismul. Biosiguranța de laborator descrie principiile izolării, tehnologiile și metodele utilizate în pentru a preveni expunerea neintenționată a agenților patogeni și toxinelor sau al răspândirii accidentale a acestora.

Baza practicilor de biosecuritate este evaluarea și gestionarea riscurilor biologice.

Este posibil să se obțină informații despre microorganisme și cultura stoc utilizată, locația fizică a acestora; personalul care are nevoie de acces la un agent patogen sau toxină prin evaluarea riscului biologic care este realizat în cadrul programului de biosecuritate.

Factori ce urmează a fi luați în considerare pentru evaluarea riscului biologic:

1. Patogenitatea agentului și doza infecțioasă.
2. Potențiale consecințe ale infecției.
3. Modalități naturale de transmitere a infecției.
4. Alte forme de contaminare cauzate de manipulări în condiții de laborator (parenterale, aeropurtate, cu mâncarea).
5. Stabilitatea agentului în mediu.
6. Concentrația agentului și cantitatea de materiale care ar trebui utilizate în cadrul lucrului.
7. Existența corespunzătoare a agentului „gazdă” (om sau animal).
8. Informații disponibile din testele pe animale, rapoarte de laborator privind infecțiile sau rapoartele clinice
9. Activitățile de laborator planificate (ultrasunete, centrifugare etc.).
10. Orice manipulare genetică cu corpul care poate extinde gama de agenți „gazdă” sau îi poate schimba sensibilitatea la regimuri de tratament cunoscute și eficiente.
11. Disponibilitatea intervențiilor preventive și terapeutice eficiente la fața locului.

Pe baza informațiilor dezvăluite în timpul evaluării riscurilor, se determină nivelul necesar de biosiguranță al activității planificate, se selectează echipamentul individual de protecție adecvat, se elaborează un curs standard de acțiune al cărui scop este asigurarea celui mai sigur mod de realizare a studiilor de laborator.

Managementul riscurilor biologice include:

reducerea riscului de impact nedorit al agenților patogeni și toxinelor sau al scurgerii accidentale a acestora (biosecuritate) și reducerea riscului de acces neautorizat, pierdere, furt, utilizare neautorizată, sabotaj sau scurgere deliberată a materialelor biologice la niveluri sigure și acceptabile (biosecuritate de laborator);

- asigurarea garanțiilor interne și externe (în cadrul instituției, districtului, guvernului, comunității mondiale etc.) cu privire la adoptarea și punerea efectivă în aplicare a măsurilor adecvate;
- furnizarea bazelor pentru sporirea continuă a gradului de conștientizare a biosiguranței și biosecurității de laborator, cu respectarea codului etic de conduită și a formării personalului în cadrul întreprinderii.

Unul dintre obiectivele gestionării riscurilor biologice este dezvoltarea unei culturi cuprinzătoare a biosecurității și biosiguranței de laborator, care să permită biosecurității și biosiguranței să devină o parte a activității zilnice de laborator, îmbunătățind astfel nivelul general al condițiilor de muncă și nivelul preconizat de gestionare a laboratorului.

2.8.2 Cerințe igienice pentru încăperile de laborator. Norme de siguranță pentru utilizarea echipamentelor

Pentru desfășurarea în condiții de siguranță a procedurilor de laborator în interiorul încăperilor, este necesar să se asigure: spațiu suficient; pereții, plafoanele trebuie să fie netede, ușor de spălat, impermeabile la lichide, rezistente la reactivi și dezinfectanți, podeaua nu trebuie să fie alunecoasă; suprafața scaunelor, rafturile trebuie să fie impermeabile și rezistente la dezinfectanți, acizi, alcali, solvenți organici și să fie suficient de rezistente la căldură; iluminare suficientă; mobilierul de laborator trebuie să fie tare și să aibă acces liber pentru curățenie; echipamentele de laborator și dispozitivele trebuie să fie amplasate pe o

suprafață suficientă; o cameră separată pentru manipularea în condiții de siguranță și depozitarea solvenților, materialului radioactiv și gazelor reduse; camere separate pentru îmbrăcăminte exterioară, masă, camere de odihnă în afara zonei de laborator; o chiuvetă cu apă curgătoare trebuie să fie plasată în fiecare cameră de laborator, preferabil mai aproape de ieșire; ușile trebuie să aibă geamuri, să se respecte regulile de securitate antiincendiu; autoclava și alte mijloace de decontaminare trebuie să fie situate în apropierea laboratorului.

Sistemele de securitate trebuie să includă siguranța antiincendiu și electrică, un duș pentru tratamentul de urgență și spălarea ochilor. Trebuie să fie disponibile unități sau zone echipate corespunzător pentru acordarea primului ajutor.

Pentru proiectarea spațiilor noi, este necesar să se ia în considerare:

posibilitatea de a crea un sistem de ventilație mecanică, care să asigure aer proaspăt și derivarea aerului irosit fără recircularea acestuia. Dacă nu există un astfel de sistem, este necesar să se ia măsuri pentru instalarea geamurilor bine deschise și echiparea acestora cu plase de țințari; sistem de alimentare reglementată cu apă de înaltă calitate; sistem de furnizare a energiei electrice, sistem de furnizare a gazelor naturale, sistem de securitate antiincendiu.

Pe lângă procedurile și practicile fiabile, utilizarea echipamentelor care îndeplinesc cerințele de siguranță va reduce riscurile legate de biosecuritate. La alegerea echipamentului de laborator sigur, **trebuie respectate următoarele principii:**

1. Acesta trebuie să fie conceput pentru a restricționa sau a împiedica contactul lucrătorului cu agentul infecțios.
2. Acesta trebuie să fie realizat din materiale etanșe la lichid, rezistente la coroziune și să îndeplinească cerințele rezistenței mecanice.
3. Acesta nu ar trebui să aibă margini ascuțite, rugozități și părți nefixate.
4. Acesta trebuie proiectat și instalat astfel încât să asigure manipularea și întreținerea ușoară, curățarea, decontaminarea și controlul în scopuri de certificare; dacă este posibil, utilizarea ustensilelor de sticlă și a altor materiale fragile trebuie exclusă.

2.8.3 Bazele transportării și modalitățile de lucru cu biomaterialul

Transportarea materialelor biologice infecțioase și potențial periculoase este strict reglementată de normele naționale și internaționale. Aceste dispoziții prevăd utilizarea corectă a materialului de ambalare, precum și alte cerințe privind operațiunile de manipulare. Normele internaționale standard nu sunt menite să înlocuiască nici o cerință locală sau națională. Cu toate acestea, în cazurile în care nu este nici o cerință națională, ar trebui utilizate normele internaționale standard.

Conform normelor sanitare de stat și normelor și standardelor de igienă „Reguli privind amplasarea și siguranța muncii în laboratoarele (departamentele) cu profil microbiologic (DSP 9.9.5. -080-02)”, orice material care intră în laborator pentru studiu este considerat ca fiind potențial periculos.

Siguranța transporturilor ar trebui să asigure protecția materialelor biologice în timp ce acestea circulă în afara zonelor de acces controlate în care sunt depozitate înainte de sosirea la destinație. Măsurile de siguranță a transporturilor se aplică materialelor biologice dintr-o instituție și între instituții. Siguranța materialelor de transport în cadrul unei instituții ar trebui asigurată prin documentația, responsabilitatea și controlul necesar asupra circulației materialelor între zonele de acces restricționat în cadrul instalației, precum și prin livrarea internă asociată proceselor de transport și de primire a mărfurilor.

Măsurile de siguranță a transporturilor între instituții ar trebui să asigure furnizarea licențelor adecvate și comunicarea între obiecte înainte, în timpul și după transport, care pot include și serviciile transportatorilor comerciali. Recomandările ONU cu privire la Reglementările Model privind Transportul de Mărfuri Periculoase stau la baza elaborării reglementărilor naționale și internaționale în domeniul transporturilor și includ dispoziții privind siguranța transportului de mărfuri periculoase prin diferite mijloace de transport, inclusiv substanțe infecțioase (managementul Biorisk: [Ghidul biosecurității laboratorului]. - Geneva: OMS, 2006, p. 41).

Personalul trebuie să beneficieze de instruirea necesară și să fie conștient de procedurile de prevenire a răspândirii materialelor periculoase, ambalării adecvate, marcării, înregistrării și transportului materialelor biologice.

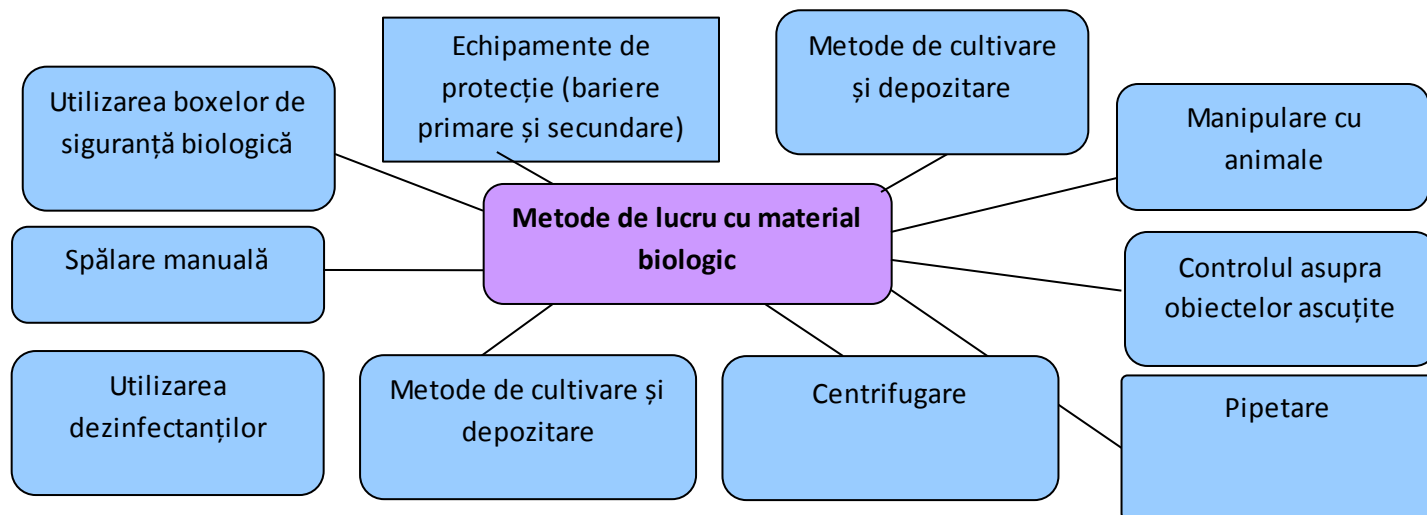
Au fost introduse norme internaționale și naționale privind transportul substanțelor infecțioase pentru a preveni scurgerea acestor materiale în timpul transportării și pentru a proteja persoanele, angajații, bunurile și mediul împotriva efectelor nocive care pot fi cauzate de aceste substanțe.

Una dintre garanțiile importante este respectarea obligatorie a normelor speciale privind ambalarea și marcarea materialelor biologice periculoase. Ambalajele de protecție trebuie să reziste la o utilizare dură și la

alte efecte care apar în timpul transportării, inclusiv la modificările presiunii și temperaturii atmosferice, precum și la vibrații și umiditate.

Printre mijloacele de avertizare pentru materialele periculoase se numără: documentele de transport, etichetarea, marcarea ambalajelor exterioare și alte informații necesare pentru a permite muncitorilor din domeniul transporturilor și membrilor echipei de intervenție rapidă să identifice corect materialul și să reacționeze rapid la orice situație de urgență. În plus, expeditorii și transportatorii ar trebui să fie familiarizați cu aceste norme, astfel încât să poată pregăti în mod corespunzător transporturile, precum și să identifice și să reacționeze la riscurile asociate acestor materiale.

Cel mai important element în prevenirea infecțiilor este implementarea strictă a practicilor și tehnicilor microbiologice standard. Persoanele care lucrează cu agenți infecțioși sau materiale potențial infecțioase ar trebui instruite, familiarizate cu un potențial prejudiciu și să fie extrem de profesioniste din punct de vedere al tehnicilor practice și tehnicilor necesare pentru manipularea în condiții de siguranță a acestor materiale. Managerii sau persoanele responsabile de laborator supraveghează furnizarea sau organizarea formării profesionale necesare a personalului. Fiecare laborator trebuie să elaboreze sau să aprobe un manual privind siguranța biologică. Este necesar să se indice riscurile cu care s-ar putea confrunta și să se ofere practici și proceduri elaborate pentru a reduce sau elimina efectele acestor factori.



Noile metode și tehnici metodice ar trebui luate în considerare de comisia cu privire la respectarea cerințelor de siguranță biologică ale instituției și acestea vor fi aprobate de către șeful acesteia înainte de utilizare.

2.8.4 Dezinfectarea și sterilizarea

Un aspect important și esențial al îndeplinirii normativelor și standardelor de biosiguranță este alegerea corectă și conformitatea cu modalitățile de decontaminare a materialelor și deșeurilor provenite de la laboratoare. Pentru a implementa programul de siguranță biologică în laborator, este important să înțelegem principiile decontaminării, curățării, sterilizării și dezinfectării.

Dezinfectarea este procesul de reducere a numărului de microorganisme (spori non-bacterieni) (ISO 15190: 2003).

Decontaminarea (decontaminarea) este orice proces de îndepărtare și/sau distrugere a microorganismelor sau de reducere a acestora la un nivel inofensiv (ISO 15190:2003). Acest termen este utilizat, de asemenea, pentru îndepărtarea sau neutralizarea materialelor chimice și radioactive periculoase.

Sterilizarea este un proces în care toate tipurile de microorganisme și spori sunt distruse și/sau îndepărtate.

Dezinfectantul este o substanță chimică sau un amestec de substanțe chimice utilizate pentru uciderea microorganismelor, dar nu întotdeauna a sporilor. Ca regulă, dezinfectanții se aplică pe suprafețele sau obiectele staționare.

Germicid chimic este o substanță chimică sau un amestec de astfel de substanțe utilizat pentru uciderea microorganismelor.

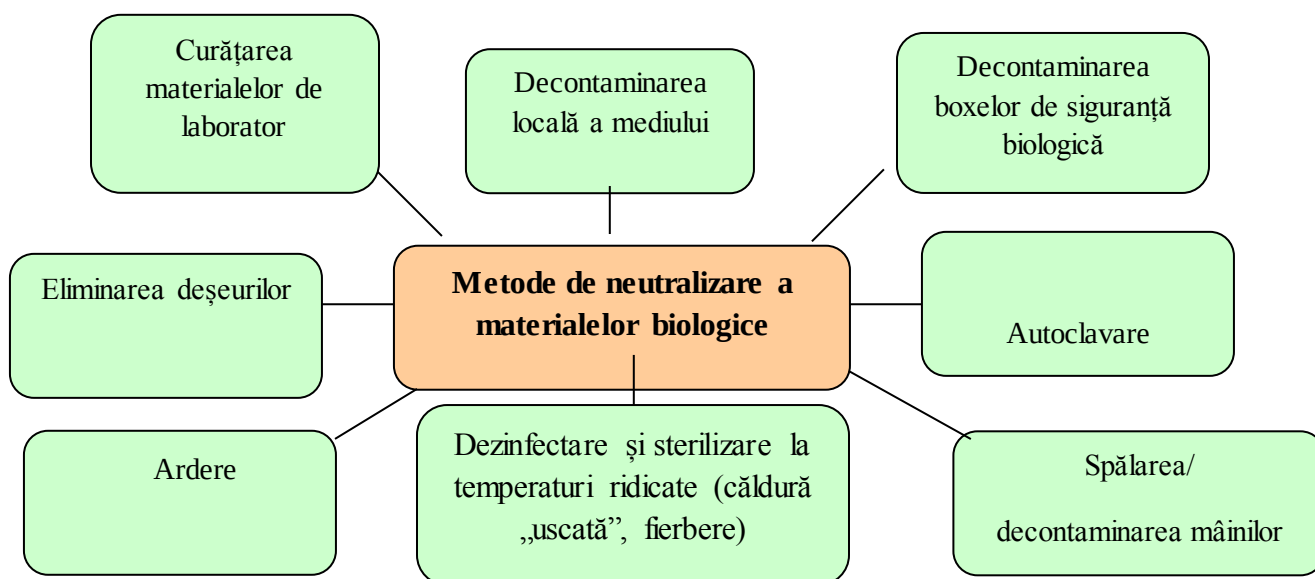
Dezinfectanții trebuie să fie eficienți și siguri, menționați în Lista Medicamentelor Ucrainene, să aibă instrucțiuni (orientări) aprobate de Medicul Sanitar Principal din Ucraina sau de adjunctul său și să dispună de un certificat de aplicabilitate în Ucraina.

Alegerea metodelor de dezinfectie chimică utilizate în zonă ar trebui să se bazeze pe următoarele criterii: remediul trebuie să fie eficient pentru agenții patogeni cu care se realizează activitatea (eficacitatea agentului în cauză trebuie verificată direct la locul de muncă); acesta trebuie să se afle permanent în zona de lucru, să fie stabil pentru depozitare și la influența factorilor externi; comod în aplicare. Un aspect esențial în toate țările este înregistrarea obligatorie de stat a dezinfectanților și acreditarea producătorului lor. Factorii care influențează eficacitatea dezinfectării includ impactul asupra mediului, timpul de contact, concentrația și stabilitatea soluțiilor de lucru, tipul suprafețelor decontaminante și prezența compușilor organici în dezinfectant.

Laboratorul biologic trebuie dezinfectat cu foarte multă atenție. Principala sarcină a dezinfectării este reducerea nivelului contaminării microbiologice pentru a elimina posibilitatea contaminării. Rezistența anumitor microorganisme la decontaminare este prezentată în **Tabelul 1** (în ordine descrescătoare).

Spori de bacterii <i>Bacillus subtilis, Clostridium sporogenes</i>
Micobacterii <i>Mycobacterium tuberculosis var. bovis, Micobacterii non-tuberculoase</i>
Virus neîncapsulat <i>Poliovirus, virusul Coxsackie, Rinovirus</i>
Ciuperci <i>Trichophyton spp., Cryptococcus spp., Candida spp.</i>
Bacterii vegetative <i>Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella choleraesuis, Enterococci</i>
Virus încapsulat <i>Virusul herpes simplex, Citomegalovirus, Virusul sincțial respirator, HBV, HCV, HIV, virusul Hanta, virusul Ebola</i>

Tabelul 1 – Rezistența microorganismelor la dezinfectanți în ordine descrescătoare



Laboratoarele BSL-1-4 utilizează metode chimice și termice pentru decontaminare, precum și metode bazate pe combinațiile acestora. În laboratoarele BSL-2-4, toate deșeurile sunt decontaminate, în laboratoarele BSL-1 doar derivații modificați genetic sunt decontaminați. BSL-1-2 utilizează decontaminarea chimică și termică periodică, iar laboratoarele BSL-3-4 utilizează în principal decontaminarea termică (periodic și permanent).

2.8.5 Securitatea chimică, antiincendiu și electrică. Condiții de igienă pentru nivelurile de iluminare, alimentare cu apă, ventilație, alimentare cu gaz, zgomot și vibrație

Încălcarea sistemului de izolare a microorganismelor patogene poate duce la stări de urgență precum accidente de incendiu, chimice, electrice sau de radiație. Din acest motiv, laboratorul biologic trebuie să mențină un nivel ridicat de siguranță în aceste zone. Elaborarea regulilor și controlul asupra respectării acestora se află sub supravegherea autorităților naționale sau locale, la care laboratorul ar trebui să apeleze pentru asistență.

Laboratoarele și camerele pentru animale devin uneori subiect de acte de vandalism. Cu excepția acestor cazuri, este necesar să se asigure o protecție fiabilă și siguranța antiincendiu. Este necesar să se verifice în mod regulat toate instalațiile și echipamentele electrice, inclusiv sistemele de împănare. Dispozitivul de întrerupere automată a circuitelor cu defect electric trebuie instalat în circuitul electric. Este necesar să existe o iluminare de urgență cu indicarea ieșirii de urgență, să existe un generator de rezervă pentru alimentarea echipamentelor de bază, cum ar fi incubatoarele, frigiderul etc., precum și pentru ventilarea boxelor cu animale.

Toate camerele de laborator trebuie să aibă iluminare naturală și artificială care să corespundă cerințelor. În anumite camere poate lipsi lumina naturală (termică, boxă pentru studii de sterilitate, fotolaborator etc.). În fiecare cameră a laboratorului trebuie să existe un comutator general. Lămpile și accesoriile trebuie să fie de tip închis și accesibile pentru prelucrarea umedă.

Sistemul de alimentare cu apă trebuie echipat cu dispozitive de închidere care să împiedice contracurentul. Colectoarele de vid trebuie protejate cu separatoare de dezinfectant lichid și filtre HEPA sau dispozitive similare. Pompele de vid alternative ar trebui, de asemenea, protejate cu separatoare și filtre adecvate.

În laboratoare, este necesar să se asigure echipamente de aflux autonom și ventilație de evacuare cu instalarea filtrelor pentru purificarea fină a aerului emis din zona de pericol (sau a echipamentului acestor spații, boxe de siguranță biologică). Este necesar să existe un sistem de furnizare a gazelor fiabil și adecvat. Sistemul trebuie să aibă o întreținere bună. În unitățile de producție, nivelurile de zgomot și vibrație trebuie să îndeplinească cerințele actuale.

2.8.6 Organizarea lucrului în condiții de siguranță și formarea personalului

Fiecare laborator ar trebui să furnizeze o politică de securitate cuprinzătoare, să dezvolte un ghid de securitate și programe auxiliare. Directorul (șeful) institutului sau al laboratorului își asumă responsabilitatea pentru acest lucru. Acesta poate impune anumite responsabilități personalului însărcinat cu siguranța biologică sau cu alte tipuri de personal. Toți șefii de departamente și personal sunt, de asemenea, responsabili pentru siguranța muncii în laborator. Fiecare angajat este responsabil pentru propria siguranță și securitatea colegilor săi. Angajații ar trebui să își facă lucrul într-un mod sigur și să informeze conducerea cu privire la orice acțiuni, condiții sau incidente periculoase. Activitatea sigură și eficientă a laboratorului depinde în mare măsură de personalul auxiliar, astfel că este necesar ca acest personal să beneficieze de o pregătire adecvată în materie de siguranță.

Șefii de laborator care sunt responsabili pentru siguranța biologică ar trebui să elaboreze un program de formare în domeniul siguranței, astfel încât laboratorul și personalul auxiliar să fie conștienți în permanență de metodele de muncă sigure. Eficiența formării în domeniul siguranței și sănătății, inclusiv în cel al siguranței biologice, depinde de responsabilitățile administrației, de factorii motivaționali, de scopurile și obiectivele organizației, de educația inițială adecvată pentru noii angajați, de mijloacele adecvate de comunicare. Un program eficient de formare a personalului ar trebui să conțină următoarele elemente (figura 1).

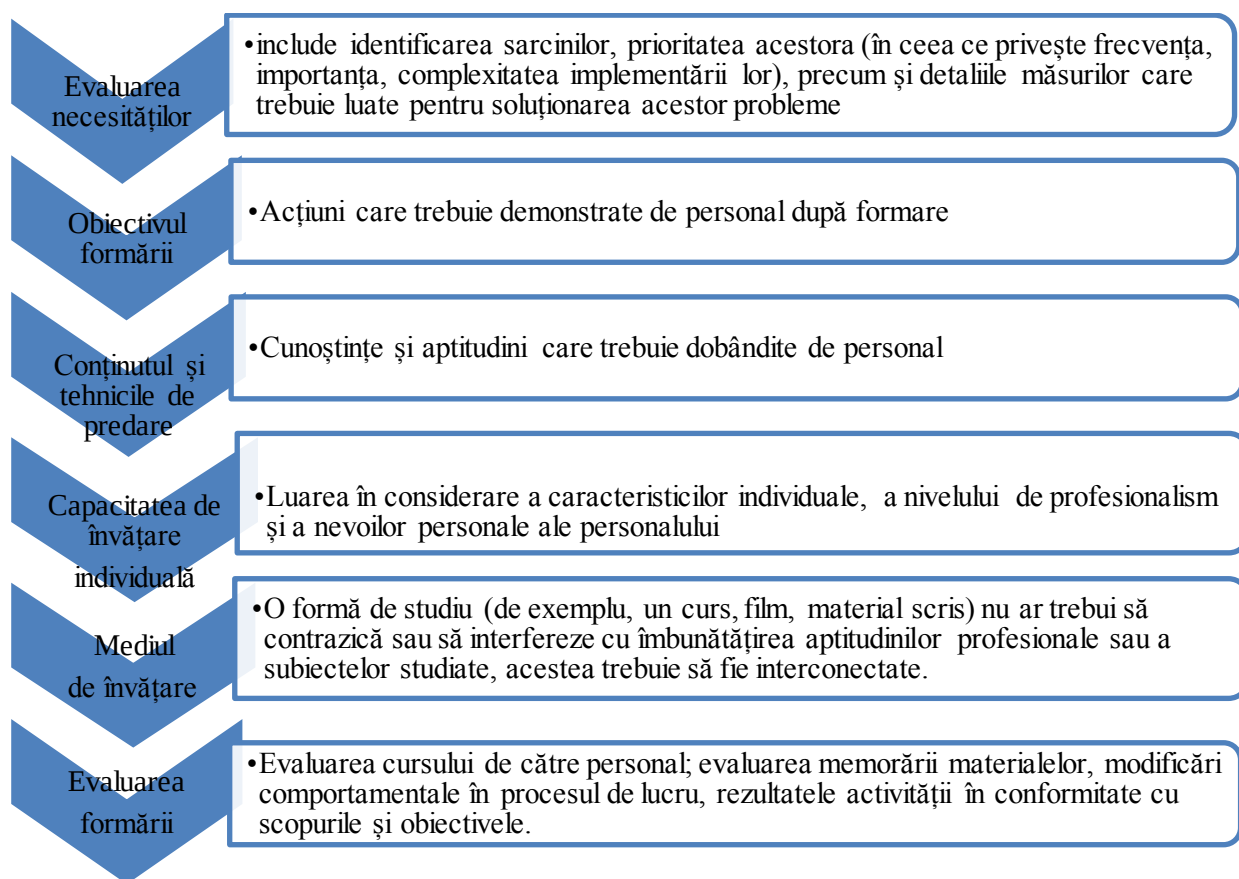


Fig. 1 – Criterii pentru programul de formare a personalului

Laboratorul ar trebui să dispună de proceduri standard de operare (PSO) și să păstreze evidența pentru:

- a) definirea cerințelor privind competența personalului;
- b) recrutarea;
- c) formarea personalului;
- d) controlul personalului;
- e) autoritățile de personal;
- f) monitorizarea competențelor personalului.

2.8.7 Evaluarea riscurilor într-un laborator biologic și un algoritm pentru gestionarea acestora

Lucrătorii pot fi expuși factorilor de producție periculoși și dăunători atunci când lucrează în laboratoare cu profil microbiologic. (Fig. 2).

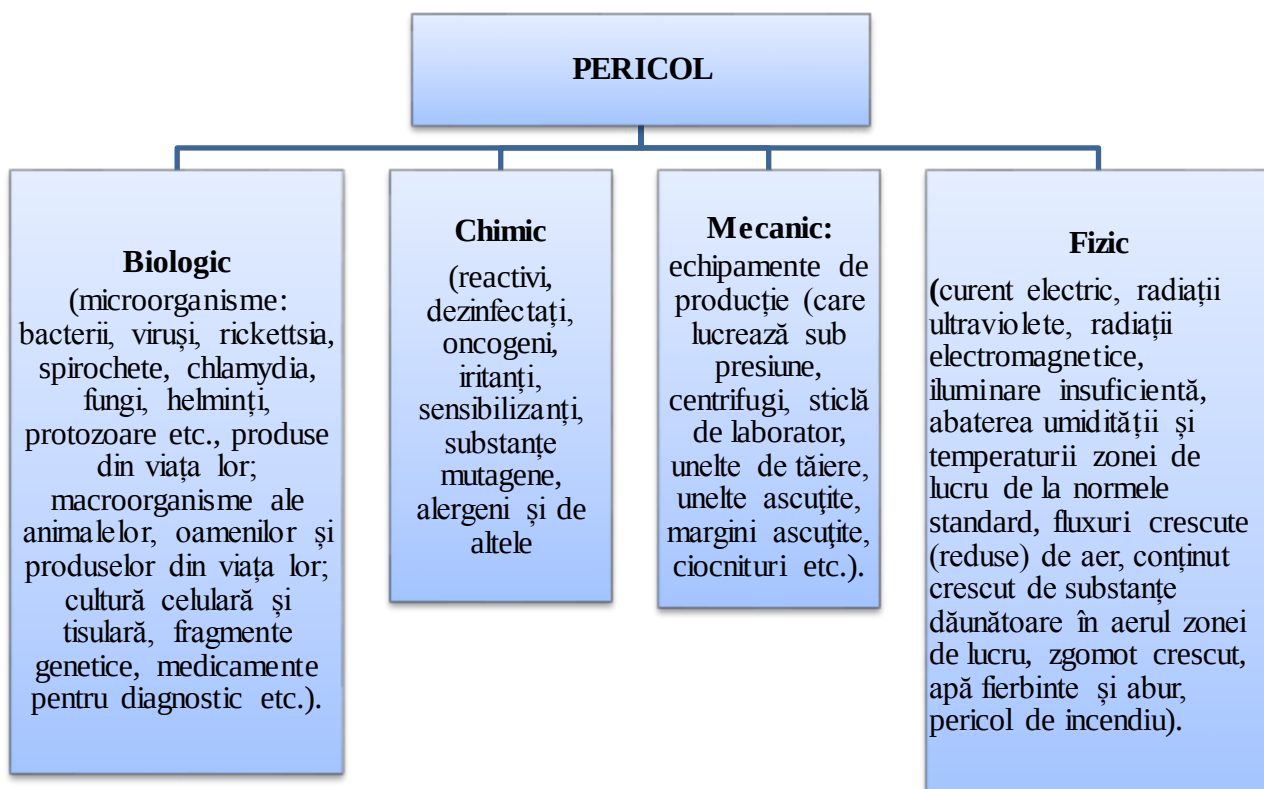


Figura 2 Clasificarea pericolelor în laborator

Pentru a evalua riscurile care pot apărea într-un laborator din cauza efectelor factorilor periculoși, este necesar să se efectueze un set de proceduri (Fig. 3) și să se dezvolte măsuri eficiente de eliminare sau reducere la minim a riscurilor (Fig. 4).

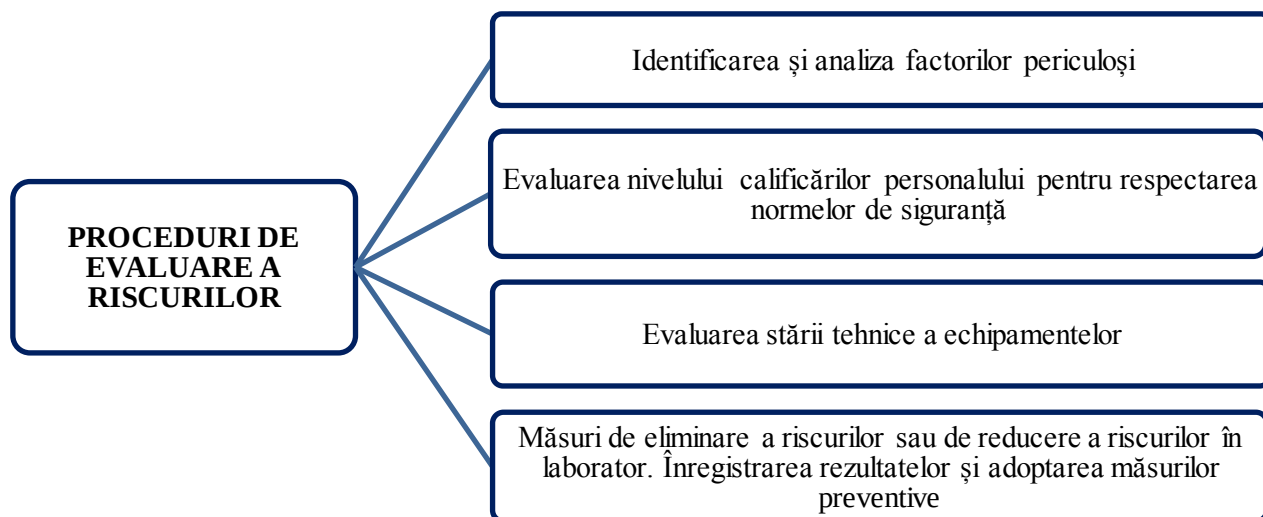


Figura 3 Proceduri de evaluare a riscurilor

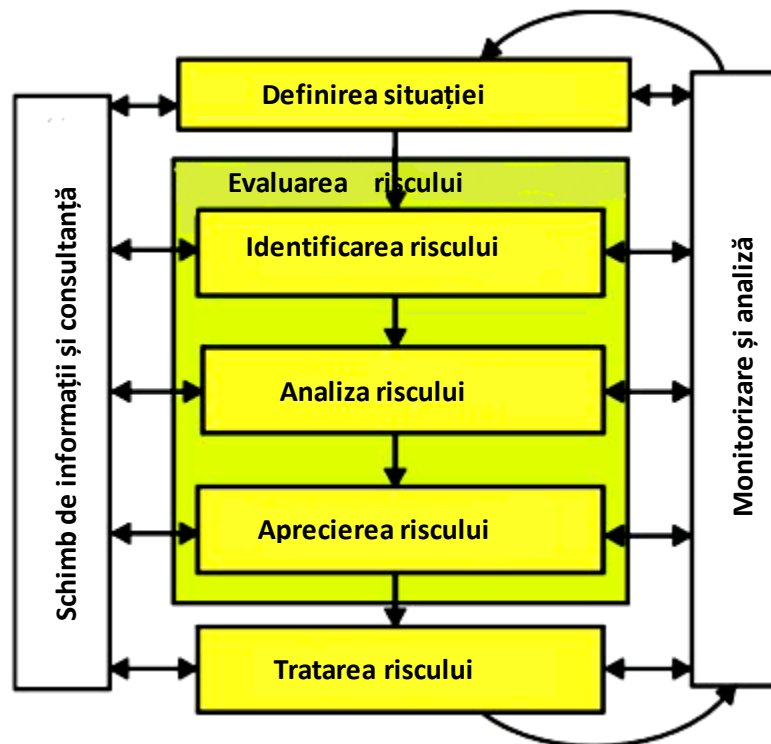


Figura 4 Algoritmul de gestionare a riscurilor

2.8.8 Proceduri de eliminare a consecințelor accidentelor și urgențelor în laboratoare

Răniții (personal sau angajații prezenți) sunt obligați să notifice imediat șeful laboratorului în cazul unor accidente și urgențe asociate infecțiilor, otrăvirii, leziunilor, arsurilor. În cazul în care accidentul survine în timpul turnării și/sau vărsării materialelor infecțioase, toate persoanele aflate în cameră încetează imediat lucrul, își țin respirația, ies din încăperea în pre-boxă, închid ușa, șterg mâinile cu dezinfectant sau alcool etilic; dacă fața nu a fost protejată, aceasta trebuie tratată cu etanol (70%); îmbrăcămintea de protecție trebuie umezită puternic cu dezinfectant, începând cu fularul sau casca, se scoate, se scufundă în dezinfectant sau se pune într-o boxă de autoclavare. După aceasta, părțile deschise ale corpului sunt șterse cu etanol (70%). O persoană se îmbracă în haine de schimb și își prelucurează membranele mucoase ale ochilor, nasului și gurii. Gura și gâtul se clătesc cu alcool etilic (70%), iar în nas se toarnă picături de soluție de protargol (1%). Atunci când o toxină botulinică acoperă zonele deschise ale pielii, aceasta trebuie spălată cu multă apă cu săpun (apa de spălare este autoclavată).

În cazul în care accidentul s-a petrecut fără turnarea și/sau vărsarea materialului biologic, tamponul cu dezinfectant trebuie pus în locul contaminării cu material biologic, șeful sau persoana care îl înlocuiește trebuie avertizat, iar dezinfectarea locului accidentului trebuie să continue. După aceasta, lucrătorul părăsește încăperea în care a avut loc accidentul, îndepărtează și scufundă îmbrăcămintea de protecție în dezinfectant. Zonele deschise ale pielii se prelucurează cu dezinfectant sau alcool etilic (70%). În cazul în care accidentul a avut loc într-o boxă de securitate adecvată, lucrătorul își oprește activitatea, stinge lampa cu alcool, deconectează echipamentul (centrifugele etc. fără a le deschide). Șervețele bine umezite cu dezinfectant sunt puse în locul accidentului. Lămpile bactericide și alarma de urgență sunt aprinse timp de 30 de minute și dezinfectează boxa de siguranță. După 2 ore de la dezinfecție, activitatea în boxa de siguranță poate fi continuată. Ventilația prin tragere în timpul unui accident și dezinfecția trebuie să rămână activate.

Dacă accidentul implică o traumă sau o altă perturbare a integrității pielii, lucrul este oprit, mâinile sunt tratate cu dezinfectant, mânușile se scot și pe rănilor de sânge timp de 4-5 minute se pun extracte din dezinfectant, comprimate dintr-un dezinfectant sau etanol. Este necesar să se documenteze situația care a avut loc. Laboratorul ar trebui să indice posibilul agent infecțios, mecanismele și modalitățile de expunere (prin piele, stropi pe membrana mucoasă sau piele, aerosol etc.), ora și locul accidentului, echipamentele personale de protecție utilizate la momentul accidentului, natura asistenței acordate persoanei rănite (de exemplu, caracterul și durata spălării și alte mijloace, timpul după prelucrare).

În laboratorul biologic trebuie să se întocmească următoarele protocoale:

1. Protocolul pentru turnarea și/sau pulverizarea unei substanțe cu pericol biologic în interiorul dulapului de biosiguranță.
2. Protocolul pentru cazul dispersiei unei substanțe cu pericol biologic în afara dulapului de biosiguranță.
3. Protocolul pentru cazul dulapului de biosiguranță perturbat.
4. Protocolul pentru cazul deteriorării sau contaminării biologice a centrifugei.
5. Protocolul privind primul ajutor

După eliminarea consecințelor accidentelor și urgențelor, activitatea laboratorului este restabilită cu permisiunea șefului de laborator.

Baza de reglementare și resursele pedagogice:

<https://www.who.int/in-vitro-diagnostic/biosafety-guidelines/en/>
https://fssuir.sumdu.edu.ua/bitstream/123456789/46037/1/Holubnychy_biobezpeka.pdf
<https://www.twirpx.com/file/453879>

https://dnaop.com/html/3108/doc-ДЦП_9.9.5-080-02

<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

<https://www.cap-acp.org/Laboratory-Biosafety-Manual.php>

<https://www.who.int/iris/handle/10665/69390>

<https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>

zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0213-19

<https://zakon.rada.gov.ua/go/2694-12>

<https://законодавство.com/...nakaz/nakaz-vid-23072002-280>

<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

<http://www.who.int/csr/>

<https://www.iso.org/standard>

ISO 31000 Principiile și orientările de gestionare a riscurilor

IEC/ISO 31010 (en) Gestionarea riscurilor – Tehnicile de evaluare a riscurilor

Ghidul ISO 73 Gestionarea riscurilor – Vocabular

Transportul substanțelor infecțioase. Geneva, Organizația Mondială a Sănătății, 2004, (http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_9/en/).

Organizația Mondială a Sănătății. Manualul de bioprotecție în laborator. Ediția a treia. Geneva, Organizația Mondială a Sănătății 2004/(http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

Recomandări privind Transportul de Mărfuri Periculoase, Regulamente Model. A paisprezecea ediție revizuită. Națiunile Unite, New York și Geneva, 2005 (http://www.unece.org/trans/danger/publi/unrec/rev14/14files_e.html).

13. Regulamentul sanitar internațional. Rezoluția Adunării Mondiale a Sănătății, WHA58.3, mai 2005 (http://www.who.int/gb/e/e_wha58.html#Rezoluții).

Consultarea tehnică din partea FAO privind gestionarea riscurilor biologice în alimentație și agricultură, Bangkok, Thailand, 13-17 ianuarie 2003 (http://www.fao.org/ag/agn/food/meetings/biosecurity_en.stm).

Gestionarea bioriscurilor: [Ghidul privind biosecuritatea laboratorului]. – Geneva: OMS, 2006. – 41 p.

ISO 15190: Laboratoare medicale 2003 – Cerințe pentru securitate (ISO 15190:2003, Медицинские лаборатории – Требования безопасности)

Стандарты стосовно менеджменту системи ISO 9001, 17025, GLP, GMP;

Manualul privind biosecuritatea de laborator, Presa CRC, 2007

Biosiguranța CDC/NIH în laboratoarele microbiologice și biomedicale, ediția 5, 2007

Orientările canadiene privind biosiguranța în laborator, ediția 3, 2004

Standardul internațional pentru managementul bioriscului CWA 15798:2008

www.cen.ue/CENORM/sectors/technicalcommittees/workshops/ws31/aps

2.9 Gestionarea deșeurilor

2.9.1 Tipuri de deșeuri în practicile de laborator

Deșeurile sunt tot ceea ce de aveți nevoie să scăpați. Este necesar să se creeze un sistem de identificare și să se identifice categoriile de materiale contaminate și containerele relevante. Este necesar să se respecte normele și reglementările naționale și internaționale. Categoriile pot fi:

1. Deșeuri necontaminate (neinfecțioase) care pot fi reutilizate sau eliminate împreună cu deșeurile uzuale „menajere”.
2. Contaminate/relativ contaminate, inclusiv obiecte ascuțite și tăiate, cum ar fi acele, bisturiile, cuțitele și bucățile de sticlă (în toate cazurile, acestea trebuie puse în recipiente cu pereți și capac solid).
3. Materiale contaminate supuse decontaminării prin autoclavare, care sunt spălate și reutilizate ulterior.
4. Materiale contaminate supuse autoclavării și îndepărtării.
5. Materiale contaminate care urmează să fie arse.

2.9.2 Riscurile deșeurilor

Natura periculoasă a deșeurilor de laborator se datorează prezenței agenților infecțioși sau toxici, precum și prezenței obiectelor ascuțite. Ca urmare a manipulării necorespunzătoare a deșeurilor de laborator, pot apărea boli la oameni, animale și plante, toxicitate umană sau animală, pericole de siguranță, poluarea aerului, contaminarea solului, răspândirea muștelor, altor insecte și rozătoare, mirosul urât și natura neestetică a peisajului.

Toate persoanele care intră în contact cu deșeurile periculoase de laborator sunt amenințate de pericol, inclusiv cele care lucrează în laborator și alte persoane implicate în manipularea acestor deșeuri sau care sunt influențate de acțiuni neglijente.

Un alt pericol este lovirea reactivilor chimici în deșeuri, care vor fi eliminate și mai mult ca deșeuri menajere. Ca urmare, există un risc de poluare a mediului înconjurător, o amenințare pentru sănătatea lucrătorilor implicați în reciclare în urma eliberării toxinelor sau a posibilității unei explozii etc.

Într-un document este dificil să se prezinte toate riscurile care pot apărea în laborator. Prin urmare, personalul de laborator ar trebui să evalueze toate riscurile specifice unui anumit laborator. De asemenea, este important să se elaboreze o procedură pentru lucrători în cazul eliminării substanțelor chimice, deteriorării containerelor și altor situații de urgență. Este important să se furnizeze mijloace care să contribuie la reducerea la minim a pagubelor posibile. Ulterior, materialele utilizate împreună cu rămășițele materialului deteriorat trebuie izolate și eliminate în mod corespunzător.

2.9.3 Acumularea, sortarea și depozitarea temporară

Toate deșeurile care sunt utilizate prin metode care nu diferă de metodele de utilizare a deșeurilor menajere, cu excepția hârtiei reciclate și a sticlei, se numesc „deșeuri controlate”. Articolele din această categorie, care includ hârtie murdară, plastic, cauciuc și lemn, ar trebui de obicei să fie plasate în containere de gunoi care se află în fiecare laborator și care vor fi colectate de persoanele care fac curățenie. Cu toate acestea, fiecare laborator trebuie să aibă, de asemenea, un container sau mai multe containere pentru anumite articole care nu sunt permise în tomberoanele obișnuite de gunoi.

Orice obiecte ascuțite din metal sau sticlă trebuie păstrate separat, toate pulberile mici (de preferință într-un flacon sau într-un borcan), tuburile de testare murdare sau alte obiecte contaminate cu substanțe chimice (dar nu și seringile sau acele) trebuie depozitate la distanță.

Containerele de deșeuri controlate de laborator trebuie deșertate în mod regulat și nu trebuie niciodată supraumplute. În nici un caz ustensilele de sticlă, metalele ascuțite sau pulberea fină nu pot fi amplasate într-un container obișnuit al deșeurilor de laborator. Pluta trebuie scoasă de la toate sticlele pentru eliminare. În plus, nu ar trebui să existe nici un miros chimic specific din nici o sticlă sortată pentru reciclare.

Ustensilele de sticlă și deșeurile din sticlă ar trebui depozitate într-un container cu deșeuri marcate separat de alte deșeuri solide, în scopul reciclării. Recipientele goale, cu reactivi, pot fi reutilizate în laborator după curățarea și îndepărtarea atentă a etichetelor vechi.

Deșeurile ascuțite, cum ar fi bisturiile, acele de la seringi, ustensilele de sticlă sparte etc., ar trebui depozitate pentru a fi eliminate în recipiente cu pereți solizi care nu vor permite leziuni accidentale. Containerele trebuie să fie colectate de companiile de reciclare autorizate.

Este strict interzis de turnat lichide inflamabile într-o chiuvetă. Acestea se toarnă în recipiente adaptate și apoi scoase pentru eliminare.

Recipientele trebuie să fie etichetate, de exemplu, cu o inscripție și culoare adecvată pentru a preveni sortarea incorectă a deșeurilor. Este recomandabilă utilizarea inscripțiilor și semnelor recunoscute pe plan internațional.

Substanțele chimice volatile reciclate se depozitează în rezervoare cu capace de protecție în camere bine ventilate. Cu toate acestea, stocarea deșeurilor în tuburile de ventilație în care apar reacții este strict interzisă.

Deșeurile citotoxice trebuie depozitate separat de alte deșeuri într-un loc sigur desemnat.

Deșeurile radioactive trebuie depozitate în recipiente care previn ionizarea. Deșeurile care trebuie depozitate în timpul unei dezintegrări radioactive trebuie marcate după tipul de radionuclid, data și condițiile de depozitare necesare.

Este interzisă depozitarea sticlelor utilizate pe podea sau într-o chiuvetă.

Produsele chimice compatibile pot fi depozitate împreună, iar substanțele incompatibile trebuie separate. De asemenea, substanțele incompatibile pot include substanțe arse și neinflamabile, deoarece acestea sunt furnizate în continuare cu diferite metode de utilizare.

2.9.4 Cerințe de bază pentru instrumente și containerele de stocare

Containerele de deșeuri ar trebui să fie ușor de accesat, dar fără a interfera cu munca angajaților.

Ar trebui folosite containere cu marcaje pentru diferite tipuri de deșeuri. Codarea culorilor este adesea utilizată. În acest caz, culorile trebuie să fie contrastante. Toate containerele cu pericol biologic, chimic sau radioactiv trebuie marcate cu simboluri internaționale adecvate. Dacă se utilizează etichete pentru marcarea deșeurilor, atunci fundalul acestora trebuie să contrasteze cu culoarea containerului.

Toate recipientele utilizate pentru deșeuri trebuie să fie etanșe și să prevină orice impact negativ asupra mediului.

Containerul pentru deșeuri ascuțite și tăioase trebuie să fie cu pereți etanși care să facă imposibilă deteriorarea lor. Cu toate acestea, nu se recomandă utilizarea containerelor metalice fabricate dintr-un material care se poate coroda.

Capacitatea containerelor ar trebui să fie adecvată cantității de deșeuri și să corespundă frecvenței de scoatere a acestora din incinta laboratorului. Nu se recomandă umplerea containerului cu mai mult de 3/4 din volumul său. În plus, trebuie luată în considerare greutatea totală a rezervorului. Acesta nu ar trebui să fie prea mare și greu.

Pentru deșeurile care nu sunt ascuțite, puteți utiliza pachete puternice. După umplerea pachetului cu 3/4, se recomandă legarea pachetului cu o bandă de plastic fermă. Pentru o mai mare fiabilitate, se recomandă utilizarea pachetelor duble sau inserarea unui pachet de dimensiune corespunzătoare într-o cutie cu corugator. Pe cutie trebuie făcute marcaje adecvate.

În timpul lucrului cu o cultură de celule, trebuie să țineți cont de condițiile de depozitare a deșeurilor (de exemplu, vase Petri) în laborator. Microorganismele se vor multiplica rapid la temperatura camerei. Prin urmare, este necesar fie să se creeze condiții nefavorabile pentru reproducerea microorganismelor, fie să se țină seama de planificarea frecvenței eliminării deșeurilor.

Containerul de deșeuri trebuie să fie rezistent la substanțele conținute în acesta. Este inadmisibilă acumularea rămășițelor de substanțe chimice care interacționează între ele în același container.

2.9.5 Eliminarea și transportul deșeurilor.

Eliminarea deșeurilor de laborator este reglementată de diferite standarde regionale, naționale și internaționale, astfel încât pentru dezvoltarea și punerea în aplicare a unui program de manipulare, transport și eliminare a deșeurilor periculoase este necesar să se studieze literatura specializată.

Decontaminarea deșeurilor și eliminarea finală a acestora sunt strâns legate în laboratoare. Principiul de bază este acela că materialele infectate trebuie decontaminate, autoclavate sau distruse în laborator. Înainte de a elimina din laborator obiectele sau materialele care au legătură cu substanțele infecțioase, microorganismele sau animalele potențial dăunătoare, trebuie puse următoarele întrebări:

1. aceste obiecte și materiale au fost sterilizate sau dezinfectate prin proceduri adecvate stabilite?
2. Dacă nu, au fost aceste obiecte sau materiale ambalate printr-un proces documentat pentru distrugerea imediată la fața locului sau pentru transportarea la un alt laborator unde există un spațiu de combustie?
3. Eliminarea materialelor/obiectelor dezinfectate sau sterilizate este legată de un pericol potențial suplimentar (biologic sau de alt tip) pentru cei care efectuează direct procedura de distrugere sau pentru cei care pot veni în contact cu obiectele sau materialele în afara laboratorului?

Toate categoriile de deșeuri care urmează să fie eliminate trebuie marcate în mod corespunzător. Este important să se respecte etichetarea recunoscută pe plan internațional a pericolelor care ar putea fi în deșeuri. De exemplu, „Pericol biologic”, „Deșeuri radioactive”, „Accelerant pentru incendii” etc. În plus, este de dorit ca etichetarea să nu fie schimbată pentru o perioadă lungă de timp.

Este permisă combinarea mai multor containere mici într-unul mai mare, însă acestea ar trebui să fie din aceeași categorie de deșeuri și containerul mare ar trebui să aibă marcaje similare.

2.9.6 Gestionarea documentelor

Laboratoarele ar trebui să țină evidențe clare și ușor de depistat cu privire la gestionarea deșeurilor. Această documentație este esențială pentru reglementarea, planificarea și monitorizarea guvernamentală, reducerea responsabilității, facilitarea inspecțiilor și răspunsul la solicitări și buletine informative. Pentru a se asigura respectarea cerințelor, este necesară o documentație detaliată. Fiecare laborator are perioade de raportare unice și specifice și date de depunere, forme de raportare a datelor și timpul de stocare a înregistrărilor. Cerințele și procedurile de documentare ar trebui incluse în planul de gestionare a deșeurilor laboratorului.

Aceste cerințe includ:

- Documentația privind caracteristicile instalațiilor și teritoriului laboratorului.
- Descrierea tipurilor de deșeuri și a metodelor de gestionare a acestora.
- Datele de deschidere/închidere a containerelor pentru depozitarea deșeurilor.
- Documente care confirmă eliminarea deșeurilor.
- Rezultatele verificării eficacității măsurilor de reducere la minim a deșeurilor.

Capitolul 3. Prelevarea prbelor

3.1 Prelevarea probelor (inclusiv probele în circulație liberă și ambalate), transportul, depozitarea, manipularea și reciclarea

Pentru a determina sau confirma cauza bolii sau a decesului animalelor, în cazul suspiciunii unei boli infecțioase/invazive sau a otrăvirii, specialistul (medicul în medicină veterinară) este obligat să selecteze corect materialul patologic/biologic relevant și să îl trimită unui laborator acreditat (de stat sau autorizat) de medicină veterinară pentru realizarea cercetărilor relevante.

În plus, la laborator pot fi trimise probele de hrană pentru animale, apă, sol, aer pentru efectuarea diferitor studii, precum și probele de sânge și alte materiale de la animale pentru analize bacteriologice/virologice, imunologice, histologice, moleculare, biochimice și chimice toxicologice.

Prezenta secțiune descrie organizarea, regulile de selecție și trimiterea mostrelor, metodele de conservare și momentul livrării la laborator a materialului patologic/biologic pentru viață, precum și diagnosticarea postum a bolilor infecțioase ale animalelor, procedura de prelucrare a documentelor justificative pentru mostrele selectate.

Descriți cerințele privind ambalarea, marcarea, documentația pentru materialele infecțioase din diverse categorii și normele de transport ale acestor materiale.

Această parte a manualului descrie materialul patologic/biologic specific pentru boli bacteriene și virale specifice animalelor, care sunt sistematizate pentru fiecare specie în parte.

Această parte este destinată specialiștilor în medicina veterinară și specialiștilor laboratoarelor de diagnostic.

INTRODUCERE

Un efort și resurse considerabile sunt cheltuite pentru optimizarea metodologiei și luarea în calcul a reducerii la minim a incertitudinii de măsurare a analizelor alimentare. Cu toate acestea, modul în care mostrele sunt preluate și dacă sunt reprezentative în acest scop primesc o atenție considerabil mai mică. În mod frecvent, sunt selectate prea puține unități sau acestea sunt selectate astfel încât să nu fie reprezentative pentru lotul examinat. Consecințele ar putea fi rezultate nefiabile și timp și efort irosit, ceea ce ar putea duce în cele din urmă la decizii administrative greșite. De asemenea, se vor obține rezultate greșite în cazul în care probele de testare sunt etichetate incorect, depozitate incorect sau pretratate într-un mod care nu este conform regulilor sau reglementărilor. Dimensiunea eșantionului ar trebui să corespundă scopului – fie că mai multe

sau mai puține mostre ar reprezenta o pierdere de bani. Prin urmare, este esențial să se acorde o atenție deosebită procedurilor de prelevare a probelor în momentul conceperii unui proiect de supraveghere, monitorizare sau inspecție.

Acest ghid este destinat tuturor celor interesați de analiza alimentelor și a procesului decizional pe baza acestor analize.

Există multe aspecte de luat în considerare atunci când se concepe o procedură de prelevare de probe. În unele produse alimentare, parametrii care urmează să fie examinați sunt distribuiți în mod egal (omogen) în matrice, dar în mod frecvent compuși/microorganismele sunt distribuiți în mod inegal (eterogen). Este, bineînțeles, important, de asemenea, să se ia în considerare pericolele la adresa sănătății asociate parametrului, precum și importanța produselor alimentare cu care parametrul poate fi asociat, atunci când se determină planul de prelevare a probelor.

În mod ideal, un simplu set de reguli ar trebui să se aplice tuturor prelevărilor de probe pentru produsele alimentare. Totuși, acest lucru nu este posibil și ar fi la fel de nepotrivit ca o singură metodă analitică de analiză a tuturor tipurilor de compuși. Pentru anumite produse alimentare sunt disponibile multe metode de prelevare de probe și acestea ar trebui aplicate acolo unde este cazul. În mod similar, în cazul în care există deja reglementări privind prelevarea probelor, acestea ar trebui respectate, pentru ca rezultatele să fie valabile din punct de vedere juridic.

DEFINIȚII

Vrac: Materiale care nu constau în unități discrete, identificabile, constante, ci mai degrabă sunt unități sau materiale arbitrare, neuniforme alcătuite din particule sau unități mici care nu ar fi practice pentru prelevarea probelor în mod individual.

Probă compozită (agregată): O probă alcătuită din porțiuni din fiecare unitate, prelevată proporțional cu cantitatea de produs din fiecare unitate selectată. (ISO 7002-1986). Numărul total combinat al tuturor probelor elementare prelevate din lot. Notă: Se pot lua, de asemenea, porțiuni egale, a căror dimensiune trebuie specificată în prealabil.

Lot: O cantitate de anumite mărfuri, livrată la un moment dat și acoperită de un set de documente. Lotul poate consta dintr-unul sau mai multe loturi sau părți de loturi. (ISO 7002-1986)

Contraproba/proba duplicat: O probă prelevată din același lot, în același timp și în același mod ca proba utilizată în scopul punerii în aplicare, care trebuie să fie cât mai similară posibil. Contraproba trebuie sigilată și poate fi utilizată de companie pentru a verifica rezultatul analizelor oficiale.

Increment: O cantitate de materie prelevată la un moment dat dintr-un corp mai mare de material (7002-1986 ISO)/O porțiune individuală de material colectată printr-o singură operațiune a unui dispozitiv de prelevare a probelor, din părți dintr-un lot separat în timp sau spațiu. Incrementele pot fi testate individual sau combinat (compozit) și testate ca o unitate.

Inspecție: Prelevarea aleatorie a probelor pentru a examina dacă proba corespunde sau nu specificațiilor date. Rezultatele acestor probe determină dacă sunt necesare acțiuni suplimentare – (intensificarea inspecției). (Raport SNT nr. 5. 1995)

Articol/unitate: Un obiect real sau convențional (o cantitate definită de material) pentru care se poate face un set de observații. (ISO 7002-1986)

Probă de laborator/probă finală: O probă pregătită pentru trimiterea la laborator și destinată inspecției sau testării. (ISO 7002-1986)

Lot; partidă: o cantitate identificată de anumite mărfuri fabricate sau produse în condiții care se presupune că sunt uniforme. (ISO 7002-1986)

Monitorizare: Observație repetată sau măsurare repetată, efectuată pe probele reprezentative ale alimentelor individuale sau dieta dintr-o țară sau dintr-o anumită zonă dintr-o țară. (OMS, 1979) a înăspriț colectarea informațiilor efectuate în mod repetat asupra unui anumit obiect sau pentru un anumit scop, pe o perioadă mai lungă de timp.

Prelevarea primară a probelor: Etapele de prelevare a probelor care duc la proba de laborator; respectiv prelevarea de probe realizată „în câmp”.

Probă (termen general): Unul sau mai multe elemente (sau o porțiune de material) selectate într-un anumit mod dintr-o populație (sau dintr-o cantitate mai mare de material). Aceasta este destinată să furnizeze informații reprezentative pentru populație și, eventual, să servească drept bază pentru luarea unei decizii cu privire la populație sau la procesul de producere a acesteia. (ISO 7002-1986)

Planul de prelevare a probelor: Procedură predeterminată, care permite personalului de prelevare a probelor să aleagă, să preleveze sau să separe probele dintr-un lot, pentru a obține informațiile necesare, astfel încât să se poată lua o decizie cu privire la lot.

Prelevarea secundară a probelor: Reducerea/prelevarea probei compozite (agregate) în probe de testare.

Supraveghere: Atestarea stării alimentelor într-un anumit moment fără analize repetate, adică fără obiectivul de a constata vreo modificare a nivelului de substanțe din produsele alimentare. (OMS, 1979) Colectarea extinsă a informațiilor realizate asupra unui obiect/scop specificat într-o anumită perioadă de timp.

Probă de testare: O probă preparată din proba de laborator, în conformitate cu procedura specificată în metoda de testare și din care vor fi prelevate porțiunile de testare. (ISO 7002-1986)

Înăsprirea Inspecției: Umează a fi efectuată atunci când există motive să se creadă că produsul nu este în conformitate cu specificațiile date. În cazul în care rezultatele testului dintr-o inspecție anterioară a aceluiși lot sau a unui lot comparabil depășesc limita legală a unui anumit component, în cazul în care există motive să se creadă că lotul este contaminat sau există suspiciuni rezonabile că lotul vizat nu respectă specificațiile, trebuie colectate mai multe incremente decât într-o inspecție normală.

OBIECTIVUL PRELEVĂRII PROBELOR

Înainte de prelevare, obiectivul său ar trebui definit: ceea ce urmează să fie testat și scopul preconizat pentru rezultate. Ar trebui examinate cu atenție nevoile și așteptările părților interesate și ale altor potențiali utilizatori cu privire la rezultatele testelor.

De asemenea, este prudent să se analizeze dacă analiza și, prin urmare, prelevarea probelor sunt justificate în realitate. De exemplu, în cazul în care un lot a fost depozitat în mod inadecvat și nu se mai iau măsuri suplimentare ca urmare a manipulării incorecte, prelevarea probelor nu este necesară. Dacă probele depozitate necorespunzător sunt retrase, controlorul ar fi într-o dilemă dacă rezultatele obținute din analize au fost satisfăcătoare.

În cadrul unei inspecții efectuate de autorități, proba poate face parte dintr-un proiect de monitorizare aflat în curs de desfășurare, dintr-o supraveghere sau o inspecție înăsprită sau normală. Produsele alimentare pot fi, de asemenea, incluse în probă, în cadrul unui proiect de cercetare sau al unui control de calitate al unui producător. Prelevarea probelor poate include probe (verificări la fața locului) de produse finale, produse semifabricate, materii prime și materiale de ambalare, precum și prelevarea probelor în cursul controlului igienei și din linia de producție. În timpul prelevării probelor, trebuie să se asigure că proba este cât mai reprezentativă posibil pentru materialul examinat și că dimensiunea finală a probei este suficientă pentru analizele solicitate.

Prelevarea probelor poate fi selectivă sau obiectivă. Diferența poate fi ilustrată printr-o analogie cu viteza traficului. Când se efectuează o verificare selectivă a vitezei, se selectează numai conducătorii care merg prea rapid (sau prea lent). Atunci când se efectuează o verificare obiectivă a vitezei, se selectează participanții la trafic reprezentativi pentru trafic, pentru a compara media și variația în momente sau locuri diferite.

3.1 Prelevarea obiectivă a probelor. Scopul prelevării obiective (nesubiective) a probelor (eșantionare/inspecție aleatorie, supraveghere, monitorizare) este de a obține o probă aleatorie reprezentativă din lot sau din zona geografică în cauză. Fiecare porțiune/increment al lotului ar trebui să aibă aceeași probabilitate de a fi eșantionat.

O prelevare obiectivă a probelor este utilizată pentru supravegherea și monitorizarea alimentelor. În cazul monitorizării, același tip de aliment este examinat după aceiași parametri, în mod repetat, timp de o lună/ani, pentru a examina dacă parametrii variază și pentru a determina conformitățile/neconformitățile. Este vital ca proba să fie selectată aleatoriu, pentru a asigura, pe cât este posibil, că aceasta este reprezentativă pentru lot.

3.2 Prelevarea selectivă a probelor. În cadrul prelevării selective a probelor, probele sunt adunate în mod normal pentru a ilustra sau a documenta condițiile nesatisfăcătoare sau presupusa falsificare a unui produs. Prelevarea probelor este subiectivă în mod deliberat și este direcționată către anumite produse sau producători, adesea ca răspuns la informațiile obținute anterior prin prelevarea obiectivă a probelor. În așa-numitele inspecții înăspriți, ar trebui prelevate mai multe probe decât în cazul prelevării obiective a probelor loturilor nesuspecte, sporind probabilitatea de a dovedi incoerența produsului cu legislația. Acest tip de prelevare de probe nu este în mod necesar reprezentativ pentru întregul lot, deoarece probele nu pot fi selecționate aleatoriu și, prin urmare, rezultatele nu pot fi considerate statistice. Pe de altă parte, resursele pot fi utilizate cel mai bine în prelevarea selectivă a probelor. Plângerile consumatorilor, cum ar fi contaminarea

de către insecte și incidența unor dăunători precum șobolanii dintr-un stoc/depozit, vor avea ca rezultat în mod normal o prelevare selectivă a probelor. Probele vor fi prelevate în locațiile în care este cel mai probabil ca acestea să dovedească contaminarea. Prin analogie, inspecțiile la temperatură se efectuează în locațiile în care se preconizează că condițiile sunt cele mai critice.

3.3 Reguli de schimbare. Obiectivul și prelevarea selectivă a probelor se pot completa reciproc. În cazul în care supravegherea consolidează suspiciunile privind existența unor probleme legate de anumite produse alimentare, de la o anumită origine sau companie, ar trebui efectuată o prelevare selectivă de probe, concentrându-ne asupra acestor produse. Trecerea de la un plan de prelevare a probelor la altul este denumită reguli de schimbare. În cazul în care analiza se dovedește defectuoasă sau inconsecventă atunci când se utilizează prelevarea obiectivă a probelor, este posibilă trecerea la un plan selectiv de prelevare a probelor, concentrându-ne asupra problemei demonstrate. Atunci când rezultatele indică faptul că respectarea acestui plan mai strict nu mai este necesară, atunci poate fi efectuată revenirea la supraveghere, utilizând un plan obiectiv de prelevare a probelor.

DESCRIEREA PROIECTULUI, INCLUSIV PROCEDURA DE PRELEVARE A PROBELOR

La planificarea unui proiect trebuie prezentată o descriere care să includă următoarele subiecte:

- Motivul pentru care se efectuează prelevarea probelor – obiectivul
- Care analiți/parametri urmează să fie determinați
- Care matrici ar trebui să fie prelevate, ce fel de produse alimentare
- Unde se efectuează prelevarea probelor – locația
- Modul de prelevare a probelor - echipament și tehnici, personal de prelevare a probelor
- Modul în care elementele/agregatele mari urmează să fie eșantionate – tipul planurilor de prelevare a probelor
- Modul de etichetare a probelor
- Tipul de informații care trebuie înregistrate în timpul prelevării probelor – protocol de prelevare de probe
- Cum trebuie transportate sau expediate probele - orice pretratare necesară
- Cine trebuie să efectueze analiza probelor (care laborator)
- Modul de păstrare și pretratare a probelor în laborator
- Care sunt metodele analitice care urmează să fie utilizate
- Cum trebuie raportate și utilizate rezultatele analitice și cui
- Cum să evaluăm și să urmărim rezultatele

CARACTERUL PARAMETRULUI ȘI AL MATRICII DE EXAMINARE

Efortul și resursele utilizate trebuie să reflecte proprietățile parametrului legate de pericolul pentru sănătate, care urmează să fie determinat importanța alimentară a alimentului consecințele asupra grupurilor individuale cu intoleranță gravă față de anumite produse alimentare scopul preconizat al produsului (consumul direct, materia primă, intermediarii, aditivii de proces etc.) metodele disponibile de analiză; nivelul sau precizia necesare cerințele legale ce informații de compoziție sunt necesare; media, extremele sau variabilitatea compoziției.

Este important ca proprietățile fizice și chimice ale analitului să fie cunoscute. În cazul în care analitul metabolizează sau suferă modificări fizice sau chimice, acest lucru ar trebui luat în considerare atunci când se alege dispozitivul și echipamentul de prelevare a probelor și când se ia în considerare preprepararea și depozitarea viitoare. De asemenea, este esențial să știm dacă lotul vizat constă din articole unice sau în vrac.

Succesul în obținerea unor probe reprezentative de alimente depinde în mod direct de caracteristicile fizice ale produsului (de exemplu, lichid, pulbere, bucăți grosiere, gaze naturale) și de tipul contaminării potențiale. Incertitudinea prelevării probelor este direct proporțională cu variația dintre particulele probei. Pentru o dimensiune fixă a probei, cu cât dimensiunea componentelor individuali este mai mică, cu atât eroarea prelevării probelor este mai mică. Este mai ușor să se obțină probe reprezentative din alimentele care sunt lichide, de exemplu apă, lapte sau bere, pastile sau pulberi, decât pentru alimentele formate din componente mai mari, în formă neregulamentară, de exemplu cereale, nuci întregi, fructe, alimente/furaje mixte etc. Acest lucru nu se aplică în mod necesar în cazul prelevării probelor pentru examinarea organismelor modificate genetic, deoarece ADN-ul poate fi fragmentat prea mult dacă dimensiunea particulelor este prea mică. Pentru o teorie completă și exhaustivă de prelevare a probelor și a erorilor de

prelevare a probelor, cititorului i se face trimitere la lucrările Dr. Pierre Gy; Prelevarea Materialelor Granulate, Teoriei și Practică, Elsevier, Amsterdam, 1992. Compoziția și complexitatea matricei alimentare au o influență semnificativă asupra obținerii probelor reprezentative, în special în concentrații extrem de scăzute și/sau în cazul în care contaminarea nu este distribuită omogen pe tot lotul. În astfel de cazuri, trebuie prelevate mai multe incremente. Gy și alți autori au elaborat această declarație.

Compușii periculoși, cum ar fi micotoxinele și agenții patogeni, sunt adesea distribuiți neuniform în alimente. Atunci când prelevarea de probe este eterogenă, numărul incrementelor prelevate trebuie mărit pentru a obține o probă reprezentativă. Atunci când se investighează focarele de intoxicare alimentară, se recomandă cu insistență eșantionarea unui număr mare de incremente, pentru a obține probe mari agregate/compozite din toate alimentele suspectate. Cu toate acestea, poate fi necesar să se accepte probe mai mici decât cele dorite, din cauza dificultăților de obținere a unui material suficient (cea mai mare parte a acestora este deja consumată), a costurilor excesive sau a dimensiunii probelor dorite prea mari pentru a fi administrate. Înainte de prelevarea probelor, se recomandă întotdeauna verificarea la laborator, în cazul unor cerințe speciale privind dimensiunea probei și manipularea probei.

Pentru analiza senzorială trebuie făcute, într-o oarecare măsură, alte considerații. Pentru a analiza produse potențial nocive, este necesar să se excludă din motive evidente gustarea acestora, și în anumite situații poate fi adecvată testarea aspectului exterior și a mirosului.

Rareori se recomandă omogenizarea probelor de teste senzoriale prin amestecare sau măcinare. Probele sunt fie omogene (toate tipurile de lichide) sau sunt eterogene și trebuie analizate astfel. Prin urmare, este important de remarcat faptul că probele prelevate sunt reprezentative pentru probele de laborator și că probele de laborator sunt reprezentative pentru lotul relevant.

UNDE SE VA EFECTUA PRELEVAREA PROBELOR – LOCAȚIA

Decizia privind locul de prelevare a probelor depinde de scopul proiectului. În cazul în care scopul este de a verifica punctele critice (într-un depozit sau într-o anumită etapă de producție), punctele critice trebuie să fie definite. De exemplu, într-o unitate frigorifică de depozitare sau într-o camionetă frigorifică, probele trebuie selectate din cele mai apropiate elemente de uși (atât din partea de sus cât și din partea de jos), aproximativ în mijlocul depozitului (atât din partea de sus cât și din partea de jos) și în apropiere de nivelul de admisie a aerului în unitatea de refrigerare. Uneori este necesar să se descarce întreaga camionetă, întrucât există unele speculații cu privire la faptul că doar anumite părți ale lotului pot fi verificate. În cazul în care marfa este depozitată la temperatura camerei în loc de +4°C, nu este necesar să se preleveze probe și să se facă o analiză înainte de a lua măsuri. Punctele de pe podea, care indică decongelarea/topirea, sunt semne tipice.

În cazul în care scopul supravegherii este legat de consumul consumatorului, eșantionarea se efectuează la producător, angrosist/importator sau distribuitor. Probele utilizate în scopul punerii în aplicare ar trebui prelevate cât mai aproape posibil de originea problemei și a produsului, și anume în timpul fabricării sau la import, astfel încât evaluarea rezultatelor și urmărirea acestora să fie cât mai eficientă posibil.

ECHIPAMENTUL

Materialele din echipamentul de prelevare a probelor (inclusiv instrumentele, containerele și capacele) nu trebuie să provoace nici o modificare a probei, fapt care ar putea afecta rezultatele examinării. Toate suprafețele echipamentului de prelevare și ale containerelor de prelevare a probelor trebuie să fie curate și uscate, netede și fără fisuri și colțurile ar trebui de preferință rotunjite. În plus, la prelevarea probelor pentru examinarea microbiologică, toate echipamentele utilizate trebuie să fie sterile. Echipamentele care urmează să fie utilizate sunt uneori specificate în regulamente și, în asemenea cazuri, ar trebui utilizate. De asemenea, se poate utiliza prelevarea automată sau semiautomată de probe. Acest echipament trebuie supus unor teste adecvate înainte de a fi utilizat și la intervale regulate în timpul utilizării.

- ✓ Instrumente de prelevare: instrumentele, de exemplu lopețile (mai degrabă decât linguri), cuțitele, pipetele, burghiile și sondele ar trebui să fie adecvate pentru utilizarea preconizată. Ar trebui de verificat dacă instrumentele nu fac distincție între diferite părți ale lotului (de exemplu, găurile/tranșele prea mici pot face discriminări față de particulele/bucățile mai mari). Sunt disponibile sonde specifice de eșantionare, „hoate” și burghii. „Hoatele” sunt implanturi asemănătoare sulței folosite pentru prelevarea probelor din saci textili care conțin cafea, cereale etc.,
- ✓ Pentru examinările microbiologice, pentru deschiderea ambalajelor sigilate și pentru prelevarea probelor trebuie utilizate instrumente sterile. În cazuri excepționale, pot fi folosite instrumentele utilizate de comerciantul cu amănuntul/vânzător, caz în care acest lucru trebuie menționat în raportul de prelevare a

probelor. Instrumentele trebuie să fie confecționate dintr-un material ușor de curățat și sterilizat. Este important să fiți pregătiți pentru prelevarea probelor, având la dispoziție instrumentele necesare. Instrumentele trebuie atinse cât mai puțin posibil înainte de utilizare și trebuie protejate împotriva contaminării până la efectuarea prelevării probelor. Ar trebui utilizate, de preferință, instrumente și recipiente sterile de unică folosință. Pentru analiza microbiologică, prelevarea secundară a probelor nu este favorabilă, deoarece sporește riscul de contaminare.

În prelevarea probelor microbiologice, este important să se măsoare temperatura. Nu măsurați temperatura probei care urmează să fie prelevată, deoarece măsurarea poate contamina proba. Se utilizează termometre calibrate capabile să măsoare temperaturile cuprinse între -300°C și 1000°C , cu o precizie de $\pm 10^{\circ}\text{C}$. Calibrarea trebuie să poată fi urmărită la termometre de referință.

- ✓ În cazul examinărilor senzoriale, de regulă, nu se obțin probe pentru analizele senzoriale din loturi mari, dacă exemplele de prelevare a probelor de mai sus sunt adecvate. Mai frecvente sunt entitățile naturale, fie produse (de exemplu cârnați, conserve de mazăre și sticle de vin), fie „unitățile biologice”: șuncă, mere, pește și pomușoare. Este improbabil ca o „hoată” sau o sondă să fie deosebit de potrivită pentru aceste probe. Pentru analizele senzoriale, procedura de prelevare a probelor este legată de modul în care unitățile sunt selectate pentru analize, și nu de instrumentele care urmează a fi utilizate.
- ✓ Containere de probă. Forma și capacitatea containerului ar trebui să fie adecvate pentru produsul supus prelevării de probe. Containerele și capacele pentru prelevarea probelor trebuie să fie din materiale și construcții, care vor proteja în mod adecvat proba. Notă! Utilizați containere sterile pentru prelevarea probelor în vederea examinărilor microbiologice. Containerele și capacele pentru prelevarea probelor trebuie să fie din sticlă, metale adecvate sau material plastic. Se pot folosi containere din plastic de unică folosință, borcane din plastic steril, recipiente fabricate din folii din plastic, inclusiv folie din aluminiu sau pungi din plastic, cu mijloace adecvate de închidere. Orice dop sau strat folosit trebuie să fie insolubil, non-absorbant și rezistent la praf și nu trebuie să influențeze mirosul, aroma, proprietățile sau compoziția probei. Containerul trebuie să fie de preferință opac. Dacă este transparent sau translucid, containerul cu conținutul său trebuie păstrat într-un loc întunecat.

În cazul în care proba reprezintă un produs care poate fi cumpărat într-un magazin cu amănuntul, poate fi relevant să se utilizeze un instrument obișnuit pentru prelevarea probelor în magazin și în ambalajul produsului, cum ar fi cutiile de tort sau pungile de la brutărie.

Este important să se comunice cu laboratorul în privința măsurilor de precauție necesare, containerelor, pretratării și dimensiunii probei de laborator. Dimensiunea containerelor ar trebui să fie adecvată în acest scop. Containerele trebuie să aibă închideri securizate care să le permită să fie sigilate strâns.

TEHNICA DE PRELEVARE A PROBELOR

Ar trebui urmate, după caz, reglementările și procedurile de prelevare a probelor descrise în metode.

Pentru a evita contaminarea mostrelor sau orice alte modificări care afectează negativ rezultatele examinărilor trebuie luate măsuri de precauție. În timpul prelevării probelor, trebuie să se asigure că proba este cât mai reprezentativă posibil pentru lotul/ținta de interes și că dimensiunea probei este suficientă. Pe cât posibil, incrementele ar trebui să aibă o greutate similară și să fie prelevate din diferite locații ale lotului. S-a demonstrat că selectarea și amestecarea mai multor probe elementare de incremente mici într-un compus, mai degrabă decât amestecarea unui număr mic de incremente de unități/elemente mai mari, obține o estimare mai corectă a valorii medii a lotului. Fiecare lot care urmează să fie examinat trebuie să fie eșantionat separat. În cazul în care mai multe probe din containere sau rezervoare sunt prelevate simultan pentru diferite teste, trebuie prelevată mai întâi proba pentru examinarea microbiologică, iar containerul de probe trebuie închis imediat după prelevare. Amintiți-vă să verificați și să notați temperatura în locația de prelevare a probelor.

✓ Personalul de prelevare. Prelevarea probelor trebuie efectuată de un operator calificat și instruit corespunzător. Un specialist autorizat de prelevarea probelor ar trebui să efectueze o prelevare oficială a probelor. În cadrul programelor de monitorizare, pe o perioadă mai lungă de timp, toți operatorii ar trebui să beneficieze de aceeași formare și instrucțiuni, pentru a obține probe comparabile. În situații complexe, testele anterioare prelevării probelor sunt utile pentru asigurarea înțelegerii protocoalelor și pentru identificarea potențialelor probleme și dificultăți.

✓ Prelevarea probelor de substanțe solide din vrac. Pentru a obține incremente reprezentative, ar trebui utilizați „tălharii”, sondele sau burghiile pentru prelevarea de probe solide, cereale, pudră sau pastile din vrac, mai degrabă decât o lopată. Atunci când se utilizează o lopată, se prelevează numai stratul superior. O

probă mai reprezentativă se obține atunci când se folosește o sondă. Cu toate acestea, obiectivul prelevării probelor determină tehnicile care urmează să fie utilizate.

Atunci când se folosește o lopată, probabilitatea obținerii de particule din stratul inferior este mică. Prin urmare, incrementele nu ar fi reprezentative pentru lot. Există posibilitatea ca produsele de calitate mai slabă să fie găsite în stratul inferior.

În cazul prelevării probelor de lichide, reziduuri și paste, materialul trebuie amestecat complet înainte de prelevare, prin mijloace manuale sau mecanice. În cazul pulberii, se recomandă cu insistență o metodă mecanică de prelevare a probelor. Proba trebuie prelevată imediat după amestecare și, dacă este posibil, în timp ce produsul este încă agitat.

✓ Prelevarea probelor din fluxurile curgătoare. În timpul controlului anumitor procese, în controlul calității materiilor prime sau a produsului final sau a inspecției cerealelor, poate fi practic ca proba să fie prelevată dintr-un flux curgător. Pentru a face prelevarea probelor cât mai aleatorie posibil, este important să se preleveze probe din întregul flux pentru o fracțiune de timp (A), și nu să se preleveze probe dintr-o anumită parte a fluxului, pe toată durata (B). Prin prelevarea probelor dintr-o anumită fracțiune există probabilitatea ca anumite seturi de particule să fie discriminate.

✓ Prelevarea probelor de articole. Atunci când se prelevează probe din produse în ambalaje cu amănuntul destinate consumatorilor, trebuie să se preleveze probe din ambalaje nedeschise, pentru a evita contaminarea mediului sau a altor persoane. Probele trebuie prelevate cât mai aleatoriu posibil, în funcție de necesitățile testului.

✓ Pregătirea probei compozite. Toate incrementele obținute sunt colectate și plasate imediat într-un container adecvat. Capacitatea containerelor de probă utilizate trebuie să fie astfel încât acestea să fie aproape umplute complet de probă, permițând astfel amestecarea adecvată a conținutului, evitând însă înspumarea în timpul transportului. Incrementele se amestecă bine cu o lopată imediat după colectare.

Pentru examinări microbiologice, probele compozite de alimente nepreambalate sau eşantioanele din ambalaje mai mari nu trebuie să cântărească mai puțin de 200 g. Cantitatea totală de incremente de alimente preambalate nu trebuie, în general, să cântărească mai puțin de 100 g. Pentru analiza chimică, dimensiunea incrementelor și a probelor agregate depinde de parametrul de interes, precum și de distribuția acestuia în matrice și de eterogenitatea matricei.

Pentru analiza senzorială, dimensiunea probelor depinde de produs. Pentru produsele care pot fi tăiate și amestecate (morcovi/cuburi de morcovi, cârnați/crenvuști, pește/fileu de pește etc.), scopul analizei determină dacă să guste toate unitățile sau o colecție de entități. Toate entitățile sunt selectate dacă scopul urmărit este obținerea de informații cu privire la variația dintre unități. A doua opțiune, care are ca rezultat, de obicei, un model statistic mai simplu, ar trebui luată în considerare pentru a determina chiar și variația fizică.

NUMĂRUL PROBELOR PRELEVATE

Numărul de elemente/incremente care trebuie supuse prelevării probelor și anume planul de prelevare ales, se determină după cum urmează:

- obiectivul prelevării probelor (HACCP și punctele critice de control pe baza analizei riscurilor)
- intervalul de încredere acceptat și incertitudinea acceptabilă
- caracteristicile (omogenitatea) lotului
- caracteristicile (dăunătoare sănătății, distribuției etc.) analitului
- economia

Pentru anumiți analiști/parametri din produsele alimentare, există reglementări, instrucțiuni și directive privind metoda de prelevare a probelor și numărul de probe, iar acestea ar trebui utilizate, după caz. Mai des decât oricând, sunt colectate prea puține probe, însă din motive economice este important, de asemenea, să se menționeze că nu trebuie prelevate mai multe probe decât este necesar.

Planurile de prelevare a probelor specifică numărul probelor care trebuie prelevate. Acestea sunt declarații ale criteriilor de acceptare aplicate loturilor, pe baza analizelor relevante ale numărului necesar de probe. La examinarea proprietăților legate de sănătate ar trebui utilizate planuri mai stricte de prelevare a probelor (de exemplu, în evaluarea reziduurilor microbiologice, a pericolelor microbiene, a toxinelor și a compușilor cancerigeni) decât în examinarea caracteristicilor compoziției și a defectărilor de mărfuri. Planurile de prelevare a probelor sunt descrise în anexa atașată.

SIGILAREA ȘI ETICHETAREA PROBELOR

Probele sau containerele de prelevare a probelor trebuie etichetate în mod clar și permanent, imediat înainte sau după prelevarea unei probe, pentru a asigura o identificare fiabilă. Etichetarea ar trebui să se facă în conformitate cu protocolul de prelevare a probelor.

În cazul în care mostrele urmează să fie transportate la un alt laborator, materialul de transport trebuie etichetat în mod clar cu numele, adresa și numărul de telefon al destinatarului. În cazul în care materialul de transport urmează să fie returnat, numele expeditorului trebuie scris pe etichetă. Alte marcaje de pe materialul de transport pot fi „fragil”, „depozitare frigorifică”, „depozitare în stare congelată” etc.

La înregistrarea online a probelor, este important ca proba să fie marcată astfel încât să poată fi găsită conform informațiilor din sistemul electronic.

Dacă este posibil, probele de alimente preambalate trebuie livrate la laborator în ambalaje sigilate, originale. În cazul cantităților mari de alimente, care nu sunt preambalate sau al ambalajelor prea mari pentru a fi livrate la laborator, probele trebuie transferate în containere, utilizând echipamente care să asigure că proba nu este contaminată microbiologic și/sau chimic. În cazul în care recipientul de probă trebuie sigilat în mod oficial, acesta trebuie realizat în prezența reprezentanților tuturor părților implicate. Sigiliul poate fi alcătuit din bandă adezivă sau material similar, făcând imposibilă falsificarea fără a deteriora sigiliul. Pe sigiliu se menționează data, numărul probei și numele sau inițialele personalului de prelevare a probelor și, eventual, pe sigiliu se aplică o ștampilă sau ceva similar. În cazul în care sunt necesare mai multe probe, toate trebuie tratate în același mod. Pregătirea eșantionului de laborator, reducerea eșantionului, măcinarea și omogenizarea se efectuează în locuri adecvate (protejate).

RAPORTUL DE PRELEVARE A PROBELOR

Raportul de prelevare a probelor completat trebuie să conțină informațiile enumerate mai jos, care asigură identificarea fără echivoc a probei și oferă informații cu privire la caracteristicile probei:

- Locul și locul prelevării probelor (de exemplu, producătorul, comerciantul cu ridicata/cu amănuntul, vehiculul de transport, consumatorul și camera x, frigiderul y, teigheaua z etc.).
- Numărul lotului (identificare)/codul fermei (+ data producției, data ambalării, data expirării și, eventual, numărul de producție).
- Data și ora prelevării probei.
- Denumirea și natura (compoziția) probei.
- Parametrii care trebuie analizați.
- Etichetarea clară, în conformitate cu proba, de exemplu, un cod de laborator.
- Numele producătorului, eventual codul de înregistrare sau de autorizare.
- În cazul mărfurilor perisabile: temperatura probei sau a depozitului în momentul prelevării probei.
- Informații despre produsele alimentare supuse eșantionării, locul de unde au fost prelevate probele (din exterior, din mijloc), preparare, manipulare, depozitare, ora livrării.
- Informații privind condițiile de transport; ora expedierii, temperatura etc.
- Trebuie incluse, de asemenea, informații privind contraprobele și sigilarea. □ Informații suplimentare care descriu produsul supus prelevării probelor sau alte informații care ar putea fi de ajutor pentru laborator sau în evaluarea rezultatelor.
- Motivul prelevării probelor, de exemplu o verificare de rutină, plângere, intoxicație alimentară presupusă, verificarea calității monitorizării, schimbare senzorială.
- Metoda de prelevare a probelor, în cazul în care metoda diferă de cea utilizată ca metodă de rutină/metodă prescrisă sau în cazul în care există observații cu privire la prelevarea probelor.
- Numele, adresa, e-mailul și numărul de telefon al personalului/specialistului responsabil de prelevare.
- Numele, adresa, e-mailul și numărul de telefon al laboratorului.

În cazul suspiciunii unei intoxicații alimentare, raportul de prelevare a probelor trebuie completat cu informații despre evoluția bolii (timpul și simptomele incubăției) și alte informații relevante.

Raportul de prelevare a probelor și numărul copiilor necesare trebuie să fie semnate. În unele cazuri, poate fi necesar ca atât personalul/ specialistul responsabil de prelevare, cât și un reprezentant al distribuitorului de alimente să semneze raportul de prelevare a probelor. Procedurile în astfel de situații ar trebui descrise în orientările interne pentru prelevarea probelor. În mod normal, unei societăți i se oferă posibilitatea de a obține o contraprobă/ probă duplicat atunci când produsele lor sunt eșantionate în scopul aplicării legii, comerțului și arbitrajului. Această probă trebuie prelevată în același loc, în același timp, în același mod etc. și trebuie să semene cu proba oficială cât mai mult posibil. Una dintre probe este trimisă

pentru analiză. Dacă există îndoieli cu privire la rezultatul analizei primei probe, se analizează al doilea eșantion (proba de control).

CONDIȚII PENTRU TRANSPORTAREA SAU EXPEDIEREA PROBELOR

La manipularea, depozitarea și transportarea probelor, nu trebuie să aibă loc schimbări majore înainte de examinarea probelor. Trebuie aplicate toate măsurile de precauție necesare pentru a evita contaminarea sau modificarea compoziției probelor în timpul transportării sau depozitării. Proba trebuie trimisă la laborator cât mai curând posibil după prelevare. Momentul livrării probelor la un laborator ar trebui stabilit în prealabil, împreună cu agenții de livrare. Laboratorul trebuie, de asemenea, informat cu privire la numărul și tipul probelor care urmează să fie examinate.

Mărfurile perisabile, neambalate, trebuie analizate cât mai curând posibil după prelevare. Prin urmare, este esențial ca aceste probe să fie transportate la laborator cât mai curând posibil și întreținute la temperatura prescrisă. Trebuie remarcat faptul că anumite bunuri deosebit de perisabile, cum ar fi peștele proaspăt și crustaceele, nu pot fi transportate pentru foarte mult timp înainte de a se altera. La transportarea unor astfel de alimente, este important să se minimizeze timpul de transport și să se asigure că temperatura probei este cât mai scăzută posibil, fără să fie congelată.

Peștele proaspăt și crustaceele trebuie ambalate în gheață pisată sau zăpadă și transportate în recipiente izolate și etanșe. Alte recipiente sunt acceptabile dacă probele sunt păstrate la temperaturi sub 2°C în timpul întregului proces de transportare.

În cazul analizelor microbiologice, analiza începe în termen de 24 de ore de la prelevare, inclusiv transportarea. Pentru anumiți parametri din apă, ar putea fi necesar un interval de timp mai scurt între prelevarea probelor și analiză.

În timpul prelevării probelor, probele congelate trebuie depozitate într-un container refrigerat în prealabil și plasate într-un congelator imediat după prelevare. Acestea trebuie transportate apoi la laborator în cutii izolate. Dacă durata transportului este de așa natură încât să existe riscul decongelării probelor, ar trebui utilizată gheața uscată (zăpadă cu dioxid de carbon) sau, eventual, elementele de răcire.

În cazul transportării produselor uscate sau conservelor, de obicei, răcirea nu este necesară. Cu toate acestea, temperatura nu trebuie să depășească 25°C, iar probele trebuie protejate împotriva umidității ridicate.

DEPOZITAREA ȘI PRETRATAREA PROBELOR ÎN LABORATOR

În cursul prelevării probelor și pregătirii probelor de laborator, ar trebui luate măsuri de precauție pentru a evita orice modificare, care ar putea afecta conținutul, influența negativ determinarea analitică sau ar putea face probele nereprezentative.

✓ Înregistrarea probelor la laborator. La sosirea la laborator, trebuie verificate următoarele: ☐ dacă probele sunt însoțite de un raport de prelevare a probelor (notă de livrare) care conține informațiile necesare ☐ eticheta probei este conformă cu raportul; dacă nu, probele trebuie aruncate ☐ dacă probele au fost transportate corect (dacă este necesar, să se verifice temperatura) ☐ dacă recipientele de probă sunt intacte.

Laboratorul trebuie să dispună de o procedură standard în formă scrisă pentru verificarea și respingerea probelor.

În cazul în care probele sosesc la laborator după expirarea perioadei specificate de la prelevarea probelor și este prea târziu pentru a fi examinate (se aplică îndeosebi în cazul analizei microbiologice) sau în cazul în care temperatura probei este prea mare sau în cazul în care probele (ambalajul sau pachetul) sunt deteriorate sau contaminate în timpul transportării, trebuie luată în considerare respingerea probelor. Cu toate acestea, dacă aceste probe sunt analizate, deficiențele observate trebuie întotdeauna înregistrate și menționate în raportul de analiză. Trebuie examinate întotdeauna probele de alimente suspectate de a fi cauzat boli, chiar dacă nu au fost observate deficiențe în timpul transportării. Dacă scopul analizei este diferit de controlul calității, cum ar fi analiza contractată în legătură cu cercetarea și dezvoltarea, analiza probelor deteriorate sau atipice nu prezintă nici un interes. Motivele etice indică de asemenea faptul că analiza senzorială, în cazul în care este inclusă gustarea probelor, nu ar trebui efectuată pe probe potențial otrăvite.

✓ Pregătirea probelor de laborator. După prelevarea principală a probelor, laboratorul primește fie o probă compozită, fie un singur increment și, în cazul în care prelevarea probelor a fost efectuată corect, proba reprezintă lotul. Proba poate consta din câteva grame până la multe kilograme. Laboratorul ar trebui să analizeze întreaga probă, dar, în majoritatea situațiilor, în cazul cantităților mici de probă, laboratorul va trebui să reducă dimensiunea probei. Pentru analiză sunt necesare adesea doar câteva miligrame sau grame. De obicei, laboratorul va furniza rezultatele analitice cu o incertitudine de măsurare cu un interval de încredere de 95%, de asemenea deoarece acest lucru este cerut de către organismele de acreditare. Măsurarea ar trebui să includă incertitudinea legată de reducerea probei de laborator/prelevarea incrementelor

(eșantionarea secundară). Această contribuție la incertitudine ar putea fi adesea mai mare decât contribuția analizată. Un laborator ar trebui să depună întotdeauna eforturi pentru a se asigura că incertitudinea rezultatelor este cât mai scăzută posibil și, prin urmare, ar trebui să dispună de proceduri și echipamente bine descrise și adecvate pentru reducerea și retragerea subprobelor. Multe tipuri de probe (cereale, alimente uscate și pudră) pot fi reduse în mod avantajos prin utilizarea unui dispozitiv comercial de separare a probelor.

Prin utilizarea unui astfel de separator, o probă poate fi împărțită într-o serie de porțiuni cu o compoziție foarte uniformă, care ar putea fi, de asemenea, documentată statistic. Dacă probele nu pot fi împărțite cu ajutorul echipamentului, din cauza particulelor prea mari, înainte de divizare ar trebui să fie luată în considerare separarea probelor.

Metoda sfeturilor pentru reducerea dimensiunii probei este utilizată în mod obișnuit. Toată proba compozită este omogenizată (dacă este posibil) și apoi divizată în 4 bucăți/părți. Sfeturile opuse sunt apoi combinate și divizate din nou în 4, până la obținerea dimensiunii dorite a probei de laborator;

După reducerea probei de laborator, volumul probei este de obicei de peste zece ori mai mare decât volumul necesar pentru analiză. Proba redusă este adesea eterogenă, deși pare omogenă. Prin urmare, proba trebuie să fie mărunțită sau, de exemplu, suspendată în suspensie înainte de prelevarea uneia sau mai multor probe, care sunt apoi analizate individual sau ca probă compozită.

În cazul probelor de alimente solide și lichide, sunt necesare proceduri speciale pentru divizarea și prelevarea subprobelor. Adesea, în acest scop sunt disponibile metode specifice industriei și acestea sunt descrise în standarde (de exemplu, produse lactate, standardele ISO/IDF). Brânzeturile tari au o compoziție foarte eterogenă de la suprafață la centru. Prin urmare, probele reprezentative din punct de vedere geometric ar trebui retrase, iar proba de brânză ar trebui apoi grătată înainte de analiză, de exemplu, pentru analiza grăsimilor și proteinelor.

Sfeturile care se opun urmează să fie îndepărtate.

Analiza materiilor prime de pește reprezintă un alt domeniu complex. Analiza fileurilor de pește pentru determinarea, de exemplu, a grăsimilor și a apei se realizează de obicei după omogenizare într-un procesor alimentară. Atunci când carnea tocată de pește pare uniformă, subprobele sunt preluate pentru analiză. Testele au arătat că carnea tocată este eterogenă chiar și după omogenizare într-un procesor alimentară și că incertitudinea de măsurare combinată poate fi influențată statistic de acest lucru [cf. Prelevarea probelor de laborator pentru analiza chimică].

Modul de prelevare a probelor poate avea o influență directă asupra rezultatelor și, prin urmare, poate fi necesară adoptarea unor măsuri extraordinare pentru protejarea probei. Multe vitamine se degradează dacă eșantionul nu este protejat de lumină cu filtre UC pe geamuri și dispozitive speciale de iluminare. Procesele de măcinare pot scoate apa din probe și, de exemplu, în analiza furajelor, în rezultatul analitic final este inclusă o corecție pentru pierderea apei.

Optimizarea sub-prelevării probelor se poate baza pe o evidență a incertitudinii analitice divizată după tipurile de probe. În cazul în care laboratorul înregistrează rezultatele determinărilor duble pentru diferite matrici, analiza datelor ar putea indica matricile care furnizează cea mai mare răspândire/variație. Laboratorul poate apoi lucra pentru o îmbunătățire direcționată. Adesea, rezultatul este că o evaluare vizuală dă un sentiment fals de securitate; probele care par omogene ar putea fi extrem de eterogene. În special pentru unii analiști, cum ar fi vitaminele și mineralele, aceasta poate fi o provocare.

Pentru evaluările senzoriale ale produselor, natura produsului determină modul în care vor fi transmise probele. Modelul statistic este, de asemenea, important; în cazul în care modelul statistic este stabilit, este de așteptat să fie urmat un anumit program, în alte cazuri dorințele practice sau restricțiile stabilite. La evaluarea morcovilor, de exemplu, există mai multe opțiuni: 1) Fiecare evaluator servește unul sau mai mulți morcovi a. Evaluatorul efectuează o evaluare medie dacă mai mulți morcovi sunt serviți simultan b. Evaluatorul evaluează fiecare morcov separat 2) Toți morcovii dintr-o probă (reprezentând specia, locația de creștere, starea de depozitare sau alți factori) sunt tăiați în cuburi. Fiecare evaluator primește numărul de probe servite (de obicei 50-100 g) sau replicile senzoriale impuse de modelul static. 3) Un morcov este împărțit în funcție de numărul evaluatorilor din comisie. Un posibil dezavantaj este faptul că gustul unui morcov depinde dacă partea evaluată este aproape de partea superioară sau aproape de vârf. a. Evaluatorii primesc părțile atribuite aleatoriu din morcov. b. Fiecare evaluator primește mereu aceeași parte a morcovului.

Opțiunea 3 poate părea oarecum anormală, în parte deoarece presupune că anumiți morcovi sunt mari și/sau sunt foarte puțini evaluatori. Cu toate acestea, 3b se utilizează adesea pe fileuri mari și pe mostre similare. Considerațiile practice cu privire la codificare și servire joacă, de asemenea, un anumit rol: de obicei, nu este posibil să se pregătească proba în prealabil și ca aceasta să se analizeze, adică să se servească

evaluatoarea atunci când este necesar pentru șefii de laborator. În special la prepararea (de obicei încălzirea) probelor poate prezenta provocări practice predispuse.

✓ Depozitarea probelor înainte și după examinare. Atunci când probele sunt depozitate în laborator, acestea trebuie protejate împotriva schimbărilor provocate de factori chimici, fizici sau mecanici.

Laboratorul ar trebui să aibă suficiente instalații de depozitare la rece pentru a păstra probe/reziduurile de probe, dar acestea nu ar trebui să fie depozitate împreună cu mediile microbiologice, reactivii etc. În momentul depozitării probelor într-un frigider sau congelator înainte sau după transportare, temperatura frigiderului trebuie să fie între 1°C și 5°C, iar temperatura congelatorului de -15°C sau mai rece.

Probele care urmează să fie depozitate în laborator pentru o anumită perioadă de timp înainte de examinare, de exemplu în legătură cu studiile de stabilitate, trebuie depozitate în conformitate cu instrucțiunile de depozitare de pe ambalaj. Temperaturile acestor instalații de depozitare trebuie controlată cu aceeași atenție ca și pentru alte instalații.

Probele de alimente uscate sau conservate pot fi depozitate la temperatura camerei.

Reziduurile unei probe trebuie depozitate în același mod ca și proba inițială (duplicata), pentru o anumită perioadă de timp, în conformitate cu sistemul de asigurare a calității în laborator. Condițiile de depozitare trebuie evaluate pentru fiecare probă individuală. Probele de alimente perisabile trebuie refrigerate/congelate.

✓ Pretratarea probelor pentru examinare microbiologică. Pretratarea probelor pentru examinări microbiologice trebuie efectuată în conformitate cu NMKL 91, 6. Ed., 2010: Pregătirea probei de testare și suspendarea inițială a alimentelor și a hranei pentru animale în vederea examinării microbiologice cantitative. Pentru produsele care formează grămezi sau gel solid, poate fi necesară o diluare mai mare decât 1:10, care este cea mai frecventă diluare.

Alimentele congelate trebuie decongelate la o temperatură maximă de +4°C în decurs de 18 ore. Probele mai mici, dezghețate cu ușurință, pot fi plasate într-un dulap termostatic la o temperatură maximă de 37°C, timp de până la 15 minute.

Pentru omogenizare pot fi utilizate diferite tipuri de echipamente. Un omogenizator de tip Stomacher este preferabil, deoarece este mai ușor de utilizat decât alte echipamente similare. Cu toate acestea, nu este adecvat pentru omogenizarea alimentelor care conțin particule dure și care pot penetra pungile de plastic. Pungile de plastic sterile și non-sterile, cu și fără filtre, sunt disponibile pe piață pentru a fi utilizate în omogenizatorii Stomacher. Fiecare caz trebuie evaluat individual. Timpul de omogenizare trebuie fixat și nu trebuie să fie permis să varieze de la o probă la alta; treizeci de secunde sunt adecvate pentru majoritatea alimentelor. Este recomandabil să se utilizeze un cronometru electronic care să oprească omogenizarea după timpul stabilit.

INTERPRETAREA REZULTATELOR ANALITICE

Există întotdeauna incertitudini legate de rezultatele analitice. Incertitudinea analizei poate fi inclusă în rezultat, însă incertitudinea legată de prelevarea probelor este rareori menționată. Această discrepanță există, în pofida faptului că incertitudinea legată de prelevarea probelor este probabil mult mai mare în comparație cu incertitudinea obținută în urma analizei. Cu toate acestea, estimarea incertitudinii prelevării probelor este mai cuprinzătoare și mai complicată.

În microbiologie, destinatarul rezultatelor este cel care, cel mai adesea, analizează rezultatele, și nu orice laborator extern, cu excepția cazului în care se ajunge la un acord în acest sens. Multe măsurări microbiologice fac parte din supraveghere (de exemplu, controlul calității) și, adesea, nu există limite specificate. Regulamentul UE privind criteriile microbiologice (CE 2073/2005) prevede limite specificate pentru câțiva agenți patogeni și pentru câteva organisme de igienă și indicatoare.

Incertitudinea de măsurare (IM) în urma prelevării probelor va fi, în general, mai mare decât incertitudinea legată de analiză. Pe lângă IM din analiză și prelevarea probelor, eterogenitatea și eroarea sistematică din eșantionare vor contribui la totalul IM. Cifra de mai jos ilustrează factorii care contribuie la incertitudine în luarea deciziilor.

3.2 Matrici și tehnologii aplicate

3.2.1 Produse agroalimentare

3.2.1.1 Produse din carne

Domeniul de aplicare

În acest document sunt descrise metodele de prelevare a probelor, de depozitare și transportare, care se aplică cărnii și produselor din carne, inclusiv cărnii și produselor din carne de pasăre.

Metodele de prelevare a probelor. Cerințe generale

Prelevarea probelor se efectuează de către un specialist autorizat de părțile interesate și instruit corespunzător în domeniul relevant. Acesta trebuie să acționeze independent și să nu permită intervenția unui terț, sub responsabilitatea sa s-ar putea folosi de ajutorul altora. Specialistul responsabil de prelevare și asistenții acestuia ar trebui să ia măsurile adecvate pentru a preveni contaminarea livrării sau a lotului și a probelor prelevate (de exemplu, se spală pe mâini înainte de prelevare).

La probele trimise laboratorului trebuie anexat un document de însoțire (de exemplu, un raport, un protocol sau un act) semnat de un specialist responsabil de prelevare și de reprezentanții părților interesate, dacă este cazul.

Documentul de însoțire trebuie să conțină următoarele informații de bază:

- numele și adresa specialistului responsabil de prelevare;
- numele și adresele reprezentanților părților interesate (atunci când sunt prezenți);
- amplasarea, data și ora prelevării probelor;
- tipul și sursa (originea) livrării sau lotului;
- numărul și unitățile de produse care constituie livrarea sau lotul;
- marcajul (denumirea) și numărul lotului;
- identificarea trenurilor, camioanelor sau vaselor utilizate;
- denumirea punctului de transport;
- denumirea destinației mărfurilor;
- data sosirii livrării sau lotului;
- denumirea și adresa vânzătorului (producătorului);
- numele și adresa cumpărătorului;
- numărul și data facturii sau contractului;
- metoda de prelevare a probelor;
- numărul probelor prelevate din fiecare lot;
- denumirea (numele) mostrelor prelevate;
- numărul și etichetarea lotului(rilor) din care au fost prelevate probele;
- masa probelor individuale;
- denumirea organizațiilor (de exemplu, laborator, centru) în care sunt trimise probele selectate.

Documentul însoțitor ar trebui să indice, de asemenea, toți factorii care pot afecta prelevarea probelor, cum ar fi condițiile de ambalare și condițiile de mediu (temperatura și umiditatea), temperatura produsului și anumite tipuri de probe, metodele de sterilizare a instrumentelor și containerelor utilizate pentru prelevare, precum și orice alte informații speciale referitoare la materialele din care sunt prelevate probele.

În măsura posibilităților, ar trebui să se furnizeze o probă reprezentanților părților interesate.

Fiecare mostră trimisă la laborator trebuie izolată (sigilată) și etichetată. Sigilarea trebuie efectuată astfel încât accesul la conținut sau etichetă să fie deschis numai atunci când sigiliul este distrus.

Etichetele trebuie să aibă o calitate și o dimensiune adecvată pentru utilizarea preconizată (de exemplu, o placă ușor colorată, rezistentă la praf, rezistentă la apă, cu o gaură ranforsată). Marcarea trebuie să fie de neșters și să nu poată fi ștearsă și să conțină informațiile necesare identificării probelor individuale:

- tipul și sursa (originea) livrării sau lotului(rilor);
- numărul și unitățile de produse care reprezintă livrarea sau lotul(rile);
- localizarea, data prelevării probelor;
- numele vânzătorului (producătorului) și cumpărătorului;
- numărul și etichetarea lotului(rilor) din care au fost prelevate probe unice;
- temperatura aerului înconjurător în momentul prelevării probelor.

Cerințe privind echipamentele și recipientele utilizate pentru prelevarea probelor.

Cerințe generale

Materialele folosite la fabricarea recipientelor aflate în contact direct cu probele trebuie să fie rezistente la apă și grăsimi, insolubile și non-absorbante.

Capacitatea și forma recipientului pentru prelevare trebuie să corespundă dimensiunii unei singure probe care urmează să fie prelevată și închisă sigur, de exemplu atunci când se utilizează sticle, conserve cu cauciuc, dopuri din plastic, dopuri din plută, capace din metal sau din plastic cu șuruburi. Înainte de sigilare,

capacul trebuie acoperit cu un strat subțire din material inert. Capacele filetate trebuie să aibă o garnitură de sigilare din material inert.

Materialele și echipamentele nu ar trebui să afecteze rezultatele cercetării. Dacă este necesar, expunerea la lumină și/sau oxigen trebuie redusă la minim.

Cerințe privind echipamentele și ambalajele utilizate pentru prelevarea probelor pentru analiza chimică

Echipamentele și recipientele de prelevare a probelor trebuie să fie uscate și curate și nu trebuie să afecteze compoziția chimică a produsului.

Cerințe privind echipamentele și ambalajele utilizate pentru prelevarea probelor destinate analizei senzoriale (organoleptice)

Echipamentele și recipientele de prelevare a probelor trebuie să fie uscate și curate și nu trebuie să confere nici un gust sau miros produsului.

Cerințe privind echipamentele și recipientele utilizate pentru prelevarea probelor destinate analizei microbiologice și pentru alte scopuri (de exemplu, pentru teste biologice, parazitologice, serologice, histologice, toxicologice sau pentru determinarea menținerii produselor prin metoda de control a temperaturii)

Echipamentele și recipientele de prelevare a probelor trebuie să fie curate, sterile și să nu afecteze microflora alimentelor.

Dacă este necesar, echipamentele și recipientele de prelevare a probelor sunt sterilizate într-unul dintre următoarele moduri:

1. sterilizare umedă - cel puțin 20 de minute la o temperatură de minim 121°C;
2. sterilizare uscată - nu mai puțin de 1 oră la o temperatură de minim 170°C într-un dulap de uscare cu circulație forțată a aerului pentru a menține o temperatură adecvată în dulap sau aerul cald în sterilizatorul fără circulație forțată a aerului la o temperatură de 180 până la 185°C timp de 15 minute sau la o temperatură de 160 până la 165°C timp de 120 minute.

Manipularea uneltelor este permisă prin imersie în alcool etilic cu flacără ulterioară.

În cazul în care utilizarea acestor metode este imposibilă, precum și în cazul în care echipamentele sau ambalajele ar trebui utilizate imediat după sterilizare, se poate aplica una dintre următoarele metode:

1. expunerea la abur pentru 1 oră la 100°C;
2. imersiunea în etanol de 96% urmată de flacără până la arderea completă a etanolului;
3. tratarea tuturor suprafețelor de lucru cu o flacără de gaz de hidrocarburi (propan sau butan);

Numărul probelor prelevate

Numărul probelor care trebuie prelevate pentru a obține o probă primară reprezentativă a livrării sau lotului (loturilor) trebuie să respecte metodele standard de prelevare a probelor pentru un anumit tip de produs specificat în contract sau în alt acord încheiat între părțile în cauză.

Pentru diferite tipuri de studii (analiză chimică, microbiologică, fizică sau senzorială), prelevarea probelor se efectuează separat pentru fiecare tip.

Metodele de prelevare a probelor

Clasificarea cărnii și a produselor din carne pentru prelevarea probelor

Pentru a determina metoda de prelevare a probelor, carnea și produsele din carne sunt clasificate după tipul:

A - livrarea sau lotul de carne și produse din carne, produse sub formă de produse unice sau ambalaje individuale de produse de orice masă (de exemplu, cârnați, crenvurști; produse semifabricate, carne tocată, ambalată în vid; cârnați, feliați; șuncă fiartă în conserve) sau sub formă de bucăți din carne sau carcase (părți din carcase) care nu depășesc 2 kg în masă;

B - carcase, părți din carcase, carne, sărate, uscate sau alte metode de conservare, în bucăți de peste 2 kg în greutate (de exemplu șuncă tăiată, jumătate de bacon, carne proaspătă sau congelată tranșată, carne dezosată proaspătă sau congelată, carcasă sau sfert de vită, jumătate de carcasă de porc, carcasă de miel, carcasă de pasăre, venison) și carne obținută prin metoda de separare sau de deshidratare a cărnii.

În funcție de calitatea masei și a comerțului produselor, poate fi necesară prelevarea probelor secundare folosind numai o porțiune (părți) din fiecare probă primară, luând în considerare tipurile de studii pentru care sunt prelevate.

Prelevarea probelor din carne sau produse din carne de tip A

Deoarece proba principală preia o parte sau o parte întreagă a produsului, în conformitate cu metodele standard de prelevare a probelor pentru tipul specific de produs, se prelevează numărul necesar de probe primare din fiecare lot.

Prelevarea probelor din carne și produse din carne de tip B specificate

În conformitate cu metodele standard de prelevare a probelor pentru un anumit tip de produs, numărul necesar de probe primare este prelevat din fiecare lot și ambalat fie pentru selectarea suplimentară a probelor secundare destinate controlului distructiv din laborator (de exemplu, pentru cercetări chimice sau microbiologice), fie pentru teste nedistructive (de exemplu, inspecții vizuale, analize organoleptice, cercetări microbiologice cu ajutorul unui tampon).

Nici o probă prelevată dintr-o carcasă sau dintr-o altă bucată mare de carne nu poate fi reprezentativ pentru produsul în ansamblu, însă este aproape imposibil să se efectueze cercetări asupra unei carcase întregi sau a unei bucăți mari de carne. Prin urmare, pentru prelevarea probelor primare sau secundare, în funcție de scopul acestora, trebuie selectată una dintre următoarele metode de prelevare a probelor.

Prelevarea probelor se realizează în general în următoarele moduri:

- a) probe unice de la suprafață (de exemplu, pentru a detecta bacteriile grupului *Escherichia coli* sau *Salmonellae*) se selectează prin ștergerea întregii suprafețe a produsului (sau a zonelor selectate) cu tampoane umede mari sau (pentru studii microbiologice cantitative) prin utilizarea modelului (creion) zonelor din care se prelevează proba sau, în cazul cărnii congelate, prin răzuirea de pe suprafață;
- b) dintr-o probă primară cu o masă de la 500 până la 1000 g prelevată pentru examinarea chimică sau microbiologică, se prelevează o probă secundară de pe marginea suprafeței secțiunii proaspete, provocând daune minime țesutului;
- c) o probă de mușchi pentru examinarea microbiologică (de exemplu, pentru a determina cauzele deteriorării osului - bronzului osos) se prelevează din partea afectată a carcasei utilizând un instrument din oțel inoxidabil pentru disecționarea mușchiului și din carnea congelată utilizând un grătar;
- d) probe unice de grăsime (de exemplu, pentru determinarea conținutului de substanțe solubile în grăsimi, cum ar fi pesticide) se prelevează, dacă este posibil, din grăsimile renale de origine animală sau din grăsimile interne de la păsări;
- e) probe unice de suc de separare (de exemplu, de carnea congelată ambalată în vid) se prelevează aseptice cu seringi și/sau recipiente sterile și conservele de folie sau după deschiderea ambalajului. În cazul în care carnea este returnată în lot, acest lucru trebuie făcut după dezambalarea în vid.

Temperatura

Dacă este posibil, se înregistrează temperatura fiecărui lot selectat.

Ambalarea probei

Carne sau produse din carne de tip A

În cazul în care fiecare probă individuală se află într-un recipient etanș, nu este necesară o ambalare suplimentară. Pentru alte tipuri de produse, este necesar să se pună fiecare probă în recipientul corespunzător, să se închidă, să se izoleze și să se eticheteze.

Carne sau produse din carne de tip B

Fiecare probă este ambalată într-o pungă cu material polimeric corespunzător, închisă cu grijă, izolată și etichetată.

Tampoanele microbiologice sunt plasate în recipiente sterile, iar mostrele de suc de separare sunt plasate în recipiente sau sticle sterile.

Notă - Dacă este posibil să se ambaleze diferite probe individuale împreună într-unul sau mai multe recipiente, atunci nu este necesar să se izoleze și să se eticheteze fiecare probă la îndeplinirea cerințelor pentru izolarea și etichetarea acestor recipiente.

Transportarea și depozitarea probelor selectate

Probele selectate sunt trimise la laborator imediat după prelevare, iar temperatura probei trebuie să corespundă temperaturii de depozitare a produsului; în cazul alimentelor frigorifice, mostrele sunt transportate:

- a) la o temperatură de la 0 până la 2°C, dacă studiul se efectuează în 24 de ore;
- b) la o temperatură nu mai mare de minus 24°C, dacă studiul va fi efectuat după mai mult de 24 de ore; probele pentru analiza fizică sau senzorială (organoleptică), în general, nu ar trebui congelate.

În timpul transportării este necesar să se ia măsuri de precauție împotriva expunerii la lumina directă a soarelui pe probele selectate. Probele trebuie livrate la laborator în condiții intacte, fără a compromite integritatea ambalajului și izolarea (sigiliile).

3.2.1.2 Fructe de mare și pește

Organizarea lucrului unui laborator industrial

Rolul principal în asigurarea unei producții de înaltă calitate de către întreprinderi aparține departamentelor de control tehnic și laboratoarelor industriale.

Activitatea QCD și a laboratoarelor industriale pentru îmbunătățirea calității produselor ar trebui să se desfășoare simultan în mai multe moduri.

Zona principală include funcții de control și analitice ale laboratorului industrial. QCD și laboratorul industrial controlează producția în ordinea următoare:

- 1) Controlează calitatea materiilor prime;
- 2) Controlează acuratețea procesului tehnologic în conformitate cu instrucțiunile tehnologice pentru a îmbunătăți calitatea produselor și a reduce pierderile de producție;
- 3) Identifică cauzele deficitului și scăderii calității produselor piscicole și elaborarea măsurilor de eliminare a acestora;
- 4) Verifică calitatea materialelor auxiliare pentru a preveni utilizarea în producția de materiale toxice, ceea ce poate duce la scăderea calității produselor sau la creșterea pierderilor. Verifică calitatea tarei și a materialelor de ambalare pentru a asigura conservarea mărfurilor în timpul transportului și depozitării în rețeaua comercială;
- 5) Verifică consumul de materii prime pentru fiecare unitate de producție, consumul de materiale și ambalaje pentru a reduce pierderile de producție și pentru a reduce costul de producție;
- 6) Controlează calitatea produsului finit pentru a asigura producția de produse de calitate superioară. Toate tipurile de produse fabricate în întreprindere pot fi livrate consumatorului numai după acceptarea calității QCD sau a laboratorului.

Termeni și definiții

Lotul este cantitatea de mărfuri de calitate și denumire uniformă, produse într-un anumit interval de timp în aceleași condiții, destinate importului/exportului, întocmit printr-un document care atestă calitatea și printr-o singură declarație vamală.

Prelevarea probelor este numărul de articole care urmează să fie selectate din numărul total de articole pentru inspecție.

Volumul probei este cantitatea de bunuri selectate din fiecare lot.

Specimenul este o unitate separată a obiectului (produsului) de studiu.

Probă este cantitatea unui articol neparcial sau a unei părți dintr-un specimen selectat din lotul examinat, identic cu compoziția și caracteristicile lotului.

Proba fracționată este o probă selectată din producție într-un singur pas. Caracterizează calitatea mărfurilor dintr-o instalație sau recipient, ori la un anumit nivel al unui rezervor sau vehicul.

Proba consolidată este o probă alcătuită din probe mixte fracționate, selectate în ordinea corespunzătoare și combinate în raportul specificat, caracterizate de valorile medii ale caracteristicilor mărfurilor.

Proba analitică este o parte dintr-o probă consolidată utilizată pentru teste de laborator.

Proba de control este o parte dintr-o probă consolidată stocată în laborator timp de două luni și utilizată pentru studii de arbitraj.

Proba de arbitraj este o parte dintr-o probă consolidată de fixare care este stocată de persoana care a trimis proba pentru cercetare sau de organizația de cercetare. Aceasta este utilizată pentru proceduri de arbitraj în caz de dezacord sau de apel împotriva deciziei luate de organizația de cercetare.

Procedura de prelevare a probelor

Peștii vii, amorțiți, refrigerați sau sărați vin în loturi mari în vase de primire și transport la fabrica de prelucrare. Acesta este deja sortat după rase, mărimi și prospețime. Cu toate acestea, există momente în care pescuitul la fața locului nu este posibil, iar peștele vine la uzină amestecat în rase și dimensiuni și câteodată în calitate.

Informațiile privind timpul (data), locul, uneltele și caracterul pescuitului, precum și termenii și condițiile de transport joacă un rol foarte important în calitatea peștelui crud. Aceste informații pot face precizări clare atunci când se recunosc cauzele defecțiunilor din materia primă.

Peștele viu este livrat în sloturi la fabricile de pește fără nici o îndoială în privința prospețimii. Pentru a determina alte caracteristici (dimensiunea, obezitatea, starea investiției), proba este prelevată din peștii vii în așa fel încât: speciemenle individuale de pești să fie prinse de o plasă în diferite locuri, după care să fie supuse analizei vizuale. În cazul în care există pește amorțit acesta este separat de cel viu.

Prelevarea probelor de pește proaspăt, refrigerat sau sărat livrat la fabrica de pește de către navele de pescuit, de primire sau de transport este un proces mai complex. Dimensiunea probei inițiale pentru determinarea calității peștelui depinde de cantitatea de pește de pe navă, precum și de gradul de uniformitate al acestuia, însă nu trebuie să depășească 1-2c.

Prelevarea probelor este complicată de posibila eterogenitate a peștilor după calitate în diferite straturi ale aceleiași lăzi sau secții. Prin urmare, în cazul în care este posibil, după o analiză vizuală preliminară a tuturor peștilor și a anumitor speciemenle, selectarea probei inițiale se face în trei etape: la începutul descărcării lăzii sau a secției, după descărcarea unei jumătăți din tot peștele și, în sfârșit, din ultimul sfert. Pentru o mai bună caracterizare a calității peștelui, fiecare descărcare este constituită din mai multe descărcări separate. Descărcările sunt reunite, formând astfel proba inițială pentru întregul lot.

După determinarea greutății totale a probei inițiale, peștele se disectează după rasă, dimensiune și calitate în târgi separate.

În selectarea probei pentru testele de laborator se întâmpină dificultăți și mai mari, deoarece, având o greutate minimă, aceasta trebuie să caracterizeze suficient lotul de pești cu prisme organoleptice și este superfluent cu prospețimea aparentă sau alterarea peștilor.

La selectarea probelor de laborator pot fi prezentate următoarele două cazuri.

1. Proba originală după prospețime este omogenă extern și, prin urmare, orice speciimen unic de pește va caracteriza suficient întregul lot. Cu toate acestea, se recomandă utilizarea a cel puțin trei până la cinci speciemenle, în funcție de dimensiunea peștilor. Peștii mici, cum ar fi șprotul, colțarii, anșoa, salacele etc., sunt selectați după greutate în proporție de cel puțin 500 g. Exemplarele selectate sunt prezentate imediat pentru cercetare, iar rezultatele testelor se referă la lot ca un tot întreg.
2. Proba originală este un amestec de pește cu prospețime diferită. În acest caz, trebuie să sortați proba originală după caracteristicile externe. După cântărirea din fiecare parte a probei originale, constând din pește omogen, proba medie este prelevată pentru cercetări de laborator în același mod ca pentru un lot omogen. Cunoscând proporțiile de greutate ale anumitor categorii din proba originală, rezultatele studiului pot fi atribuite unei părți de greutate foarte specifice a acestui lot. Filiala Astrakhan din VNIRO (Institutul Federal de Cercetare a Pescuitului și Oceanografiei din Rusia, 2) recomandă următoarele metode practice de prelevare a probelor de pește care sunt livrate la fabrică în formă sărată.
3. Pentru a determina calitatea peștilor din fiecare ladă a vasului de transport, se fac 25-30 de descărcări. Greutatea fiecărei descărcări trebuie să fie: a) pentru heringul nedezasamblat – aproximativ 5 kg, b) pentru heringul de dimensiuni mici, hering Caspic, vobla – de la 2,5 până la 3,0 kg. Proba originală selectată (suma tuturor recenselor) este sortată în funcție de caracteristicile externe, iar rezultatul obținut este atribuit întregii perechi. În cazul în care nu este necesară determinarea gradului, ci doar detectarea salinității medii a peștilor și loturilor, se utilizează următoarea metodă de prelevare a probelor din cutiile navelot de transport.

150-200 de speciemenle de pești de dimensiune predominantă sunt selectate din diferite locuri din fiecare piept. Peștele selectat este sortat prin consistență în trei categorii: a) dur, b) mediu și c) moale. Proporțional cu greutatea sa, din fiecare categorie se selectează cantitatea corespunzătoare de pește pentru compilarea probei medii pentru cercetarea chimică.

Principalele probleme de expertiză

Analiza chimică dă rezultate practice reușite doar dacă proba pentru studiu are o compoziție tipică întregului lot.

Numărul probelor prelevate pentru analiză se determină în prealabil, în conformitate cu cerințele documentelor de reglementare relevante. Specialistul responsabil de prelevarea probelor trebuie să ia cel puțin numărul minim de bunuri necesare pentru testele de laborator. În cazul unui recipient închis strâns și

care conține ambalaje pentru vânzarea cu amănuntul, cel mai mic pachet poate fi considerat, de obicei, un eșantion adecvat pentru cercetare.

Proba supusă studiului ar trebui să caracterizeze proprietățile tipice ale produselor întregului lot, astfel încât metoda de obținere a acestora să fie importantă. Majoritatea materialelor nelichide și anumite materiale lichide pot fi eterogene, astfel că trebuie să munciți din greu pentru a obține o probă adecvată dintr-un lot foarte mare. În cazurile în care lotul din care este prelevată proba este mare, se prelevează porțiuni mici din probă din diferite locuri ale lotului, astfel încât acestea să poată fi combinate într-un eșantion ușor de prelucrat având o compoziție medie ca întregul lot. În cazul în care responsabilul de prelevarea probelor nu are capacitatea tehnică de a amesteca porțiunile probei sau nu poate determina dacă aceste porțiuni sunt omogene sau nu, el trebuie să trimită separat fiecare parte a probei.

Probele lichide depozitate în borcane sau butoaie metalice trebuie luate după agitare, amestecare sau scuturare suficientă, deoarece acestea nu sunt întotdeauna omogene. Pulberea, particulele sau speciunile de nămol ambalate în tară trebuie colectate dintr-o porțiune care nu vine în contact direct cu aerul. În mod tipic, aceste mostre trebuie prelevate din mai mult de două recipiente separate. Cu toate acestea, regula dată nu se aplică produselor omogene, cum ar fi produsele conservate sau sticlele.

Probele, cum ar fi produsele petroliere sau melasele depozitate într-un rezervor sau în cisternă, trebuie prelevate din fiecare dintre cele trei straturi (de sus, de mijloc și de jos) după umplerea și stabilizarea rezervorului sau a cisternei.

Pentru a preveni sau a minimiza contaminarea, trebuie să aveți grijă de aplicarea metodelor de prelevare a probelor, a dispozitivelor de prelevare a probelor și a recipientelor de probă (de exemplu, din polietilenă sau din polipropilenă cu capota dublă a flaconului, una dintre ele fiind capota flaconului cu șuruburi pentru a evita pierderea sau contaminarea conținutului). Se recomandă prelevarea rapidă pentru probele sensibile la atmosferă (umiditate, dioxid de carbon etc.). utilizați întotdeauna o probă și un recipient curat și uscat. În special, recipientele negre sunt utilizate pentru probe sensibile la lumina soarelui.

După prelevarea probei, trebuie luate măsuri stricte de precauție pentru a evita schimbarea sau manipularea probelor. Aceste măsuri pot include acțiunea de sigilare a containerului sau sigilarea acestuia cu sigiliu oficial. Fiecare probă trebuie etichetată imediat, indicând denumirea, numărul și data eșantionării pentru a exclude complet posibilitatea confuziei în determinarea probelor și rezultatele examinării acestora.

Etichetele se fixează pe probe astfel încât acestea să nu fie smulse sau deteriorate atunci când specimenul este deschis pentru examinare și pentru dezlipirea sigiliului, deoarece, în timpul experienței, eticheta de identificare trebuie să rămână intactă.

Trebuie realizată manipularea atentă a speciunelor inflamabile, explozibile, toxice, corozive sau otrăvitoare, iar ambalajele cu asemenea speciune trebuie să aibă un marcaj special precum „Periculos”.

În cazul produselor perisabile, proba trebuie marcată în mod clar ca „produs perisabil” și transportată la o temperatură între 0 - 5 °C și cel mult timp de 2 ore trebuie să fie trimisă birourilor vamale specializate, în cazul acestor produse pentru care sunt stipulate condițiile speciale de transport în documentația de reglementare și tehnică.

Tabloul 1 – Metode de prelevare a probelor și dimensiunea probelor de pește, mamifere marine, marine nevertebrate și produse rezultate din prelucrarea lor

Denumirea produsului	Vehicul, container	Dispozitiv de prelevare a probelor	Dimensiunea probei fracționate	Cantitatea probei consolidate
Produs brut (pește și nevertebrate), viu, refrigerat, congelat, pește tocat, sărat, condimentat, marinat, batog, pește uscat și afumat la soare, balăc sărat, produse semifinite, batog și produse din balăc afumat, paste, produse solubile de pește condensat, concentrate,	Rezervoare, butoaie, blocuri, boxe	Plasă pentru pești vii, cuțit inoxidabil	Din diferite locuri ale containerului de transport, se iau trei probe fracționate (un specimen sau o parte dintr-un specimen, un bloc de pește, fileu, cârnaț de pește; mai multe speciune sau o mână de pești mici (sparing, șprot) sau o	1,0/1,0 kg dar nu mai puțin de 1 unitate/1 unitate. pentru vânzarea cu amănuntul

viziga, alimente și deșeuri furajere			parte a produsului). De blocurile înghețate separați două bucăți opuse diagonal, de până la 0,1 kg fiecare, și de la mijloc - benzile de până la 0,2 kg. 1 sau 2 unități de ambalaj de consum sunt selectate din fiecare container de transport.	
În stare congelată: carne, peritoneu și alte produse (inclusiv ficat) provenite de la mamifere marine, ficat de pește	Blocuri, piese	cuțit inoxidabil	trei probe fracționate de maxim 0,3 kg fiecare sunt prelevate din diferite locuri ale blocului sau bucăți după dezghețare.	1,0/1,0 kg dar nu mai puțin de 1 unitate/1 unitate. pentru vânzarea cu amănuntul
Grăsimi de pește și mamifere marine, ulei de spermacetate;	Butoaie, conserve, cilindri sau butoaie, butelii de sticlă	Sifon, tub din sticlă sau eșantionator tubular, robinet eșantionator, eșantionator de zonă	o probă nu mai mare de 2,0 dm ³ se prelevează din butoaie, cutii, cilindri și butelii de sticlă după amestecarea completă. Prelevarea probelor se efectuează în mod continuu și uniform pe toată durata perioadei de umplere sau descărcare a fiecărei cisterne feroviare și camion cisternă petrolier. Volumul jetului se ajustează astfel încât proba consolidată să fie de 0,02% din volumul cisternei feroviare și de 0,07% din camionul cisternă petrolier. Din rezervoarele vaselor și rezervoarele staționare, probele sunt prelevate strat după strat, după fiecare 2 m. De la stratul inferior - la o distanță de 0,5 m de jos, de la partea superioară - 0,2 m de suprafața grăsimii. Dacă stratul inferior al grăsimii este eterogen, proba este prelevată la fiecare 0,5 m până la un strat omogenizat	
Ulei de spermă cristalizat	Brichete	Sondă șurub	Din fiecare container de	

			transport deschis, din diferite locuri ale fiecărei brichete, se prelevează trei probe de cel puțin de 0,1 kg	
Nevertebrate și produse de prelucrare	Blocuri, cutii, borcane	cuțit inoxidabil	Se prelevează trei probe fracționate de cel puțin 0,2 kg din diferite locuri ale fiecărui container de transport deschis. Două bucăți de 0,1 kg sunt separate de unul dintre blocurile congelate ale containerului de transport și de centrul blocului (bandă solidă de aproximativ 0,2 kg). Din fiecare container de transport 1-2 unități de ambalare pentru consum.	
Făină și cereale pentru hrana animalelor, chitină, chitazonă	Sac, cutie	Sondă de eșantionare	Probele cu mai multe puncte (din partea de sus, din mijloc și de jos a ambalajului) de 0,05 kg sunt prelevate din diferite locuri ale containerului de transport deschis	1,0/1,0 kg dar nu mai puțin de 1 ambalaj./1 ambalaj. pentru vânzarea cu amănuntul
Clei de pește	Containere, boxe, ambalaje, butoaie, cutii	Tuburi de sticlă, sonde de eșantionare	Pentru fiecare container de transport deschis se ia 1 pachet, iar produsul este vărsat - plăci sau resturi de până la 0,1 kg. Din fiecare recipient de transport cu clei lichid se selectează mai multe probe fracționate de 0,3 kg și una congelată- de 0,5 kg.	
Pastă perlată, preparare de perle	Borcane	Lingură inoxidabilă	Din fiecare container de transport deschis se selectează 3 borcane și se selectează cel puțin 10 probe de 0,5 kg.	
Ambergris adevărat	Bucăți		Din fiecare container de transport deschis se selectează mai multe probe fracționate din ambră mărunță și fărâmituri de ambră de 0,03 kg fiecare, iar ambră mare - cel puțin	

			10 bucăți din containerul de transport și din acestea se izolează mai multe mostre de 0,03 kg.	
Hrană pentru animale, krill și krill furajer (cu excepția făinii)	Borcan	Sondă de eșantionare	Din fiecare container de transport deschis, se prelevează mai multe probe fracționate de aproximativ 0,3 kg	

Notă: proba consolidată nu este efectuată pentru caviar, pastă de caviar, alimente gata fierte (inclusiv cârnați), produse semifinite brute.

3.2.1.3 Produse de origine vegetală

Prelevarea probelor pentru produsele din fructe și legume

Prelevarea corectă a probelor pentru cercetare, împreună cu utilizarea corectă a metodei acceptate pentru determinarea unui indicator unic al calității produselor, este una dintre cele mai importante sarcini.

Compoziția probei preparate trebuie să reflecte calitatea întregului lot. Este necesar să se ia dintr-un lot omogen de produse un asemenea număr de unități de ambalare (conserve, cutii, butoaie etc.) care să reflecte calitatea întregului lot pentru a compila probele originale și medii. În practică, numărul unităților de produse selectate pentru pregătirea probei originale este stabilit prin normele de acceptare stabilite în standardele relevante.

Termeni și definiții

Probă punctuală: Cantitatea unui produs cu o singură denumire luată la un moment dat dintr-un punct dintr-un anumit lot.

Probă compozită: O probă obținut prin combinarea tuturor probelor punctuale prelevate din diferite zone dintr-un lot și caracterizarea calității întregului lot.

Probă simplă (medie): O porțiune reprezentativă a unei probe compozite obținute prin divizarea sau reducerea succesivă, astfel încât masa sau volumul să îndeplinească cerințele pentru probele de laborator și de control.

Probă de laborator: O parte dintr-o probă redusă pentru teste de laborator (analiză).

Probă de control (arbitraj): O parte dintr-o probă redusă stocată în laboratorul care efectuează testele (analizele) sau la producătorul produsului și destinată testării repetate (analizei) în cazul unui dezacord în evaluarea calității produsului în funcție de rezultatele testelor (analizelor).

Număr de acceptare; Ac: Cel mai mare număr de discrepante sau unități neconforme din probă în ceea ce privește controlul selectiv, în conformitate cu criteriul alternativ la care este permisă acceptarea loturilor.

Numărul de respingere; Re: Cel mai mic număr de discrepante sau unități neconforme din probă din punct de vedere al controlului selectiv, în conformitate cu un model alternativ în care lotul nu este acceptat.

Prelevarea probelor pentru produse de diferite consistență se realizează prin diferite obiecte. Toate alimentele pot fi combinate în 6 grupe:

- materiale omogenizate lichide;
- materiale lichide eterogene capabile să exfolieze și să formeze emulsii;
- materiale cu consistență solidă de murdărie, ambalate în recipiente mari (butoaie, cutii etc.);
- materialele în vrac;
- fructe, legume, conserve.

Probele de lichide sunt prelevate utilizând tuburi speciale cu sondă sau o pompă Bakhtin (tub cu piston, valve cu bile și un canal de scurgere).

Mostrele de produse în vrac și de cereale fine sunt prelevate cu o sondă specială cu pungă din diferite locuri - straturile superioare, medii și inferioare ale pungii. Mostrele de produse în vrac aflate în vagoane, caroserii de mașini și coșuri sunt prelevate cu o sondă pentru vagoane.

Mostrele de produse solide și cu murdărie ambalate în cutii sau butoaie sunt prelevate cu un dop de ulei. Produsele eterogene lichide sunt selectate cel mai convenabil în momentul descărcării containerelor (cisternelor etc.) la începutul, mijlocul și sfârșitul descărcării. Probe de produse lichide (siropuri, extracte, sucuri etc.) ambalate în butoaie, baloane sau sticle sunt prelevate din fiecare unitate de ambalare selectată și deschisă în următoarele cantități: din fiecare butoi - 200 cm³, din fiecare sticlă - 100 cm³. În plus, 3% din unitățile de ambalare sunt supuse deschiderii (dar nu mai puțin de trei butoaie). Același număr de cutii este deschis în cazul în care produsele sunt ambalate în cutii sau cuști. Probe din produse vâscoase, cu consistență de murdărie se prelevează din cel puțin 200g din diferite straturi ale unității de ambalare deschise.

În cazul în care alimentele conservate sunt ambalate în cutii, probele de alimente conservate pentru compilarea probei originale sunt selectate pe baza numărului de unități de ambalare dintr-un lot omogen. Prin urmare, dacă într-un lot există până la 500 de unități de ambalare (cutii, boxe, cuști), pentru deschidere sunt selectate 5 unități. Dacă dimensiunea lotului depășește 500 de unități, atunci 8 sau mai multe unități de ambalare sunt supuse deschiderii.

Probele sunt prelevate din fiecare pachet selectat și deschis în conformitate cu normele standard de acceptare și metodele de prelevare a probelor. Eșantioanele unităților individuale de ambalare sunt combinate și constituie proba originală.

Pregătirea probelor pentru cercetarea fizico-chimică constă în obținerea unei mase omogene a produsului prin tăiere, măcinare, amestecare (în funcție de tipul acestuia).

Următoarele operațiuni se efectuează înainte de măcinarea probelor:

- îndepărtați gropile din produsele drupe; condimentele, ramurile, sepelele și impuritățile sunt eliminate în alte produse;
- produsele care conțin grăsimi de origine animală sunt încălzite într-o baie cu apă, într-un termostat sau într-un cuptor până la topirea grăsimii;
- alimentele congelate sunt pre-dezghețate într-un vas închis; faza lichidă formată în timpul decongelării se adaugă produsului terestru.

În funcție de consistență, o probă de produs se macină folosind un liant de carne, o moară, un omogenizator, un amestec sau un mojar până la obținerea unei mase omogene. Dacă lichidul a fost separat de produs pentru a determina raportul dintre părți, atunci ambele faze sunt combinate și amestecate după măcinarea părții solide. Același lucru se întâmplă în cazurile în care nu este necesar să se determine raportul dintre particulele de alimente conservate.

Probele de lichid omogen și de produse din puree sunt doar amestecate.

Proba de produs preparat este plasată într-un vas de sticlă. Pentru a determina vitaminele, proba este prelevată imediat după prepararea probei și pentru determinarea restului analizelor fizico-chimice, probele sunt prelevate în timpul zilei. În acest caz, proba este depozitată la o temperatură de la 0 până la 5 °C.

Pentru pregătirea probelor de produse trebuie luate în considerare o serie de cerințe:

- pentru determinarea fracției masice a metalelor grele (elemente toxice), măcinarea se efectuează printr-un instrument format dintr-un material care nu poate contamina produsul cu metale;
- pentru determinarea fracției masice a vitaminei C din produs, nu este permisă aerarea excesivă, încălzirea și contactul acesteia cu suprafețele metalice;
- pentru determinarea impurităților mecanice prin metoda flotației, proba produsului nu este măcinată, ci numai zdrobită și amestecată.

Reguli de prelevare a probelor pentru fructele și legumele prelucrate

Produsele de prelucrare a fructelor și legumelor includ sucurile de fructe și legume, nectarele, băuturile spirtoase, sucurile de fructe și legume concentrate, pulpa și pulpa concentrată, băuturile din fructe și băuturile vegetale concentrate, jeleul, compotul, gemurile, marmelada, conservele, sosurile de fructe și legume, ketchup-urile.

Procedura de acceptare

Produsele de prelucrare a fructelor și legumelor sunt acceptate în loturi. Pentru a verifica conformitatea marcajului, a imaginii comerciale și a conformității ambalajului de transport din fiecare lot de produse, trebuie selectată aleatoriu o prelevare de probe al cărei volum este indicat în **Tabelul 1**.

Tabelul 1 Procedura de acceptare

Volumul lotului, unitățile de ambalaj de transport, buc.	Control normal			Control îmbunătățit		
	Volumul probei, unitățile de ambalaj de transport, buc.	Numărul de acceptare Ac	Numărul de respingere, Re	Volumul probei, unitățile de ambalaj de transport, buc.	Numărul de acceptare Ac	Numărul de respingere, Re
Până la 25	2	0	1	3	0	1
26 - 90	2	0	1	5	0	1
91 - 150	3	0	1	8	0	1
151 -500	5	0	1	13	0	1
501 - 1200	8	0	1	20	0	1
1201 -10000	13	0	1	32	1	2
Peste 10000	20	0	1	50	1	2

Rezultatele verificării sunt considerate satisfăcătoare dacă numărul unităților de ambalaj de transport din probă este mai mic sau egal cu numărul de acceptare Ac, iar lotul este respins dacă acesta este mai mare sau egal cu numărul de respingere Re.

Se selectează aleatoriu o probă din fiecare lot de produse pentru verificarea produselor din fructe și legume prelucrate în ambalaje de transport la indicatorii organoleptici și fizico-chimici (volumul probei este indicat în **Tabelul 2**).

Tabelul 2

Volumul lotului, unitățile de ambalaj de transport, buc.	Volumul probei, unitățile de ambalaj de transport, buc.	
	Control normal	Control îmbunătățit
Până la 15	1	2
16 - 25	2	3
26 - 90	2	5
91 - 150	3	8
151 - 280	5	13
Peste 280	8	20

Rezultatele verificării sunt considerate satisfăcătoare dacă în probă nu există nici o unitate de ambalaj de transport care să nu îndeplinească cerințele stabilite.

Pentru a verifica conformitatea marcatului, imaginii comerciale și gradul de finisare al ambalajului de consum plasat pe ambalajul de transport, trebuie selectată o probă aleatorie din fiecare lot de produse din fructe și legume, al cărei volum este indicat în Tabelul 3.

Rezultatele verificării sunt considerate satisfăcătoare dacă numărul unităților de ambalaj de consum din probă care nu îndeplinesc cerințele stabilite este mai mic sau egal cu numărul de acceptare A_c , iar lotul este respins dacă acesta este mai mare sau egal cu numărul de respingere R_e .

Tabelul 3

Volumul loturilor, unitățile de ambalaj de consum, buc.	Control normal			Control îmbunătățit		
	Volumul probei, unitățile de ambalare de consum, buc.	Numărul de acceptare A_c	Numărul de respingere, R_e	Volumul probei, unitățile de ambalare de consum, buc.	Numărul de acceptare A_c	Numărul de respingere, R_e
Până la 25	3	0	1	5	0	1
26 - 90	5	0	1	8	0	1
91 - 150	8	0	1	13	0	1
151 - 500	13	0	1	20	0	1
501 - 1200	20	0	1	32	1	2
1201 - 10000	32	1	2	50	1	2
Peste 10000	50	1	2	80	1	2

Se colectează o probă selectată aleatoriu din fiecare lot de produse din fructe și legume (al cărei volum este indicat în Tabelul 4) pentru a verifica conținutul unei unități de ambalare de consum [greutatea netă (volumul) de produse ambalate] și conținutul mediu al unui lot de produse ambalate și fracția masei a componentelor de produse ambalate în ambalaje de consum.

Tabelul 4

Volumul loturilor, unitățile de ambalaj de consum, buc.	Control normal			Control îmbunătățit		
	Volumul probei, unitățile de ambalare de consum, buc.	Numărul de acceptare A_c	Număr de respingere, R_e	Volumul probei, unitățile de ambalare de consum, buc.	Numărul de acceptare A_c	Număr de respingere, R_e
Produse în ambalaje de consum cu o greutate de până la 0,35 dm ³ incl.						
Până la 50	2	0	1	3	0	1

51 – 150	2	0	1	5	1	2
151 – 500	3	0	1	8	1	2
501 - 3200	5	1	2	13	2	3
Peste 3200	8	1	2	20	3	4
Produse în ambalaje de consum cu o greutate de până la 0,35-1,00 dm ³ incl.						
Până la 150	2	0	1	3	0	1
151 - 1200	2	0	1	5	1	2
1201 - 35000	3	0	1	8	1	2
Peste 35000 incl	5	1	2	13	2	3
Produse în ambalaje de consum cu o greutate mai mare de 1 00 dm ³						
Până la 50	1	0	1	2	0	1
51 - 501	2	0	1	3	0	1
501 - 35000	2	0	1	5	1	2
Peste 35000	3	0	1	8	1	2

Rezultatele verificării (pentru fracția masică a componentelor produselor ambalate în ambalaj de consum) sunt considerate satisfăcătoare dacă numărul unităților de ambalaj de consum din probă care nu îndeplinesc cerințele stabilite este mai mic sau egal cu numărul de acceptare A_c , iar lotul este respins dacă acesta este mai mare sau egal cu numărul de respingere R_e . Un lot de produse ambalate în funcție de conținutul unei unități de ambalaj de consum [greutatea netă (volumul) de produse ambalate] și conținutul mediu al loturilor de produse ambalate sunt acceptate în următoarele condiții:

- conținutul mediu al loturilor trebuie să fie mai mare sau egal cu masa netă (volumul) indicată în marcare;
- numărul unităților de ambalaj defectuoase (pentru care abaterea negativă a conținutului unității de ambalare depășește limita abaterilor negative permise) trebuie să fie mai mic sau egal cu numărul de acceptare A_c ;
- prezența unităților de ambalaj în care abaterea negativă a conținutului unității de ambalaj nu este dublă față de valoarea limitei de abateri negative permise.

Lotul este respins dacă nu este îndeplinită cel puțin una dintre condițiile menționate anterior.

Pentru a verifica parametrii fizico-chimici ai fructelor și produselor vegetale în ambalajul de consum, trebuie selectată o probă aleatorie din fiecare lot de produse, a cărei dimensiune este prezentată în Tabelul 4. Este permisă utilizarea produselor în ambalajul de consum, după verificarea conținutului unității de ambalaj de consum (greutatea netă (volumul) de produse ambalate) pentru testele fizico-chimice (analize) și a conținutului mediu al lotului de produse ambalate și a fracției masice a componentelor, în cazul în care condițiile de testare (analizele) permit acest lucru. Dacă se obțin rezultate nesatisfăcătoare pentru cel puțin unul din parametrii fizico-chimici, testele (analizele) asupra unei probe duble trebuie repetate. Lotul nu este acceptat dacă sunt primite rezultate nesatisfăcătoare ale testelor repetate (analizelor) pentru cel puțin unul dintre parametrii fizico-chimici.

Pentru a verifica caracteristicile organoleptice ale fructelor și produselor vegetale în ambalajul de consum, fiecare lot de produse trebuie prelevat prin eșantionare aleatorie, a cărei cantitate este prezentată în Tabelul 4. Se permite utilizarea produselor în ambalajele de consum după prelevarea de probe din acestea

pentru testele fizice și chimice (analize) dacă nu au existat modificări ale caracteristicilor organoleptice ale produsului (imagine comercială, consistență etc.). Rezultatele testelor (analizelor) la indicatorii organoleptici sunt considerate satisfăcătoare dacă produsul din ambalajul de consum nu îndeplinește cerințele stabilite.

Echipamente pentru prelevarea probelor

Pentru prelevarea probelor din ambalajul de transport:

- un vas metalic submersibil;
- tuburi de prelevare pentru selectarea produselor lichide și vâscoase;
- sonde de diverse modele pentru prelevarea probelor de produse groase și vâscoase;
- căuș pentru prelevarea probelor din produse de paste.

Pentru prelevarea probelor din ambalajul de consum:

- tuburi de prelevare
- căușe

Cerințe privind prelevarea probelor

Prelevarea probelor se realizează pe baza ambalajelor nedeteriorate de consum sau de transport, astfel încât probele să fie protejate de influențele externe asupra mediului sau de poluarea accidentală.

Diferite metode de prelevare a probelor sunt utilizate pentru a asigura reprezentativitatea probei, în funcție de starea fizică a produsului, a tipurilor de transport și a ambalajelor de consum.

Echipamentele de prelevare a probelor trebuie să fie curate, uscate și lipsite de mirosuri, iar materialul din care este realizat nu trebuie să afecteze calitatea probei.

Se permite să se preleveze mostre de produse lichide cu aceeași denumire, prezentate pentru acceptare sau livrare unică, în vehicule uniforme sau în ambalaje uniforme de transport, cu un eșantionator, asigurându-se de fiecare dată că se spală cu o porțiune din produsul selectat. Partea din produsul utilizat pentru spălare se elimină.

Trebuie luate toate măsurile necesare pentru a exclude modificările caracteristicilor fizico-chimice sau organoleptice în timpul prelevării probelor, transportului și depozitării probelor.

Prelevarea probelor din ambalajul de transport

Probele punctuale de fructe și produse vegetale procesate lichid sunt prelevate de-a lungul întregii înălțimi prin gaura rezervorului cu ajutorul echipamentului adecvat.

Tabelul 5

Denumirea indicatorilor	Greutatea minimă sau volumul, kg (dm ³)			
	Probă consolidată	Probă redusă	Probă de laborator	Probă de control
Organoleptic	1,00	0,50	0,25	0,25
Fizicochimic	2,0	1,0	0,5	0,5
Impurități minerale și străine	3,0	1,0	0,5	0,5
Fracția masică a particulelor	8,0	2,0	1,0	1,0

Înainte de prelevarea probelor din produsele lichide, conținutul rezervorului este amestecat cu una dintre metodele disponibile pentru asigurarea unui produs omogen.

Cel puțin două probe punctuale trebuie să provină din fiecare unitate de ambalaj de transport. Masa probei punctuale trebuie să fie de la 0,3 până la 3,0 kg, în funcție de masa probei consolidate, care este indicată în Tabelul 5. La amestecarea produsului lichid se efectuează o verificare vizuală a prezenței impurităților. În cazul detectării impurităților, produsul este extras cu ajutorul echipamentului de prelevare a probelor și trimis la laborator împreună cu mostrele.

Prelevarea probelor de pe ambalaje de consum

Eșantionarea produselor de pe ambalajul de consum se realizează pe baza unei probe aleatorii.

Probele punctuale sunt prelevate prin selecția unei cantități egale de produs din fiecare unitate de ambalaj de consum. Probele punctuale sunt amestecate pentru a forma o probă consolidată. Proba consolidată este complet amestecată și o parte a produsului este eliminată pentru a obține o probă redusă.

O probă redusă de produs din ambalajul de consum este împărțită în două părți egale pentru a obține probe de laborator și de control.

3.2.1.4 Produse lactate

Prelevarea probelor pentru produsele lactate

Eșantionarea adecvată a produselor lactate pentru cercetare, precum și utilizarea corectă a metodei acceptate de determinare a unei măsuri simple de calitate reprezintă una dintre sarcinile importante în evaluarea calității produselor lactate.

Produsele lactate finite pentru vânzare trebuie să îndeplinească cerințele documentelor de reglementare în vigoare.

Probele de produse lactate sunt selectate în conformitate cu DSTU ISO 707:2002, care stabilește regulile de acceptare, metodele de prelevare a probelor de produse lactate și de preparare a acestora pentru analiză.

Documentația de reglementare prevede livrarea și acceptarea produselor finite în **loturi**. În acest caz, un lot este un set de unități de produse de aceeași denumire într-un recipient omogen, având aceleași caracteristici fizico-chimice și organoleptice (de aceeași calitate) produse într-o singură instalație, pe un singur echipament tehnologic, pe durata unui ciclu tehnologic, pe un singur mod de producție, la o dată de fabricație și este elaborat împreună cu un document însoțitor. În cazul amestecării loturilor, produsele sunt sortate în loturi omogene.

Înainte de prelevare se verifică imaginea comercială și marcajul ambalajului de transport pentru fiecare unitate din lot, precum și pe ambalajul de consum, fiecare unitate de ambalaj de transport împreună cu produsele incluse în probă.

Prelevarea probelor este un complex de unități selectat pentru a controla un lot. Volumul prelevării probelor (numărul unităților de transport sau de ambalaj de consum care constituie prelevarea probelor) pentru loturile de **lapte de băut, smântână, produse lactate cultivate în lichid** din containerul de transport este de 5%, **smântână** de 10% din containerul de transport cu produse. Se selectează o prelevare de probe dacă în lot există mai puțin de 20 de unități de lapte de băut, smântână și produse lactate cultivate în lichid sau mai puțin de 10 unități de smântână.

Volumul probei de produse indicate în ambalaje de consum este indicat în **Tabelul 1**.

Tabelul 1

Numărul unităților de transport ambalate împreună cu produsele dintr-un lot	Numărul unităților de transport ambalate împreună cu produsul în cadrul prelevării probelor
Până la 100	2
101 - 200	3
201 - 500	4
501 și mai mult	5

Înainte de a deschide ambalajul cu produse, acesta este curăţat de murdărie, spălat cu apă şi şters. După verificarea temperaturii, se determină volumul de produse lactate pentru fiecare unitate a produsului din probă, pentru producţia în cisterne, aceşti indicatori se determină în fiecare rezervor sau secţiune.

În primul rând sunt prelevate probele pentru analiza microbiologică, apoi pentru determinarea parametrilor organoleptici şi apoi pentru cele fizico-chimice.

O unitate de ambalaj de consum este selectată din probă. Volumul unei probe de lapte, frişcă, smântână sau de produse lactate cultivate în lichid în ambalaje de consum este egal cu volumul produsului inclus în probă. Din proba combinată de lapte de băut, pentru analiză se izolează o probă de 0,5 dm³ după amestecare.

În timpul preparării mostrelor de produse lactate cultivate în lichid sau smântână, acestea sunt amestecate de 5 ori pentru a transforma containerul sau spatula în decurs de un minut de la dezambalarea containerului. Probele cu o consistenţă groasă sunt preîncălzite la o temperatură de $(32 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ pe un rezervor de apă cu o temperatură de $(38 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ şi apoi sunt răcite la o temperatură de $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$. Pentru analiză se selectează o mostră din proba combinată de băuturi din lapte cultură cu volumul de 0,1 dm³ şi proba din smântână cântăreşte aproximativ 100 g.

Volumul probei din lotul de brânză lactică sau produsele acesteia din ambalajul de transport este de până la 10% din unităţile de ambalaj de transport cu produse. Probele punctuale sunt prelevate prin sondă, scufundându- o în partea inferioară a rezervorului. Se prelevează trei probe din fiecare unitate de ambalaj de transport: una din ele provine din centru, celelalte două se află la o distanţă de 3... La 5 cm de peretele lateral al rezervorului, produsul este amestecat cu grijă cu o spatulă, se prepară o probă combinată de aproximativ 500 g. Se selectează 100 g de produs din proba combinată.

Volumul probei dintr-un lot de **brânză lactică sau din produsele acesteia** în ambalajul de consum este indicat în **Tabelul 2**.

Tabelul 2

Numărul unităţilor de ambalaj de transport cu produse dintr-un lot	Până la 50	51 - 100	101 - 200	201 - 300	301 şi mai mult
Numărul unităţilor de ambalaj de transport cu produsul din probă	2	3	4	5	6

2 unităţi de recipient cu produse sunt selectate din fiecare unitate de ambalaj de transport împreună cu produsele incluse în selecţie în cazul în care un produs are o greutate de până la 250 g şi o unitate în cazul în care un produs are o greutate de 250 g sau mai mult.

Produsele sunt eliberate de ambalaj în vederea realizării unei probe combinate de brânză lactică în ambalajul de consum, produsul este transferat în vase şi amestecat bine. Se selectează aproximativ 100 g pentru prelevarea probelor din proba combinată şi se selectează aproximativ 150 g pentru produsele de umplură.

Se recomandă examinarea probelor imediat după preparare. Dacă nu este posibil, peobwllw se depozitează la 2... 8 °C şi nu mai mult de 4 ore.

Folosiţi foarfece pentru a separa fructele glasate, nucile, stafidele şi aşa mai departe de produsele brute cu filtre pentru a le pregăti pentru analiză.

Preevarea probelor din **îngheţată** în tuburile incluse în probă se efectuează cu o sondă încălzită în apă până la $(38 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, care este scufundată în produs la o distanţă de 2... 5 cm de la pereţi în diagonală spre partea inferioară a manşonului peretelui opus. Un strat de îngheţată se scoate din sondă cu o spatulă pe toată lungimea sondei şi se transferă pe vase. Îngheţata rămâne la temperatura camerei până se topeşte complet. Nucile, fructele glasate, stafidele şi alte împluturi (dacă sunt prezente) sunt separate de masa preparată, amestecate bine. Şi se face o probă combinată de aproximativ 500 g. Din proba combinată se prelevează o mostră de aproximativ 100 g pentru analiză. Volumul probei dintr-un lot de îngheţată din ambalajul de consum este de 10% din unităţile pachetului de transport cu produse, dacă în lot se selectează mai puţin de 10 unităţi. Din fiecare unitate de ambalaj de transport împreună cu produsele incluse în probă, se selectează o unitate de ambalaj de consum cu produse.

0.1... 0,2% din totalul unităților de ambalare sunt selectate pentru realizarea probei combinate pentru înghețată din ambalajele de consum incluse în probă. Fiecare unitate de înghețată ambalată este examinată separat.

Volumul probei dintr-un lot de torturi de înghețată este un tort. Un tort mai mic de 500 g este utilizat complet ca probă pentru analiză. Dintr-un tort cu o greutate mai mare de 500 g cu o decorație localizată simetric, pentru analiză se ia $\frac{1}{4}$ din tort, tăindu-l pe diagonală. Dacă decorația este asimetrică, tortul se taie diagonal în patru părți și se selectează două dintre acestea luând în considerare cantitatea proporțională a decorației.

Decorația se scoate de pe tort sau părțile acestuia cu ajutorul unei pensete sau spatule, amestecate bine și pentru analiză se selectează o probă de 100 g. Decorația trebuie pusă într-un fel separat și trimisă de asemenea pentru cercetare. Înghețata este agitată, rotind rezervorul de probă cel puțin trei ori în timpul pregătirii probelor pentru analiză. Temperatura probei trebuie să fie $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Volumul probei pentru fiecare lot de **unt** în ambalaje de transport și de consum este de 5% din unitatea de transport împreună cu produsul. Dacă într-un lot există mai puțin de 20 de unități, se selectează o singură unitate. Pentru fiecare unitate ambalată de unt ambalat, se selectează 3% din bunurile ambalate de consum. Probele punctuale ale untului din ambalajul de transport sunt prelevate cu o sondă. Dacă untul este ambalat în cutii, sonda este scufundată diagonal de la peretele din capăt spre centrul calupului de unt. Se prelevează o probă de unt de $10 ^\circ\text{C}$ și mai puțin cu o sondă încălzită în apă la o temperatură de $(38 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Pentru compilarea probei combinate din partea inferioară a calupului de unt selectate de sondă din fiecare unitate de ambalaj de transport împreună cu produsul, se prelevează cu cuțitul o probă de unt de aproximativ 50 g și se pune într-un vas pentru a forma o probă combinată. Partea superioară a calupului de unt, care rămâne până la 1,5 cm pe sondă, este înlocuită și aplatizată cu atenție pe suprafața untului.

După îndepărtarea materialului de ambalare și a stratului exterior de 0,5... 0,7 cm din unt se prelevează o probă de 50 g din fiecare calup de unt. În cazul în care greutatea unui brichet este de 50 g sau mai mică, proba combinată este compusă din brichete întregi, fără a îndepărta stratul exterior.

Proba combinată de unt se înmoaie într-o baie de apă cu o temperatură de $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ cu agitare continuă. 50 g de unt sunt selectate pentru analiza din proba preparată.

Proba este selectată în cantitatea indicată în Tabelul 3 din lotul de brânzeturi tari.

Tabelul 3

Numărul unităților de ambalaje de transport cu produse dintr-un lot	Numărul unităților de ambalaje de transport împreună cu produsul din eșantionare
Până la 5	1
6... 15	2
16... 25	3
26... 40	4
41... 60	5
61... 85	6
86... 100	7
Peste 100	5%, dar nu mai puțin de 7

Un cap de brânză, un bar de brânză sau o unitate de ambalaj de consum pentru produsele alimentare sunt selectate din fiecare unitate de ambalaj de transport împreună cu produsele incluse în eșantion.

Probele punctuale de brânză sunt prelevate cu o sondă din două părți opuse ale calupului de brânză inclus în probă. Sonda se inserează la o adâncime de $\frac{3}{4}$ din lungime. Pentru a determina caracteristicile organoleptice, se selectează o probă punctuală dintr-o parte a calupului de brânză. Sonda se inserează de la partea inferioară din față, mai aproape de centru, pentru selectarea probelor de brânzeturi cu cheag tare de dimensiuni mari, având forma unui cilindru sau a unui bar; pentru selectarea probelor punctuale din

brânzeturi cu cheag tare de mici dimensiuni cu o formă rotundă, sonda se inserează în centrul calupului din partea superioară. Coloanele brânzei de aproximativ 1,5 cm sunt separate de stratul de plută. Apoi bucățile fără strat de plută cu lungimea de aproximativ 4,5 cm sunt plasate într-un container pentru proba combinată. Atunci când se prelevează probe punctuale din brânzeturi cu cheag tare de mici dimensiuni, care au forma unui cilindru mic, tija se inserează de pe suprafața cilindrică și, pentru cele care au forma unui bar, se inserează pe fața capătului diagonal.

Prelevarea probelor pentru brânza moale (Rockfort, Camembert, Dniprovsky), în saramură (suluguni, brynza) și prelevarea combinată se efectuează în conformitate cu cerințele reglementărilor curente pentru brânza moale.

Pentru a fabrica o probă combinată de brânzeturi în saramură, se utilizează întreaga coloană de brânză selectată de tijă. Prelevarea probelor din brânza suluguni și brânzeturi similare se efectuează prin tăierea cu un cuțit de aproximativ 2 cm.

Probele de brânză sunt prelevate separat pentru a determina caracteristicile fizico-chimice și organoleptice. Pentru toate aceste analize nu se permite o singură probă.

Probele punctuale de brânzeturi crude, finite și apropiate de consistența brânzeturilor în saramură sunt frecate printr-un grătar fin, amestecate bine și combinate pentru studii fizico-chimice; probele punctuale de brânză moale și păstoasă sunt măcinate într-un mojar și unite într-o probă combinată. Pentru analiză se atribuie o probă de 50 g din proba combinată.

Dintr-un lot de **brânză topită** se selectează și se deschide fiecare a zecea unitate de ambalaj, și se ia câte un pachet de brânză de la fiecare unitate controlată. În cazul brânzei topite în ambalaj de 30 g, se iau 2 pachete de brânză din fiecare loc de control.

Pentru cercetarea chimică, 20 g de brânză se separă de fiecare brânză de același tip și aceeași fracție masică de grăsime și se plasează într-un singur recipient. Probele selectate sunt strivite complet, amestecate și prelevate în cantitate de cca. 50 g ca probă combinată într-un pahar curat, cu un dop.

Evaluarea organoleptică a brânzei topite se efectuează la o temperatură de 14... 16 °C.

Volumul probei lotului de **conserve de lapte condensat și produse lactate uscate** din containerul de transport reprezintă 3% din unitățile containerului de transport cu produse, dar nu mai puțin de 2 unități de conserve de lapte condensat și nu mai puțin de 3 unități de produse lactate uscate. Volumul probei dintr-un lot de produse lactate conservate și produse uscate în ambalajul de consum este de asemenea de 3%, dar nu mai puțin de două unități.

Atunci când se vând produse din fiecare lot de lapte condensat, se selectează două conserve Nr. 7 pentru depozitarea de control la fabrica de conserve lactate. Atunci când se ambalează într-un container mare, două probe de 500 g sunt selectate din fiecare lot și sigilate într-un container etanș. Probele de control sunt depozitate timp de 4-6 luni pentru produse de uz curent și 12-15 luni pentru produse de depozitare pe termen lung și pentru export.

Pentru fiecare lot de mostre de lapte uscat conservat pentru controlul păstrării la fabrică se prelevează: 2 locuri în ambalaje mici și două probe de 200 g sunt prelevate din ambalaje mari, ambalate bine în pungi de plastic și sigilate. Probele sunt depozitate timp de 8 luni în ambalaje etanșe și timp de 3 luni în recipiente nepresurizate. După perioada specificată, mostrele sunt scoase din depozit și trimise la prelucrare industrială.

Înainte de prelevare, laptele condensat din butoaie și recipiente se amestecă bine cu un agitator, iar laptele condensat din ambalajele de consum se amestecă cu o spatulă timp 1-2 minute după turnare.

Dacă în conservele de lapte condensat există un precipitat la fund, conservele se scufundă în apă la o temperatură de $(55 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ și se agită din nou pentru a obține o masă omogenă, temperatura produsului nu trebuie să depășească $(28 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, atunci acesta este răcit la o temperatură de $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$. După amestecarea produsului în rezervoare, probele punctuale sunt prelevate din diferite locuri de către o sondă sau un eșantionator, scufundându-l în partea inferioară a rezervorului. Pentru fiecare ambalaj, probele punctuale se prelevează în volum egal și se formează dintr-o probă combinată de 1 kg. Pentru analiza din proba combinată se prelevează 300 g de produs.

Prelevarea probelor de produse lactate uscate din containerul de transport inclus în eșantion se efectuează cu o sondă din diferite locuri ale fiecărei unități a containerului de transport cu produse. O sondă este scufundată în produs la o distanță de 2... 5 cm de la pereți diagonal față de fundul rezervorului. Proba punctuală se colectează într-un container și se compune dintr-un eșantion combinat de 1-2 kg, iar pentru analiză se separă o probă de 200g.

Mostrele de produse lactate uscate sunt amestecate bine și măcinate într-un mojar.

Probele selectate de produse preparate sunt determinate de parametrii organoleptici, fizico-chimici și microbiologici pentru conformitatea cu documentele de reglementare în vigoare.

Dreptul de a elabora documentația și de a elibera produsul finit spre vânzare îi revine șefului de laborator sau unui angajat al laboratorului, care este responsabil pentru producerea produselor finite.

Un maestru sau tehnolog al unui atelier întocmește un pașaport pentru un lot de produse finite și îl trimite la laborator pentru controlul calității. Lucrătorul de laborator verifică produsele după indicatorii organoleptici și fizicochimici, verifică starea ambalajului, marcarea și ambalarea în vederea conformității producției cu cerințele documentelor de reglementare și eliberează un certificat de calitate în conformitate cu formularul prevăzut. Certificatul de calitate este singurul document care acordă dreptul de a elibera un anumit lot de produse din întreprindere. Dacă există produse fără certificat, vor fi impuse sancțiuni administrative persoanei care a comis încălcarea.

3.2.1.5 Vinuri și băuturi alcoolice

PRINCIPIILE ȘI CERINȚELE GENERALE OIV DE ANALIZĂ A VINURILOR ȘI MUSTURILOR

Culegerea de Metode Internaționale de Analiză a Vinurilor și Musturilor a fost publicată pentru prima dată în 1962. Toate metodele și principiile de analiză a vinurilor și musturilor au fost aprobate de Adunarea Generală a „Organizației internaționale a viei și vinului” (OIV) și produse în fiecare an de Sub-Comisie.

Culegerea joacă un rol important în armonizarea metodelor de analiză. Multe țări viticole și-au introdus definițiile și metodele în propriile reglementări.

Uniunea Europeană recunoaște toate metodele din Culegere și le face obligatorii în toate statele membre, confirmând colaborarea strânsă dintre UE și OIV.

Astfel, prin rolul său principal în armonizarea metodelor de analiză, Culegerea contribuie la facilitarea comerțului internațional. Cu *Codul Internațional de Practici Oenologice* și *Codexul Oenologic Internațional*, acesta constituie un organism cu beneficii științifice, juridice și practice considerabile.

Structura și modul de redactare a metodei de analiză OIV

Extract din standardul ISO 78-2:1999

1. Titlu

2. Introducere

Opțional

3. Domeniul de aplicare

Prezenta clauză precizează în mod succint metoda de analiză chimică și în special produsul căruia i se aplică.

4. Definiții

5. Principiul

Prezenta clauză opțională indică etapele esențiale ale metodei utilizate, principiile de bază.

6. Reactivi și materiale

Prezenta clauză include toți reactivii și materialele utilizate în timpul testului, precum și caracteristicile lor esențiale, și precizează, dacă este necesar, gradul lor de puritate.

Se menționează:

Produsele utilizate în forma lor comercializată disponibilă

Soluțiile concentrației definite

Soluția volumetrică standard

Soluția standard de referință

Soluția standard

Soluția standard de potrivire

7. Aparat

Prezenta clauză enumeră denumirile și caracteristicile semnificative ale tuturor aparatelor și echipamentelor care urmează să fie utilizate în timpul analizei sau încercării. Notă: fiecare reactiv este menționat printr-un număr de referință specific

8. Prelevarea probelor (Pregătirea probei)

Se menționează:

Procedura de prelevare a probelor

Pregătirea probei de testare

9. Procedura

Fiecare secvență de operațiuni trebuie descrisă în mod clar și concis. În mod normal, această clauză va include următoarele subclauze:

Porțiunea de testare (prezenta subclauză trebuie să prezinte toate informațiile necesare pentru pregătirea porțiunii de testare din proba de testare). Determinarea(nările) sau testul (testele) (această subclauză trebuie descrisă cu precizie pentru a facilita descrierea, înțelegerea și aplicarea procedurii).

Calibrare (dacă este necesar).

10. Calcul (rezultate)

Prezenta clauză indică metoda de calcul a rezultatelor. Trebuie să fie precizate unitățile, ecuația utilizată, semnificațiile simbolurilor algebrice, numărul de zecimale cărora urmează să li se dea rezultatele.

11. Precizie (în cazul validării interlaboratoare)

Trebuie să fie indicate datele de precizie:

Numărul laboratoarelor

Valoarea medie a concentrației

Repetabilitatea și reproductibilitatea

Abaterea standard de repetabilitate și reproductibilitate

Trimiterea la documentul care conține rezultatele publicate ale testelor interlaboratoare.

12. Anexă

Anexă referitoare la clauzele de precizie

Anexă privind datele statistice și alte date derivate din rezultatele testelor interlaboratoare.

13. Bibliografie

Anexă referitoare la clauzele de precizie

Prezenta anexă indică în special

- Declarații de repetabilitate

- Declarații de reproductibilitate

Anexa privind datele statistice și alte date derivate din rezultatele testelor interlaboratoare.

Datele statistice și alte date derivate din rezultatele testelor interlaboratoare pot fi furnizate într-o anexă informativă.

Exemplu de tabel care oferă rezultate statistice

Identificarea probei A B C	A	B	C
Numărul laboratoarelor participante			
Numărul rezultatelor încercărilor acceptate			
Valorile medii (probă g/100 g)			
Valoare reală sau acceptată (g/100g)			
Abaterea standard de repetabilitate (Sr)			
Coeficientul de repetabilitate al variației			
Limita de repetabilitate (r) (2,8 x Sr)			
Abaterea standard de reproductibilitate (SR)			
Coeficientul de reproductibilitate al variației			
Limita de reproductibilitate (R) (2,8 x SR)			

Deși s-ar putea să nu fie considerat necesar să se includă toate datele prezentate în tabel, se recomandă să fie incluse cel puțin următoarelor date:

- Numărul laboratoarelor
- Valoarea medie a concentrației
- Abaterea standard de repetabilitate
- Abaterea standard de reproductibilitate
- Trimiterea la documentul care conține rezultatele publicate ale testelor interlaboratoare.

Tipuri de analiză a vinurilor și musturilor

- 1) Analize fizice;**
- 2) Analize chimice:**

Compuși organici

- Zahăr
- Alcool
- Acizi
- Gaze naturale
- Alți compuși chimici

Compuși neorganici

- Anioni
- Cationi
- Alți compuși neorganici

3) Analiza microbiologică

4) Alte analize

Metode de analiză a vinurilor și musturilor

Remarci generale

1. Pentru analiza chimică și fizică trebuie utilizat vinul sau mustul limpezit. În cazul în care vinul sau mustul este tulbure, acesta este filtrat mai întâi printr-o hârtie de filtru într-o pâlnie acoperită sau centrifugat într-un recipient închis. Această operațiune trebuie precizată în orice documentație necesară.

2. Referința metodei utilizate pentru fiecare determinare trebuie să fie pe orice documentație necesară.

3. Unitățile de măsură pentru diferite mărimi (volum, masă, concentrație, temperatură, presiune etc.) se conformează recomandărilor IUPAC (Uniunea Internațională pentru Chimie Pură și Aplicată).

4. În ceea ce privește reactivii și soluțiile de titrare utilizate, cu excepția cazului în care se prevede altfel în text, substanțele chimice utilizate trebuie să fie de „calitate analitică”, iar apa trebuie distilată sau cu o puritate echivalentă.

5. Metodele enzimatică și determinarea unei serii de parametri se bazează pe măsurătorile absolute de absorbantă, care necesită calibrarea spectrofotometrului pentru lungimi de undă și absorbantă. Lungimea de undă poate fi calibrată prin utilizarea liniilor Hg: 239.94, 248.0, 253.65, 280.4, 302.25, 313.16, 334.15, 365.43, 404.66, 435.83, 546.07, 578.0, și 1014.0 nm.

Absorbanța poate fi calibrată cu ajutorul soluțiilor comerciale de referință obținute de la furnizorii corespunzători sau de la filtrele de densitate neutră.

6. Sunt prezentate referințele bibliografice esențiale. Trimiterile la documentele de lucru ale Sub-Comisiei sunt marcate cu 'F.V., O.I.V.' („pagini verzi”), urmate de anul publicării și numărul documentului.

„Diglucozid de malvidină” - descriere

Prezența pigmentilor antocianini diglucozidici în vinul roșu sau rosé, în special diglucozid malvidol, este utilizată pentru a determina dacă vinul a fost produs utilizând alte fructe decât speciile *Vitis vinifera*, care nu conțin cantități semnificative de diglucozide.

„Diglucozid de malvidină” - metoda de analiză chimică

1. Principiul

Diglucozid de malvidină, oxidizat cu acid nitric, este convertit într-o substanță care, într-un mediu de amoniu, emite o fluorescență verde vie în lumina ultravioletă. Intensitatea fluorescenței compusului format se măsoară în comparație cu fluorescența unei soluții titrate cu sulfat de chinină a cărei intensitate de fluorescență este standardizată cu referința de diglucozid de malvidină. Dioxidul de sulf liber, care atenuează fluorescența, trebuie combinat anterior cu exces de acetaldehidă.

2. Examinare calitativă

2.1 Aparat

2.1.1 Lampă Ultravioletă care permite măsurarea la 365 nm.

2.2 Reagenți

2.2.1 Soluție de acetaldehidă

Paraldehidă cristalizabilă..... 10 g

Etanol 96% (v/v) 100 mL

2.2.2 Acid clorhidric, 1,0 M.

2.2.3 Soluție de nitrat de sodiu, 10 g/L.

2.2.4 Etanol, 96% (v/v), conținând 5% soluție de amoniac concentrat
($p_0 = 0,92$ g/ml).

2.2.5 Vinul de control conținând 15 mg de diglucozid de malvidină per litru.

2.2.6 Vin fără diglucozid de malvidină

2.3 Metodă

Într-un tub de testare adăugați:

- 10 ml de vin
- 1,5 ml soluție acetaldehidă așteptați 20 de minute.
- Într-un tub de centrifugare de 20 ml puneți:
- 1 ml de vin reacționat cu acetaldehidă
- 1 picătură de acid clorhidric
- 1 ml soluție de nitrat de sodiu

Agitați; așteptați 2 minute (maxim 5 minute); adăugați:

- Etanol amoniacal 10 ml

Tratați în mod similar 10 ml de vin care conține 15 mg/L de diglucozid de malvidină (vin de control). Agitați. Așteptați 10 minute și centrifugați.

Decantați lichidele limpezi din partea superioară în tuburile de testare calibrate. Observați diferența de fluorescență verde dintre vinul de testare și vinul de control aflat sub lumina ultravioletă la 365 nm. Pentru vinurile rosé, este posibilă sporirea sensibilității utilizând:

- 5 ml de vin tratat cu acetaldehidă (2.3)
- Acid clorhidric 0,2 ml, 1 M (2.2.2)
- 1 ml soluție de nitrat de sodiu, 10 g/L (2.2.3)
- Etanol amoniacal 5,8 ml (2.2.4)

Tratați vinul de control într-un mod similar.

2.4 Interpretare

Vinurile care nu au fluorescență sau au o fluorescență distinct mai scăzută decât cele de Control se poate considera că nu au diglucozid de malvidină. Cele a căror fluorescență este ușor mai mică decât, egală cu, sau mai mare decât cele de control ar trebui să aibă o determinare cantitativă.

3. Determinare cantitativă

3.1. Aparat

3.1.1. Echipamente de măsurare a fluorescenței:

- lungimea de undă a excitației 365 nm;
- lungimea de undă a radiațiilor fluorescente 490 nm.

3.1.2. Celulă de cuarț optic (lungime traseu de 1 cm)

3.2 Reagenți

3.2.1. A se vedea examinarea calitativă

3.2.2. 2mg/L soluție de sulfat de chinină

Preparați o soluție conținând 10 mg sulfat de chinină foarte pură în 100 ml acid sulfuric, 0,1 M. Diluați 20 ml din această soluție la 1 litru cu soluție de acid sulfuric, 0,1 M.

3.3. Procedura

Tratarea vinului prin metoda descrisă în *Examinarea calitativă* (2), cu excepția faptului că partea alicotă de vin tratat cu acetaldehidă este pentru fiecare caz (vinuri roșii și rosé) de 1 ML.

Așezați în casetă soluția de 2 mg/L de sulfat de chinină, ajustați fluorometrul la intervalul complet (transmisia T, egală cu 100%) prin ajustarea lății tăieturii sau a sensibilității.

Înlocuiți acest tub cu cel care conține vinul de testare: aceasta este valoarea T1. În cazul în care procentajul de transmisie, T1 este mai mare de 35, diluați vinul cu vin fără diglucozid de malvidină a cărui fluorescență trebuie să fie mai mică de 6% (acest lucru trebuie stabilit prin teste preventive).

Remarci:

1. Acidul salicilic (salicilat de sodiu) adăugat în vin pentru stabilizare înainte de analiză provoacă o fluorescență acută care poate fi eliminată printr-o extracție cu eter.

2. Fluorescența falsă este provocată de adăugarea de caramel.

3.4 Calcularea

O intensitate a fluorescenței de 1, pentru vin fără SO₂, pentru condițiile de exploatare de mai sus, cu excepția tratamentului acetaldehidei, corespunde unei valori de 0,426 mg de diglucozid de malvidină pe litru de vin. Pe de altă parte, vinurile roșii și roze, fără diglucozid de malvidină, conferă fluorescență corespunzătoare valorii de ordinul T de 6%.

3.5 Exprimarea rezultatelor

Canitatea de diglucozid de malvidină este exprimată în miligrame per litru de vin la cel mai apropiat număr întreg.

Bibliografie

CULEGEREA DE METODE INTERNAȚIONALE DE ANALIZĂ A VINURILOR ȘI MUSTURILOR-OIV,EDIȚIA 2016,VOLUMUL 1

CULEGEREA DE METODE INTERNAȚIONALE DE ANALIZĂ A VINURILOR ȘI MUSTURILOR-OIV,EDIȚIA 2012 VOLUMUL 2

3.2.2 Medicina umană și veterinară

Probele trebuie selectate în conformitate cu cunoștințele privind epizootologia și patogeniza bolii studiate sau diagnosticele anterioare sau semnele clinice ale bolii. Acest lucru va ajuta la prelevarea de probe din țesuturile sau lichidele care conțin cel mai adesea agentul infecțios sau dovezile infecției. Cunoștințele includ susceptibilitatea țesuturilor sau datele organelor țintă, durata și locația infecției în fiecare tip de țesut, durata și calea de infecție sau termenele în care pot fi disponibile date anterioare privind infecția, cum ar fi prezența anticorpilor detectați prin studii detaliate. Aceste cunoștințe pot fi utilizate pentru a determina metoda de prelevare a probelor. În multe studii privind bolile de cireadă, este recomandabil să se preleveze probe de la animalele sănătoase pentru analiza comparativă epizootică sau de bază (de exemplu, pentru control aleatoriu și general pentru testarea de diagnosticare) și pentru validare. Dacă animalele de fixare (imobilizare) necesită utilizarea substanțelor chimice, trebuie să se țină cont de impactul substanței chimice asupra rezultatelor studiilor (de exemplu, studii toxicologice). Unele studii de laborator sunt incompatibile cu anumiți anticoagulanți și agenți de conservare a țesuturilor, cum ar fi heparina, formalina, gheața uscată (expunerea probei de testare la niveluri ridicate de CO₂) sau chiar înghețarea. Este important ca proba să fie selectată aseptice, cât mai curând posibil, pentru a evita contaminarea cu detergenți și substanțe antiseptice utilizate pentru curățarea locului de prelevare a probelor de la animale, deoarece aceste substanțe pot împiedica procedurile testelor de laborator. Pentru studiul mostrelor de microorganisme patogene, precum și a cercetărilor moleculare pot fi afectate negativ de substanțe chimice sau detergenți utilizați la fabricarea sau pregătirea uneltelor de selecție (de exemplu, substanțe chimice utilizate la fabricarea anumitor tipuri de lubrifianți și detergenți utilizați la curățarea ustensilelor de sticlă). Rezultatele testelor de laborator depind de prelevarea corectă a probelor și, prin urmare, ar trebui planificată procedura. La planificarea prelevării probelor, este necesar să se acorde atenție sarcinii (scopului) și să se decidă cât de precis trebuie să fie răspunsul preconizat (cu cât este necesară o precizie mai mare, cu atât mai mare este numărul probelor care trebuie prelevate).

Este necesar să se convină asupra posibilității de a efectua cercetări cu specialiștii laboratoarelor în care vor fi trimise probele.

Populația de animale pentru care urmează să fie prelevate probe trebuie împărțită în unități de prelevare a probelor (de la un individ la un grup - cuib, unitate, cireadă).

Prelevarea probelor se realizează prin următoarele metode:

- randomizare (selectare aleatorie) - simplă (alegerea indivizilor aleatorii) sau sistematică (alegerea indivizilor la intervale regulate);
- stratometria – ansamblul de animale este împărțit inițial în grupe (straturi) formate pe baza sexului, vârstei, rasei, reținerii, direcției activității economice și apoi în mijlocul fiecărui grup se efectuează prelevări de probe randomizate simple sau sistematice;

- gruparea – un colectiv de animale, în primul rând, este împărțit în grupe (grupuri) formate în mod natural, prin activități economice umane sau prin caracteristici geografice (cireadă, fermă, fermă individuală, zonă), iar în cadrul fiecărui grup se efectuează prelevări de probe randomizate simple sau sistematice.

Numărul de probe prelevate în condiții de diagnosticare imediată a bolii poate fi limitat de prezența animalelor bolnave (moarte) și depinde de condițiile specifice. În cadrul monitorizării și examinării, dimensiunea/numărul probelor care urmează să fie prelevate pentru a determina dacă o boală este prezentă sau nu la o anumită populație depinde de următorii parametri:

- volumul populației de animale (dacă se prelevează mai multe probe de la populația respectivă, atunci probabilitatea detectării unor animale care să reacționeze pozitiv crește odată cu fiecare probă nouă;
- probabilitatea prevalenței bolii, dacă este prezentă la populație (nivelul probabil de acoperire a unei anumite boli este estimat de parametrii epizootici ai bolii sau ai analogilor cu alte cirezi/populații);
- nivelul de certitudine necesar pentru luarea deciziilor (95% este considerat suficient pentru toate animalele, cu excepția rațelor, găștelor și curcanilor, unde acest nivel este de 49%). Volumul probei în acest caz se calculează folosind formule sau tabele speciale.

Probele de la fiecare animal sunt prelevate cu instrumente sterile într-un vas steril separat, identificând fiecare probă. Materialele sunt selectate în punctul țesuturilor sănătoase și bolnave.

Pentru selectarea materialului patologic/biologic, corpul animalului este utilizat în primele ore de la deces sau este sacrificat un animal bolnav care nu a fost tratat.

Probele sunt trimise la laborator în formă neconservată, cu controlul temperaturii (+ 4-8°C). În cazul în care este imposibil să se livreze la laborator în termen de 24 de ore, probele sunt congelate într-un vas cu gheață sau sunt conservate.

În funcție de tipul infecției la animalele bolnave clinic, acestea iau măsuri adecvate, specifice pentru biomaterialul bolii, luând în același timp măsuri personale de siguranță.

Pentru examinarea bacteriologică materialul patologic (organe sau părți ale acestora) se conservează cu 30% soluție apoasă de glicerol pur chimic. Soluția a fost sterilizată prin fierbere timp de 30 de minute. Puteți utiliza julețul steril de petrol pentru conservarea materialului. Materialul este turnat în lichidul de conservare în proporție de 1:5.

3.2.2.1 Sânge

Probele de sânge integrale sunt selectate pentru hematologie, biochimie clinică, toxicologie, teste directe pentru bacterii sau paraziți, pentru PCR, studii imunologice sau pentru cultivarea bacteriilor sau virusilor. În funcție de necesitățile studiului, sângele integral, celulele sanguine și/sau mostrele de plasmă pot fi obținute din sângele integral colectat în anticoagulant adecvat. La selectarea unui anticoagulant pentru cercetare, un medic veterinar trebuie să fie conștient de metodele de testare de laborator și de posibilitatea utilizării anticoagulanților sau conservanților, deoarece unele dintre acestea pot avea un impact negativ asupra cercetării. Pentru utilizarea eficientă a anticoagulanților, este necesar ca sângele recoltat să fie amestecat complet cu anticoagulantul selectat în timpul sau imediat după selectarea acestuia.

Contaminarea microbiană și hemoliza sunt probleme semnificative, în special la primirea probelor de sânge și ser de la animalele moarte. Adesea, cauza serului și plasmei hemolizate se datorează temperaturii ridicate sau întârzierilor în separarea serului de eritrocite, prelevării de sânge utilizând un ac cu diametrul prea mic sau incapacității de a îndepărta acul în momentul transferării sângelui din seringă.

Sângele integral trebuie colectat aseptice prin venipunctura unui animal viu. În funcție de tipul de animal și probă, se utilizează venele jugulare, caudale, humerale, principale, mamare.

Sângele pentru studii serologice se prelevează în diferite tuburi, în mijlocul bolii și, în unele cazuri, din nou după 10-20 zile, câte 10 cm³ de la două sau trei animale bolnave.

Sângele de cai, bovine, cămile, caprioare, oi și capre trebuie să fie prelevat din vena jugulară în partea superioară a gâtului, în tuburi sterile de 5-7 cm³. În timpul selecției, sângele trebuie să circule liber prin pereții tubului de testare. Nu este permis ca sângele să cadă pe podea, sol.

Sângele este colectat cu ace de unică folosință în tuburi din plastic sau sticlă, sisteme vidate sau nevidate pot fi utilizate pentru colectarea sângelui. Se permite prelevarea de sânge în seringi de unică folosință de 5-10 cm³, precum și prelevarea de sânge cu ace reutilizabile, cu condiția ca acestea să fie presterilizate prin fierbere.

Părul este punctat în zona înțepăturii, pielea se dezinfectează cu alcool sau cu un alt dezinfectant autorizat destinat în acest scop.

La animale, sângele este extras din vena urechii sau vârfului urechii, la o pasăre - de la suprafața crestei, venei sau inimii prin înțepătură (cu abilități adecvate). Lâna, penele de la locul prelevării sângelui sunt tăiate (jumulte) sau rase, pielea este ștearsă cu atenție cu tampoane de bumbac îmbibate în alcool și apoi cu eter. Instrumentele (ace, bisturiu) trebuie să fie sterile.

La porcine, sângele se extrage din vena urechii sau în alt mod (din coadă, sinus ocular, din cavitatea anterioară (de preferință în poziția dorsală)). Vârful cozii este prespălat cu apă carbogazoasă și dezinfectat cu alcool. După prelevarea de sânge, vârful cozii este tratat cu o soluție de iod, ligată în mod necesar, care se îndepărtează după 10 - 12 ore.

La iepuri, o cantitate mică de sânge poate fi trasă prin incizie sau piercingul venei localizate în afara marginii subțiri a urechii. Animalele sunt înfășurate într-un prosop sau plasate într-o cutie cu o gaură pentru cap, urechea este înmuiată în prealabil cu apă caldă sau spălată cu alcool. Locul vârsării sângelui poate servi ca o venă toracică situată pe partea toracelui. După tratament (de la nivelul cotului la a treia coastă), vena este presată cu degetul în apropierea cotului. Acul este injectat împotriva fluxului de sânge. Când sângele este extras din inimă, acul este injectat în al treilea spațiu intercostal la stânga, la o distanță de 3-4 cm de marginea sternului.

Venopunctura venei infraorbitale localizate pe suprafața interioară a aripii - cea mai simplă metodă de prelevare a probelor de sânge la curcani, găini și la majoritatea speciilor de păsări de curte, la rațe, pe lângă venopunctura venei cave a aripii, sângele poate fi prelevat cu ușurință din vena subcutanată a tibiei, în apropiere de vena palpitantă. Pentru majoritatea studiilor serologice, este suficient să se obțină 2 cm³ de sânge la o pasăre.

La pui și curcani, sângele este, de asemenea, prelevat prin incizie sau scarificarea crestei (cerceilor). Gâsca și rațele se înțepă în miezul piciorului.

La găscă, rațe și curcani, sângele este extras din vena metatarsială interioară localizată sub piele pe suprafața mediană a metatarsului, mai aproape de marginea plantarului.

La vulpi, vulpi arctice, câini, sângele este extras din vena femurală.

Sângele de nurcă este transportat în capilare de sticlă. Pentru aceasta nurca este fixată și tăiată cu foarfecele la gheara sau pulpa unuia din degetele membrelor posterioare. În cazul picăturilor proeminente, înlocuiți capilarul de sticlă, ținându-l orizontal. După umplerea cu sânge, capilarul este închis dintr-o parte cu plasticină și pus într-un trepied special cu socluri numărate. După prelevare, trepiedul cu capilare este transferat într-un loc cald (de preferință într-un termostat) la $t = 38^{\circ}\text{C}$ timp de 40-50 min pentru coagularea sângelui și apoi este centrifugat la 1500-3000 rpm timp de 5-10 min. Reacția se stabilește în aceeași zi.

Sângele pentru cercetări de la pești este prelevat de la o arteră de pe branhiile sau coadă ori din inimă. La locul colectării sângelui, solzii sunt opăriți, pielea este ștearsă cu mucus și dezinfectată cu alcool de 70%. Sângele este colectat într-o pipetă Pasteur, după care este transferat într-un pahar de ceas și se selectează rapid cantitatea necesară. Sângele este livrat la laborator în recipiente ermetice sigilate într-un vas cu gheață.

Tuburile de testare, seringile de sânge sunt numerotate (numărul de ordine și numărul animalului).

Pentru a obține ser, sângele integral este colectat fără anticoagulanți și menținut la temperatura ambiantă (20-30°C) timp de câteva ore pe zi. Apoi cheagul de sânge este separat de pereții tubului de testare cu un vârf metalic (săgeată), care este ars deasupra flăcării. Tuburile de sânge sunt apoi plasate în frigider la 4-10°C. După 18-24 ore, serul separat (2-3 cm³) este turnat în tuburi sterile uscate (sau microtuburi Eppendorf) și etichetat în același mod ca tuburile de sânge. Serul pur poate fi decantat sau pipetat după îndepărtarea fizică a cheagurilor, cu centrifugare ulterioară, pentru a separa componentele celulare de ser. În absența unei centrifuge, cheagul poate fi separat prin înclinarea tubului sanguin la aproximativ 45 ° până când este posibilă separarea cheagului de suprafața tubului cu o tijă sau o pipetă sterilă și apoi îndepărtați cheagul cu forcepsul. Contaminarea bacteriană și reziduurile de eritrocite din mostrele serice pot duce la reacții eronate pozitive în timpul unei reacții de aglutinare. Studiile serologice sunt afectate negativ de hemoliza din proba serică.

Tuburile serice sunt închise cu dop și plasate în poziție verticală pentru transportare. Mostrele de sânge pot fi trimise direct la laborator în tuburi de testare sau seringi de unică folosință.

Materialul este trimis apoi la laborator în stare proaspătă sau conservată.

Serul se conservă prin următoarele metode:

- acid boric uscat (4% din volum de ser) pentru a obține o soluție saturată și pentru a forma un precipitat mic de cristale în partea inferioară a tubului de testare;
- congelare (pentru testarea infecțiilor virale - $t = -20^{\circ}\text{C}$).

Serul neconservat este potrivit pentru cercetare în decurs de 6 zile de la colectarea sângelui, dacă este păstrat la 4-8 °C. Serul conservat cu acid boric, adecvat pentru cercetare timp de 30 de zile; congelat - timp de 3-4 zile după o singură dezghețare.

Mucegaiul, germinatul, hemoliza serului nu sunt supuse cercetărilor.

Înainte de a trimite la laborator, trebuie să faceți o scrisoare de însoțire și o descriere a probelor (două copii). Prima picătură de sânge se îndepărtează cu vată sterilă de bumbac (cu excepția testelor de sânge pentru piropiasmidoză, când se ia prima picătură de sânge pentru un frotiu). Următoarea picătură liberă se ia pe un pahar pregătit în prealabil, cu o atingere rapidă și ușoară a picăturii de suprafața sa. Apoi, paharul se întoarce rapid în sus se picură între degetele mâinii stângi într-o poziție orizontală. La marginea stângă, picăturile ating un unghi de 45° cu marginea șlefuită a unei alte lame (sau capac). Atunci când picăturile sunt distribuite uniform pe marginea acestui pahar, ele sunt transportate rapid pe suprafața lamei de la dreapta la stânga, fără a atinge marginea de 0,5 - 1 cm. Lățimea frotiului trebuie să fie mai mică decât lama. Pentru fiecare nou frotiu, luați o picătură de sânge proaspăt. Frotiurile de sânge pregătite sunt uscate la aer, însă nu se recomandă să fie uscate în flăcări sau la soare. În sezonul rece, frotiurile se fac într-o cameră caldă sau în pahare încălzite.

Metoda de fixare a frotiurilor depinde de scopul studiului.

Frotiurile de sânge realizate corespunzător trebuie să fie subțiri, uniforme și suficient de lungi. Peria uscată și amprente sunt semnate cu un creion sau un indicator simplu (fibră de sticlă), indicând numărul sau numele animalului și data prelevării frotiului.

Probele de sânge trebuie colectate și distribuite cât mai încet posibil pentru a evita leziunile celulelor roșii care provoacă hemoliză. Sângele și serul sunt transportate și depozitate în formă rece sau congelată (pentru ser). Pentru unele studii, probele pot fi uscate pe o bucată de hârtie de filtru neprelucrată sau tratată special, destinată transportului și depozitării unei probe stabilizate.

Sângele se stabilizează cu acid etilendiaminetetraacetic (EDTA).

3.2.2.2 Materii fecale

Materiile fecale se pot strânge proaspăt sau se pot extrage direct din rect/cloaca, ori pot fi colectate utilizând un tampon de bumbac, dacron sau tifon, în funcție de volumul probei prevăzute de metoda de testare specifică. Probele recoltate pe frotiuri trebuie să rămână umede și să fie plasate într-un vehicul de transport (soluție sterilă, mediu de cultură care conține antimicrobieni sau stabilizatori) recomandat pentru cercetarea relevantă. Probele de fecale trebuie păstrate la frigider la $t + 4^{\circ}\text{C}$ sau în gheață și examinate cât mai curând posibil după selecție pentru a reduce la minim efectele adverse ale testelor rezultate din decesul microorganismului țintă, germinarea bacteriană sau ouăle parazite. Ambalați probele de fecale într-un pachet dublu cu capac strâns sau în recipiente etanșe, plasate apoi în pungi de plastic etanșe la aer care să prevină contaminarea încrucișată a probelor și a materialelor de ambalare. Pungile sau tuburile din plastic cu dop din cauciuc pentru transportarea materiilor fecale prelevate din rect nu sunt adecvate deoarece mostrele conțin foarte adesea bacterii gazoase care pot rupe pungile din plastic, pot muta dopurile și pot duce la scurgeri.

Materiile fecale pentru cercetare sunt trimise în pahare sterile, tuburi de testare sau borcane, acoperite strâns cu hârtie pergament. Materiile fecale de la animalele moarte pot fi trimise într-un segment de intestin legat la ambele capete.

Materialul este livrat la laborator în termen de cel mult 24 de ore de la data selecției și cu respectarea obligatorie a regimului de temperatură. Materialul nu este păstrat.

3.2.2.3 Urina

Prelevarea probelor de urină se efectuează dimineața, înainte de a hrăni animalul sau la 4-5 h după ultima urinare. Se prelevează o probă medie de urină. Prelevarea probei de urină se efectuează prin perforarea vezicii urinare, utilizând un cateter sau în mod natural. Alegerea metodei poate afecta rezultatul analizei. Prelevarea probelor urinare din ultimele două metode este însoțită de contaminare bacteriană. Urina selectată poate reflecta în mod natural modificările care apar la nivelul rinichilor sau căilor urinare inferioare. Pentru anumite boli este necesară selectarea cantității zilnice de urină, iar pentru cercetarea de rutină aceasta se selectează într-un recipient steril de 30-200 cm³. Urina este livrată la laborator în decurs de 2-4 h de la primirea acesteia sau trebuie să fie congelată. Formaldehida (1 picătură de formaldehidă de 40% per 30 cm³ de urină) sau antimicrobieni (timol, toluen, acid boric etc.) sunt utilizați pentru conservarea urinei.

3.2.2.4 Țesutul animalelor moarte

Selectarea țesuturilor din corpul unui animal trebuie efectuată doar de un veterinar și de un medic patolog calificat. Incizia patologică și anatomică se efectuează nu doar în scopul prelevării de probe, ci și pentru a furniza informații privind modificările patologice ale organismului. Aceste observații constituie o completare importantă a observațiilor epizootice și clinice într-un studiu veterinar complet al cazurilor sau focarelor de boală.

Probele de material patologic relevant sunt selectate pentru a determina sau confirma cauza bolii, moartea animalelor (păsări, animale, albine, pești) în cazul bolilor infecțioase suspecte, invazive, otrăvirea sau sacrificarea unui animal bolnav care nu a fost tratat.

Autopsia trebuie disecată în primele ore după deces, deoarece, în cazul descompunerii cadavrelor, microflora intestinală secundară contaminează toate organele și țesuturile.

În funcție de boala suspectată, de starea carcabei și de obiectele disponibile pentru prelevarea probelor post-mortem, mostrele sunt prelevate de la unul sau mai multe organe și trimise la laborator pentru a fi supuse unor teste de laborator proaspete (neconservate) sau conservate.

Organele parenchimatice și osul tubular sunt trimise la laborator pentru cercetare. Carcasele animalelor mici sau materialul patologic sunt ambalate într-un container impermeabil la apă și se adaugă la însoțitor. La selectarea materialului pentru diagnosticarea post-mortem, materialul patologic este selectat cât mai curând posibil: nu mai târziu de 12 h de la moartea animalului în timpul iernii și 6 h în sezonul cald, care este conservat sau trimis în stare proaspătă. Materialul patologic autolizat nu este adecvat pentru izolarea agenților patogeni. Mostrele de sânge sunt prelevate cu o seringă sterilă din ventriculul stâng al inimii. Puncția se efectuează după prelucrarea zonei selectate cu o soluție sterilă, umezită cu peroxid de hidrogen de 3% cu un șervețel și apoi se efectuează înlăturarea acestuia cu un țesut salin steril.

Dezinfectarea zonei selectate pentru puncție se poate realiza prin cauterizarea țesuturilor cu o spatulă. Pentru proba din ventriculul stâng al inimii cu un monovet sau o seringă sterilă, selectați 10 cm³ de sânge, care, după selectare, este transferat într-un flacon steril cu mediu dublu și închis cu un capac din tifon de bumbac. Pentru determinarea bacteriemiei, probele de sânge selectate (10 cm³) sunt transferate în recipiente pentru cultivare aerobă și anaerobă.

Mostrele (bucățile) de organe și/sau țesuturi sunt selectate la cel puțin 3-5 cm³ (în mod necesar probe din nodurile splinei, regionale și nodulilor limfatici îndepărtați, focare inflamate), fiecare plasate într-un vas separat steril (recipiente sterile de unică folosință cu dopuri care sunt înfiletate sau vase Petri cu un diametru de 55 mm. Puteți utiliza containere cu setarea de transport permisă în acest scop în modul prescris. Recipientele cu material sunt marcate cu un organ și/sau material textil.

Puroiul din cavitățile inflamate, lichidul cefalorahidian și alte lichide sunt aspirate cu o seringă sterilă de cel puțin 7 - 10 cm³ în volum și plasate în tuburi sterile de unică folosință sau lăsate în seringi sigilate cu dopuri de cauciuc steril sau în containere de transport. Probele sunt marcate.

Materialul din cadavre cu patologie purulentă-inflamatorie este livrat la laborator în termen de 1 h de la selecție. Materialul patologic lichid (sânge, mucus, urină, vezică biliară etc.) poate fi colectat în seringi de unică folosință sau pipete Pasteur care, după sigilarea materialului, evitând încălzirea, sunt sigilate la ambele capete și apoi împachetate în lână de bumbac și plasate în tuburi de testare.

În plus, diferite selecții pot fi trimise sub formă de frotiuri sau frotiu de amprentă, care sunt fixate în aer, înfășurate individual în pergament și etichetate.

Osul tubular este prelevat în mod necesar de la cadavre. Măduva osoasă din materialul patologic de prospețime nedeterminată este trimisă pentru cercetări bacteriologice. Urechea sau alte materiale sunt prelevate de la cadavre pentru a exclude antraxul.

Carcasele proaspete de animale mici, părți din carcase de animale mari și organe individuale sunt trimise în mod intenționat.

Probele proaspete sunt supuse în mod special prelucrării și depozitării lor, evitând autoliza și contaminarea agenților patogeni bacterieni și fungici. Probele selectate proaspăt sunt depozitate la o temperatură de răcire constantă (2-8°C) din momentul prelevării și până la studiu. În cazul în care nu poate fi asigurată depozitarea la rece, probele proaspete pentru anumite studii pot fi plasate în soluții speciale, cum ar fi etilenglicolul, care împiedică creșterea microorganismelor secundare. Formalina este utilizată cel mai frecvent pentru salvarea probelor post-mortem.

După prelevare, toate țesuturile reziduale sau părțile carcabei și lichidul trebuie colectate și dezinfectate prin metode adecvate sau distruse, iar secțiunea de deschidere a carcabei trebuie dezinfectată cu atenție.

Pentru examinarea bacteriologică, la laborator sunt trimise bucăți de piele, membrane mucoase, organe parenchimatice, oase tubulare, axe cerebro-spinale, ganglioni limfatici, mostre de lichid din cavitățile toracice și abdominale, segmente intestinale, ligaturi izolate, membrane fetale, fetoși. Fiecare mostră de organe este plasată într-un container separat și etichetat. În fiecare caz, este necesar să se selecteze materialul în care este posibilă identificarea modificărilor caracteristice pentru o anumită boală. Zonele de păr și piele - cu afecțiuni ale pielii.

Pentru studiile virusologice, se trimit mostre de la animale în trei stadii ale bolii:

- de la animale bolnave cu semne clinice pronunțate care indică temperatura corpului, viteza pulsului și respirația (sânge, os, ganglioni limfatici și organe afectate);
 - de la animalele ucise în stare agonizată - sânge, os, ganglioni limfatici și organe afectate;
- de la animalele aflate în stadiul de recuperare (sânge).

Pentru *examinarea virusologică*, probele trebuie prelevate cât mai curând posibil, după ce au fost identificate simptomele clinice. Probabilitatea detectării virusurilor este cel mai mare în primele 3 zile și scade brusc în următoarele 5 zile. Mostrele sunt prelevate în conformitate cu condițiile aseptice, fiecare probă fiind selectată într-un container separat cu înșurubare sterilă. Puteți utiliza tuburi de centrifugare conice sterile (15-50 cm³), care sunt înșurubate, precum și tuburi mici (4 cm³), care aduc 1-2 cm³ de mediu de transport viral. Probele sunt livrate la laborator într-un mediu de transport sau în recipiente cu gheață.

Pentru examinarea virusologică, la laborator este trimisă o soluție de glicerol proaspătă sau conservată de 30% preparată în soluție tampon de fosfat (pH 7.2-7.4) din cadavrele sau animalele sacrificate.

Pentru examinarea virusologică, materialul este ambalat într-o pungă de plastic și pus într-un balon de gheață sau conservat cu o soluție de 30-50% glicerol pur chimic în soluție salină sterilă. Salina a fost pre-autoclavată la 120 °C timp de 30 min. Sângele sau serul acestuia, clătirile nazofaringiene și alte fluide corporale, pereți, conținut de afluenți, papule (noduli), vezicule (vezicule seroase), pustule (vezicule purulente), părți ale creierului, ficatului, plămânilor, splinei sau bucăților de alte organe și țesuturi selectate în care virusul bolii suspecte este conținut în cea mai mare cantitate, în funcție de tropismul virusului.

Pentru *examinările bacteriologice și virusologice* sunt selectate zonele intestinului cu cele mai caracteristice modificări patologice. Apoi intestinalele sunt spălate de materii fecale și plasate în pahare separate de alte organe. Dacă este necesar, păstrați 40% soluție de glicerol în raportul de 1:10.

Pentru *examinarea histologică* materialul patologic este selectat doar din cadavre proaspete. În laborator, se trimit bucăți din țesuturile afectate de 3-4 cm², cu o grosime de maximum 1 cm, care se învecinează cu secțiunile de țesut nemodificate. Suprafața organului sau țesutului cadavrului din care urmează să fie prelevată proba este curățată de contaminare, prelucrată cu alcool sau coaptă cu o placă metalică încălzită (spatulă). Materialul este selectat cu instrumente sterile și pus în vase sterile (flacoane cu penicilină, tuburi de testare etc.). La selectarea materialului patologic pentru examinări histologice, trebuie luată în considerare suspiciunea de boală și rezultatele inciziei patologice și anatomice a corpului animalului. În vederea *examinării histologice*, materialul (organele și țesuturile care au marcat modificări patologice) este extras din cadavre proaspete sau animale sacrificate. Din diferite secțiuni de organe (țesuturi) cu modificări patologice (la marginea țesutului alterat patologic și plasat în apropierea celui normal), bucăți mici tăiate cu o grosime de 2×3 cm. La tăierea unei bucăți, luați în considerare structura microscopică a organelor și țesuturilor. Deci, bucățile de rinichi ar trebui să conțină straturi cortice și cerebrale. În cazul decesului animalelor mici, organele parenchimale sunt selectate întregi. La tăierea mostrelor prelevate de la un organ din aceeași structură, capsula acestuia este de asemenea capturată. Imediat după selecție, materialul este transferat fluidului de fixare, al cărui volum trebuie să fie de 10-20 de ori mai mare decât volumul de material luat. Pentru fixare se utilizează adesea o soluție de formalină neutră apoasă de 10%. În absența formalinei, se poate utiliza 96% alcool etilic. Atunci când se utilizează alcool, grosimea bucăților de țesut nu trebuie să depășească 0,5 cm. Lichidul de fixare se schimbă 24 de ore pe zi. Materialul patologic este plasat într-un recipient din sticlă sigilat.

Pentru *studiile histochimice*, materialul patologic este plasat în alcool etilic de 96%, lichid de Carnu sau lichid de Buen. Numele soluției de fixare trebuie să fie indicat pe etichetă. Pentru a preveni înghețarea materialului în timpul transportului pe timp de iarnă, materialul fixat în formalină se transferă într-o soluție de glicerol de 30-50% preparată în formalină de 10% sau în alcool de 70% sau într-o soluție de sare saturată. Materialul patologic congelat nu este adecvat pentru examinarea histologică.

Materialul patologic/biologic supus testelor genetice moleculare nu poate fi conservat de nicio substanță. Pentru *cercetarea biologică moleculară* se transmite macrobiopatul (macroautoptatul) (bucăți de țesuturi: splină, ganglioni limfatici etc.) cu o greutate de 50-100 g), ambalat în recipiente cu soluție de clorură de sodiu de 0,85% sau în mediu de transport. Depozitarea și transportul materialelor biologice pentru testarea PCR trebuie efectuate cu regim rece: probe de sânge la 2 –8 °C timp de 1 zi; mostre de plasmă și ser la 2-8 °C timp de 5 zile, la -70 °C fără restricții.

3.2.2.5 Țesutul epitelial

Efectuate pentru boli care cauzează daune țesutului epitelial, însoțite de formarea ulcerelor și abceselor (FDM, stomatită veziculară, variolă, tuberculoză etc.). De la animalele vii, sângele și mostrele de epiteliu sunt prelevate din leziuni, iar la animalele moarte sau ucise trebuie să expediați bucăți de piele de la hotarul zonelor sănătoase și afectate.

Țesutul epitelial este selectat prin biopsie sau zgârierea pielii, tamponare la nivelul gurii, nasului, faringelui și tractului gastrointestinal. Părul tăiat sau lâna pot fi utilizate pentru diagnosticarea clinică sau testarea de laborator în scopul detectării paraziților de suprafață, cum ar fi căpușele și păduchii, infecțiile fungice, bacteriene și virale, reacțiile alergice și neoplazia. Probele sunt prelevate în mod aseptice și depozitate conform studiilor preconizate. Țesuturile epiteliale asociate leziunilor veziculare și care trebuie colectate în mediile de transport viral pot fi utile în diagnosticarea de laborator a infecțiilor virale specifice (FDM, ciurma etc.).

Probele de piele sunt prelevate de la periferia leziunilor care nu au fost tratate. Crustele cu reziduuri de lână, precum și lâna, sunt scoase cu penseta din zonele contaminate (acolo unde este posibil, mai puțin contaminate). Părul este smuls și raclajele de piele sunt realizate cu un bisturiu la marginea țesuturilor afectate și sănătoase. Laboratorul trimite raclajele epidermei din leziunile și crustele periferice ale leziunii, precum și din alocarea conținutului în prezența acestora. În cazul focarelor multiple, selectarea trebuie făcută separat de focarele situate în diferite părți ale organismului. Materialul este plasat în tuburi de vată sau pungi de hârtie.

Dacă este necesar pentru realizarea studiilor pe piele, se selectează cele mai afectate părți cu o dimensiune de cel puțin 3×3 cm. Materialul este trimis într-un container steril, sigilat ermetic.

Pentru examinarea bacteriologică, lâna se prelevează din diferite locuri cu cel puțin 5 probe cu o greutate de aproximativ 2 g fiecare (este mai bine să se ia un boț de lână contaminată). Dacă lână este ambalată în ambalaje, luați cel puțin 10 probe din diferite locuri ale fiecărui pachet, precum și praful colectat în interiorul tecii. Probele dintr-un pachet sunt combinate și ambalate împreună. Fiecare probă este plasată într-un borcan de sticlă uscat și închis cu capac, plută sau pergament steril. Puteți folosi pungi de plastic care se leagă cu sfoară.

Selectați 5 bucăți cu dimensiunea de 3×3 cm din zonele periferice, neputrezite și fără zone de mușcături ale pielii. În cazul în care pieile sunt depozitate în baloți, grămezi (lot mare), cel puțin 3 probe din fiecare locație se colectează din fiecare balot și se combină într-o probă. Când în interior se depistează piele cu hemoragii sau infiltrații, probele sunt prelevate din aceste zone.

Pentru examinările bacteriologice și virusologice sunt selectate zonele intestinului cu cele mai caracteristice modificări patologice. Apoi intestinalele sunt spălate de materii fecale și plasate în pahare separate de alte organe. Dacă este necesar, păstrați soluție de glicerol de 40% în proporție de 1:10.

3.2.2.6 Probele din ochi

Probele de la suprafața ochilor se prelevează prin spălarea sau purificarea ochilor pentru selectarea celulelor, nu prin secreții mucoase sau lacrimi. Probele prelevate din conjunctivă se colectează prin menținerea pleoapei cu degetele și atingând ușor suprafața ochiului cu un tampon de bumbac, dacron sau tifon, preumedit cu o soluție salină sterilă sau cu un mediu echivalent. Astfel de frotiuri ar trebui stocate în medii fiziologice sau de transport umede, recomandate în mod special pentru cercetare. Biopsia celei de-a treia pleoape la ovine, bogată în țesut limfoid, este utilizată pentru detectarea prionilor.

Proba poate fi selectată cu un tampon steril de bumbac, o buclă bacteriologică sau un bețișor ocular steril. Secreția se extrage de la suprafața interioară a pleoapei inferioare spre colțul interior al tăieturii ochilor. Trebuie să aveți grijă ca genele să nu atingă tamponul în timpul amestecării. În absența puroiului vizibil, se folosesc tamponare umede cu soluție izotonică sterilă. Secretul din sacul lacrimal este selectat cu un tampon steril de bumbac după un masaj atent. Materialul din corneă este selectat cu o buclă de platină după analgezia locală. În prezența crustelor, acestea sunt scoase în prealabil cu o pensetă, iar mostrele sunt prelevate cu un tampon steril de bumbac umed (0,5 cm³) din ulcerări.

3.2.2.7 Probele din organele de reproducere

Fluidele și frotiurile din canalul de naștere, vagin, uter și uretră sunt utilizate pentru a studia bolile organelor de reproducere. Probele trebuie depozitate umede după colectare, plasându-le într-un mediu de transport (soluție sterilă salină sau mediu de cultură). Probele de spermă se obțin prin extrudarea artificială a vaginului sau a penisului și stimulare artificială. Trebuie evitată contaminarea probei cu soluțiile antiseptice sau de detergent utilizate pentru pregătirea animalului/locului de prelevare a probelor.

3.2.2.8 Fluidul nazal, saliva și lichidul vezicular

Pentru prelevarea probelor din secrețiile nazale, aripile nazale și partea din față a pasajelor nazale se spală cu apă, după care secreția este colectată cu tamponare sterile din porțiunile adânci ale nasului. Tamponarele sunt așezate în tuburi sterile care conțin 0,5 cm³ de soluție salină sterilă. Probele din nas sunt selectate cu ajutorul unui tampon plasat pe un mâner flexibil de sârmă. Tamponul este injectat în nară pentru

câteva secunde, paralel cu cerul gurii. Apoi, printr-o mișcare circulară, trebuie să îndepărtați încet sonda, fixând-o pe suprafața inferioară a nasului. Mostrele din ambele nări sunt prelevate cu același tampon. Tampoanele trebuie să fie în contact cu secretul timp de până la 1 minut, apoi acestea sunt plasate într-un tub de testare cu mediul de transport și trimise la laborator fără întârziere la o temperatură de transport de $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Secrețiile purulente și (sau) crustele sunt îndepărtate în prealabil cu un tampon de bumbac înmuiat în soluție salină sterilă, din interior spre exterior. Prelevarea probelor materialului se efectuează prin mișcări circulare ale unui aplicator steril cu vârful de bumbac și se plasează într-un tub steril cu mediu de transport sau într-un tub steril.

Secrețiile sunt preluate direct din flacon sau tub ori prin utilizarea unui tampon. Lichidele selectate furnizează o sursă extrem de concentrată de agenți patogeni pentru testarea diagnosticului și sunt colectate din vezicule nedescoperite cu un ac și o seringă sterilă și sunt transferate imediat într-un flacon sau un tub bine sigilat. Pentru prelevarea probelor de material celular și a mucoasei din faringele animalului se folosesc instrumente specifice (tampon de probă). Hamurile de bumbac pe care animalele le mestecă sunt folosite pentru prelevarea salivei de la porcii domestici.

3.2.2.9 Sputa

Sputa se prelevează cel mai bine înainte de a hrăni animalele dimineața. Înainte de prelevare, este necesar să se spele bine cavitatea bucală a animalului bolnav cu apă curată (vitelor nu li se permite să amestece sputa cu guma). Sputa se obține prin prelevarea probelor conținutului cavității bucale după tuse. Dacă selectarea în acest mod nu este posibilă, atunci probele din tractul respirator superior se obțin cu ajutorul sondelor traheobronice (sau tuburilor elastice) și conținutul se extrage. După selecție, sputa este plasată într-un vas curat, uscat, cu gât larg sau într-un vas Petri. Materialul selectat trebuie investigat cât mai curând posibil. Sputa se păstrează la $3-6^{\circ}\text{C}$ timp de 6-8 ore. Sputa bovinelor se colectează prin metoda tusei, înfășurând o bucată de pânză în jurul nasului și gurii și strângând orificiile nazale. După tuse, pe pânză se observă o cantitate mică de spută. Pe o placă pot fi colectate cantități mari de spută prin forțarea unui animal să tușească în timp ce își ține limba departe de gură, înclinându-i capul în jos. După tuse, mucozitatea rămâne pe peretele faringian și, în unele cazuri, între limbă și molar. De acolo se prelevează cu un tampon sau o pânză sterilă de tifon, care este trimisă într-un recipient steril la laborator. Mucozitatea poate fi colectată din trahee prin introducerea unui tampon steril pe sârmă prin traheotub.

3.2.2.10 Laptele

Pentru diagnosticarea anumitor boli infecțioase, probele de lapte prelevate individual de la fiecare animal sunt trimise la laborator într-un container curat și etichetat. Dacă este necesar, grupurile sunt alcătuite din mostre de lapte în conformitate cu procedurile adecvate.

Înainte de prelevarea probelor de lapte de la vaci, ugerul se spală cu apă caldă; mameloanele sunt tratate cu alcool de 70° . Din fiecare porțiune a ugerului se iau ultimele porțiuni de lapte de 10-15 cm³ în tuburi sterile separate, cu dopuri de cauciuc.

La ovine și caprine, mostrele de lapte sunt prelevate prin înțeparea ugerului. În acest scop, animalul este fixat în poziție laterală, ugerul de la baza mamelonului este frecat cu alcool de 70° și uns cu tinctură de iod. O seringă sterilă cu un ac este punctată la baza mamelonului și după ce acul intră în rezervor (după cum este considerat de mișcarea liberă a capătului acului), laptele este injectat în seringă și transferat într-un tub steril cu dop de cauciuc.

Laptele este amestecat bine înainte de prelevare. Proba se prelevează cu un tub metalic cu diametrul de 9 ml, scufundat vertical în partea inferioară a rezervorului. Deschizătura superioară este închisă cu un deget, tubul este îndepărtat din rezervor, iar laptele este turnat într-un recipient închis strâns. Pentru studiu, proba medie de lapte este de 250-500 cm³.

Probele de lapte de o zi se conservează cu o soluție de formalină de 40%, la o rată de 1-2 picături per 100 cm³ de lapte.

Probele de lapte sunt depozitate și livrate la laborator timp de 3-4 ore din momentul eșantionării în recipiente speciale care asigură o temperatură care să nu depășească $4-10^{\circ}\text{C}$ sau într-un vas de înghețată.

Este interzisă trimiterea laptelui de la vaci în primele 2 săptămâni după fătare.

3.2.2.11 Probele din abcese, ganglioni limfatici și scurgeri din plăgi

Lâna la locul leziunii este tăiată, învelișul pielii este tratat cu alcool de 70% și uns cu iod.

Apoi se aplică o seringă sterilă cu o înțepătură mare de ac și puncția se transferă într-un tub steril cu dop de cauciuc. Secreția purulentă și crusta trebuie îndepărtate cu un tampon de bumbac înmuiat în soluție salină sterilă, de la centru la periferie. Prelevarea probelor materialului se efectuează prin mișcări circulare, cu un aplicator steril cu vârf de bumbac și se plasează într-un tub steril cu mediu de transport sau într-un tub

steril prelevat în laborator. Întreaga suprafață a abcesului se dezinfectează, se face o puncție a pielii, colectând substanța în seringă. În același mod, selecția va conține pustule și vezicule. Puroiul din abcese deschise, apostază și scurgerile din răni se colectează cu un tampon steril de la adâncime.

Materialul din ulceratii și plăgi se obține prin intermediul răzuirii la hotarul țesuturilor afectate și sănătoase.

Când puncția se extrage din ganglionii limfatici, animalul este bine fixat, la locul puncției lâna este extirpată, pielea este ștearsă cu un tampon de bumbac înmuiat în alcool sau soluție de iod. Cu mâna stângă trageți un ganglion limfatic și țineți-l între degetul mare și arătător.

Apoi se inserează un ac steril în adâncimea nodului, se pune o seringă pe el și se aspiră limfa. Seringa este debransată, acul este extras, iar conținutul pistonului seringii se strânge pe o lamelă din sticlă. Se face un frotiu subțire și se usucă. Locul puncției se dezinfectează cu soluție de iod. Bălegarul, secrețiile din diferite cavități, orificii naturale sunt trimise sub formă de frotiuri pentru examinare microscopică (pentru detectarea microorganismelor, paraziților).

Puneți paharele fierse anterior timp de 10-15 minute într-o soluție apoasă de sodiu de 1.2%, apoi spălați-le bine cu apă curată și ștergeți-le. Paharele uscate sunt plasate într-o soluție de alcool-eter, luat în proporții egale și sunt stocate pentru utilizare.

Probele din rănilor purulente sunt colectate prin seringă cu sau fără ac prin aspirație, închisă cu un dop de cauciuc steril sau injectată cu un ac într-un dop de cauciuc steril.

În cazul în care bălegarul este foarte gros, acesta este răzuit și colectat într-un container steril de unică folosință sau pus într-un tub sau container uscat steril de unică folosință cu ajutorul unui tampon steril (bumbac, viscoză, alginat).

În timpul operației de prelevare a probelor, bucățile de țesut (3-5 cm³) sunt plasate într-un container steril sau într-un container din sticlă, se adaugă 3-5 cm³ de soluție salină nebacteriostatică pentru a împiedica uscarea materialului.

3.2.2.12 Oase

Oasele tubulare cu capete intacte sunt curățate de mușchi și tendoane, trimise într-o pungă de plastic sigilată.

De la animalele mici, puteți selecta o bucățică mică de coaste sau oase tubulare, curățându-le în prealabil de mușchi și cartilaje. De la animalele mari este posibilă raclarea unui țesut de măduvă osoasă din orice os tubular, scapulă, vertebră sau os toracic cu un cuțit sau un bisturiu. Pentru a face aceasta, este necesar să dezgoliți suprafața articulară, să tăiați cartilajul și cu ajutorul capătului unui cuțit sau a unui bisturiu, prin rotire, să raclați și să puneți într-o sticlă numărul necesar (5-10 g) de oase și țesut cerebral. Oasele pot fi conservate, de asemenea, cu sare de bucătărie [turnând sare peste materialul osos și înfășurându-l etanș (împachetându-l)].

3.2.2.13 Probele din creier

Materialul patologic (cerebral) este selectat de la animale cu semne clinice de deteriorare a sistemului nervos central. Creierul pentru studii histologice, electro-microscopice și imuno-chimice este selectat imediat după sacrificare sau decesul animalului până la debutul lizei de țesut sau reproducerii altei microflore asociate.

În acest scop, este necesar să detașați capul de gât de-a lungul joncțiunii atlanto-occipitale și să-l fixați bine. Scoateți pielea și mușchii din craniu, făcând incizii între cavitățile oculare și de la acestea până la nivelul gâtului. Pentru a scoate craniul folosiți un ferăstrău, un topor, foarfece și pensete. Separați nervii principali, scoateți creierul și puneți-l într-o casetă sau pe o placă. Prelevați probe din cortexul cerebral și bazele măduvei spinării. Pentru cercetări privind rabia, este necesară selectarea mostrelor din coarnele amon. În acest scop, este necesar să deschideți secțiunile longitudinale ale fiecărei emisfere centrale la o distanță de 2 cm (pentru câini) de la linia mediană a creierului, pentru a scoate părțile superioare la distanța (spațiul) corespunzătoare, în care sunt coarnele amon, care sunt corpuri semicilindrice de culoare albă. Ar trebui să luați câteva bucăți de coarne amon și baza măduvei spinării. Greutatea totală a fiecărei mostre trebuie să fie de 5-10 g. Separat de cadavru, capul este împachetat într-un ambalaj din plastic, plasat într-o cutie de metal cu gheață și transportat la laborator la 2-5 °C.

3.2.2.14 Prelevarea probelor pentru boli suspecte cu semne de leziuni ale sistemului nervos

În bolile însoțite de semne de deteriorare ale sistemului nervos (Tesch, boala Aujeszky, otita medie, rickettsioza, encefalomielita bovină sporadică, rabia etc.), creierul, osul, ganglionii limfatici, sângele și, dacă sunt prezente, alte organe pentru prelevarea probelor. Sângele prelevat de la animalele bolnave trebuie de asemenea trimis pentru a detecta anticorpi în reacțiile serologice. Pentru rezultate convingătoare,

este de dorit să se trimită mostre de sânge de la un număr mare de animale bolnave (până la 10 probe). Pentru rabia suspectată, este necesar să se trimită întregul cap ori de câte ori este posibil, fără a recurge la prelevarea probelor pe creier. În cazul în care la laborator este trimis un cap întreg, acesta trebuie ambalat în hârtie, împachetat suplimentar într-o pungă de plastic, pus într-o găleată sau într-o cutie etanșă și livrat de urgență la laborator. Prelevarea probelor pe creier poate fi efectuată doar pentru a asigura siguranța personalului care lucrează cu acest material și pentru a dezinfecta apoi locul de muncă. Probele cerebrale pot fi prelevate doar de un specialist care nu are leziuni pe mâini, și care trebuie să poarte mănuși de cauciuc și să fie vaccinat împotriva rabiei. Personalul care nu este implicat în această operațiune ar trebui să fie departe de acest loc de muncă.

3.2.2.15 Probele prelevate de la albinele melifere

Pentru studii bacteriologice, microscopice, serologice, biologice, chimice și de alt tip, se prelevează probe din albinele vii și corpurile acestora; faguri de miere cu puieți, miere, pergament; larve de albine uscate, fecale sau raclaje din scaun; frotiuri de hemolimfă sau amprente musculare pe lamelă; fărâmituri ceroase de la fundul stupilor; insecte parazite și dăunători de albine. În funcție de tipul și metoda de cercetare, se selectează între 50 și 500 de albine vii/moarte provenind din diferite familii, mostrele de 10×15 cm de fagure de miere cu larve și pupe moarte, gunoiul de la fundul stupilor de albine (nu mai puțin de 200 g din stupină), primăvara - larvele de albine de pe un fagure de miere cu mărimea de 3×15 cm, 200 g de miere nesigilată, 50 g de pergament din fagurele de miere. Materialul patologic este ambalat și trimis în conformitate cu următoarele reguli: albinele vii sunt plasate în pahare, care sunt legate de două straturi de tifon sau pânză; mostrele din celule de puieți și ramele din fagure de miere sunt trimise în plăci sau lăzi de lemn, fără a le împacheta, dar care se separă una de cealaltă și de pereții lăzii cu benzi de lemn; albine bolnave vii - pe rame celulare fixe cu hrană în cantitate suficientă pentru timpul transportului, în pungi de lemn și lăzi de lemn. Albine moarte și resturi de la fundul stupilor - în pungi de hârtie. Miere – în pahare bine închise.

3.2.2.16 Probele prelevate de la pești

Peștii bolnavi sau suspectați de boli infecțioase și invazive sunt trimiși în viață la laborator. Pentru studiu sunt selecționați 15-20 de indivizi cu semne bine definite ale bolii.

Peștele este transportat în căzi curate sau în alte rezervoare destinate transportului peștilor vii umplute cu un volum de $\frac{3}{4}$ de apă din același rezervor din care a fost selectat peștele sau dintr-o fântână arteziană. Peștii trimiși la laborator în hârtie, tifon sau alte materiale de ambalare nu sunt adecvați pentru cercetare.

Pe timp de vară, în cazul transportării îndelugate, apa cu peștele se răcește treptat la o temperatură de 12-15°C, adăugând bucăți mici de gheață. Pentru a evita șocul de temperatură, peștii nu pot fi plasați într-o apă mai rece decât într-un rezervor (7°C sau mai mult). Dacă nu este posibil de trimis pește viu, atunci din peștele de dimensiuni mari se prelevează bucăți din organele și țesuturile afectate. Mostrele sunt plasate într-un vas steril din sticlă, turnate într-o soluție sterilă de glicerol apos de 40%, sigilate și livrate la laborator. Sângele, exudatul, conținutul intestinal se trimite în pipete Pasteur sterile sigilate. Vara, materialul patologic este adecvat pentru examinare bacteriologică în decurs de 2 ore de la colectarea sa. Iarna mostrele pot fi congelate.

Pentru examinarea virusologică, peștii vii sunt ambalați într-o pungă dublă de plastic umplută cu $\frac{1}{3}$ volum de apă și plasați în gheață. Pachetul este ambalat într-o cutie și livrat la laborator. Peștii morți sunt trimiși doar dacă au fost uciși după ce au fost prinși înainte de a fi trimiși la laborator. Peștele selectat este ambalat într-o pungă de plastic, care este pusă într-un vas cu gheață. Pentru examinarea virusologică, probele de organe interne (organe din 5 pești sunt combinate într-una singură) sunt colectate aseptice și plasate într-un flacon steril, închis strâns și plasat într-un termos sau într-un pachet de gheață.

Dacă nu este posibilă expedierea imediată, ambalajul este păstrat în frigider la temperaturi care nu depășesc + 4°C în timpul zilei. Materialul patologic rezultat de la un pește bolnav sau suspectat de o infecție virală poate fi păstrat în soluție tampon de glicerol cu fosfați (pH 7.2-7.4) de 50%. Materialul pentru examinarea histologică este prelevat de la peștii amoriți bolnavi. Peștii mici (tineri, anuari) după deschiderea cavității abdominale sunt fixați în întregime și se prelevează organe sau bucăți mari de organe cu mărimea de 2×3 cm, cu o grosime de 0,5-1 cm.

Bucățile din organele afectate sunt tăiate, capturând țesutul normal și deteriorat.

Indiferent de gradul de deteriorare, probele sunt prelevate din diferite organe (piele cu mușchi, branhii, ficat, splină, inimă, intestine, vezică de înot, creier).

Intestinul se taie sau se fac mai multe tăieturi înainte de fixare pentru a permite lichidului de fixare să pătrundă în cavitatea sa. Creierul se înlătură integral după deschiderea cutiei craniene. Mostrele sunt plasate într-un borcan de sticlă cu gât larg și sunt fixate.

Pentru studiile biochimice, în sânge se adaugă lămâie sau sodiu oxalic (1 cm³ - 2 cm³), soluție de heparină (1 cm³ - 0,01-0,04 cm³) de 1 - 2% și se livrează la laborator în pahare sigilate ermetic (tuburi de testare) cu etichete. În cazul unei otrăviri presupuse a peștilor, probele de apă sunt prelevate din rezervoare direct la locul morții peștilor, din apele menajere provenite de la întreprinderile industriale și de la obiectele agricole situate în apropierea bazinului hidrografic al rezervorului.

3.2.3 Biopsia

Biopsia este o procedură de diagnostic care implică extragerea celulelor sau țesuturilor prelevate pentru examinare, în scopul determinării prezenței și extinderii unei boli. Biopsiile se efectuează în mod obișnuit pentru diferențierea dintre afecțiunile incendiare, canceroase sau alte stări.

Tipuri de proceduri de biopsie:

1. biopsia excizională – întreaga tumoarea este eliminată;
2. biopsia incizivă – se colectează puține probe mai mici;
3. biopsia cu ac fin – citologie – probă sau lichid colectat în principal cu ac.

1. Biopsia excizională

Aceasta este o abordare comună pentru îndepărtarea masei în medicina veterinară, dar rămâne controversată. Aceasta poate oferi un diagnostic și, prin urmare, un plan terapeutic, dar masa este îndepărtată fără a cunoaște tipul tumorii. Este mult mai invazivă.

În aceste zile se recomandă o procedură de biopsie mai puțin invazivă pentru îndrumarea medicului veterinar în alegerea metodei adecvate de rezecție chirurgicală, care poate fi mai potrivită pentru menținerea unei marje adecvate de țesut.

Biopsia excizională este rezervată cel mai bine în cazurile în care marjele chirurgicale adecvate pot fi atinse cu ușurință numai prin biopsie (de exemplu, masă cutanată mică pe trunchiul unui câine).

a. Prelevarea probelor

Prelevarea probelor are loc sub anestezie generală. Înaintea intervenției chirurgicale trebuie determinate marginile chirurgicale; în general – 1 cm în masă benignă, 3 cm în tumori agresive. Odată colectat și pregătit corespunzător, histopatologul face o evaluare.

b. Pregătirea și fixarea

Timpul dintre prelevare și fixare trebuie să fie minimizat. Proba de biopsie ar trebui introdusă într-un dispozitiv de fixare cât mai curând posibil după procedură. Proba nu trebuie să fie necrotică.

Atunci când evaluarea marjei este importantă, trebuie marcate marjele craniene și caudale (de exemplu, prin suturi sau cerneală).

Probele mai mici (3-5 mm) ar putea fi fixate în întregime. Probele mai mari trebuie tăiate cel puțin în jumătate înainte de fixare sau de pregătirea secțiunii mai mici de țesut. Dacă proba este înconjurată de capsule groase, aceasta trebuie de asemenea tăiată (Fig. 1). Fixarea poate fi efectuată cu 10% de formalină tamponată, alcool sau prin congelarea la temperaturi scăzute (-80 °C). Trebuie utilizate cel puțin 10 volume de formalină pentru 1 volum de țesut (Fig. 2).



Fig. 1. Biopsia excizională. Tumoarea pe partea dreaptă trebuie tăiată cel puțin în jumătate sau feliată în bucăți mai mici.

Penetrarea fixativă este de obicei legată direct de grosimea țesutului. Dacă speciemenle sunt foarte mari, este nevoie de mult timp ca fixativul să penetreze partea interioară a probei. Ca urmare, autoliza poate avea loc în centrul țesuturilor groase.

c. Transportarea

ONU 3373 - Substanță biologică, Categoria B. Probele histopatologice trebuie transportate în conformitate cu 49 CFR, Partea 173.199 sau Instrucțiunea de ambalare IATA 65.

Orice ambalaj pentru substanțe biologice trebuie să conțină trei componente: - un receptacol primar: tubul, flaconul sau alt recipient fabricate în mod tipic din sticlă sau plastic rigid (inclusiv dopul, capacul sau alte elemente de închidere) care este în contact direct cu specimenul (**Fig. 2 și 3**); - un ambalaj secundar (inclusiv periferia și alte materiale) care încapsulează complet receptacolul primar (**Fig. 3 și 4**); - un ambalaj exterior pentru transport sau tranzit.

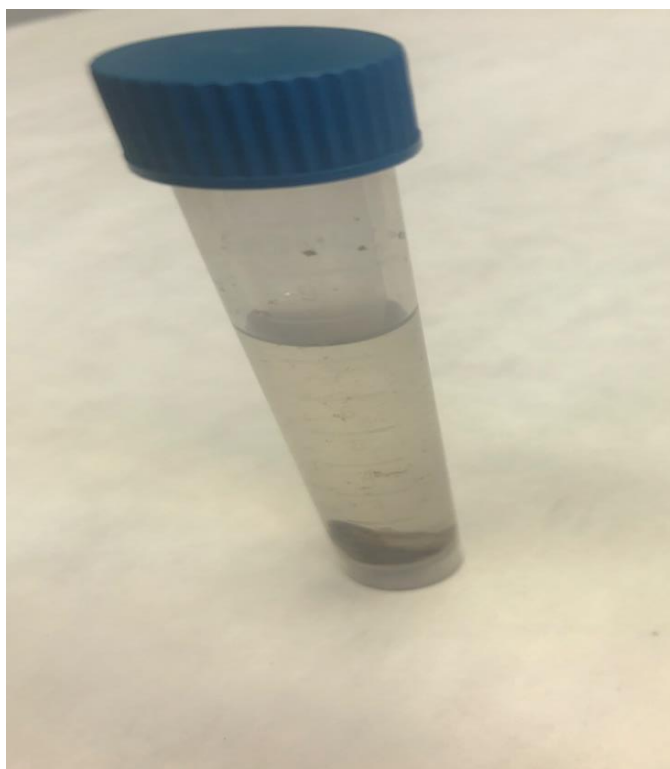


Fig. 2. Ambalaj primar, s-a utilizat o cantitate suficientă de formalină



Fig. 3. Amortizarea ambalajului



Fig. 4. Ambalare secundară cu amortizare vizibilă

2. Biopsie incizională

Biopsia incizională se efectuează atunci când tehnicile mai puțin invazive cedează în fața diagnosticului. Biopsiile cu pană și puncție sunt exemple de tehnici de biopsie incizională.

Aceasta este în mod special utilă pentru diagnosticarea tumorilor moi, friabile, inflamate și/sau necrotice. Hotarul dintre țesutul sănătos normal și țesutul anormal ar putea fi de asemenea examinat, ceea ce permite patologului să determine gradul de invazie a tumorii în țesutul normal.

a. Prelevarea probelor

Prelevarea probelor are loc sub anestezie generală. Biopsia incizională variază în dimensiune (de exemplu, 2-10 mm). Materialul a cărui volum este mai mic de 3 mm poate fi prea mic pentru evaluarea histopatologică și trebuie evitat. În mod tipic, se colectează o biopsie de la 4 până la 8 mm. Odată colectat și pregătit corespunzător, histopatologul îl evaluează.

b. Pregătirea și fixarea

Agenții de fixare sunt aceeași ca și în timpul biopsiei excizionale. Probele mici ar putea fi plasate direct în caseta de histologie.

Mostrele foarte mici (< 3 mm) pot fi ușor pierdute în timpul expedierii sau în timpul prelucrării, deoarece eșantionul a scăzut în timpul fixării și prelucrării. Acest tip de probe ar putea fi plasate pe hârtie înainte de fixare (hârtia pentru mănuși chirurgicale este adecvată). Probele extrem de mici ar putea fi vopsite cu eozin sau cerneală disponibilă comercial (de exemplu cerneală din India).

c. Transport

Transportul este același, ca în cazul biopsiei excizionale.

3. Citologie

Citologia este o procedură rapidă, rentabilă, puțin invazivă, utilă pentru diferențierea bolilor non-neoplazice de bolile neoplazice și, în multe situații, pentru obținerea unui diagnostic definitiv. Acesta are un risc relativ scăzut de complicații.

Citologia este rezervată, de obicei, pentru masele cutanate și subcutanate, lichide (efuziuni, fluide comune, lichid cefalorahidian, lavaje bronhoalveolare, urină și spălături prostatice), dar organele interne pot fi de asemenea examinate prin prelevare probelor cu ultrasonografie sau ghidare tomografică computerizată.

Tehnica biopsiei citologice necesită o cantitate minimă de țesut prelevat, însă lipsa unei arhitecturi a țesuturilor organizate împiedică clasificarea tumorilor. Unele tipuri de tumori, în special tumorile mezenchimale (adică sarcomele), nu exfoliază bine celulele, ducând la probe slab celulare și rezultate fals negative. Interpretați cu precauție aspirațiile negative sau aspirațiile cu rezultate dubioase și, dacă este necesar, efectuați tehnici de biopsie mai agresive.

a. Prelevarea probelor

Citologia prin aspirație

Aspirația cu ac fin (FNA) este cea mai frecventă tehnică de biopsie utilizată pentru masele pielii, ganglionii limfatici și organele interne. Pentru colectarea probei se pot folosi diferite tehnici. După colectarea probei, trebuie făcut frotiul.

- **Metoda exclusivă cu ac.** Aceasta este utilizată în mod obișnuit pentru masele delicate, moi și ganglionii limfatici. În timpul acestei tehnici proba se colectează fără seringă, numai cu ac (dimensiune 20-23 G; 0,9-0,6 mm). Acul este deplasat înainte și înapoi, fiind direcționat în multe direcții în interiorul tumorii. Metoda exclusivă cu ac duce la acumularea probei în butucul acului (Fig. 5).



Fig. 5. Metoda exclusivă cu ac

- **Metoda de aspirație continuă.** Aceasta este recomandată pentru masele mai ferme sau mai puțin exfoliative. În procesul acestei tehnici proba se colectează cu seringă (2,5-5 ml) și acul (dimensiunea 20-23 G; 0,9-0,6 mm). Acul este deplasat înainte și înapoi, fiind direcționat în multe direcții, în timp ce aspirația se aplică prin retragerea pistonului. Aspirația este eliberată înainte de scoaterea acului din tumoare (Fig.6).



Fig. 6. Metoda de aspirație continuă

Citologia frotiului de amprentă

Această metodă este utilizată pentru leziunile ulcerate superficiale sau pentru citologia intraoperatorie în timpul operației. Această probă poate să nu fie reprezentativă pentru întreaga tumoare.

Înainte de procedură, suprafața leziunii trebuie curățată. Lama de sticlă trebuie aplicată ușor pe masă și îndepărtată rapid. Pe o singură lamelă ar putea fi realizate mai multe imprimări. În cazul în care materialul colectat este gros, trebuie făcută o denigrare suplimentară (Fig. 7).

Trebuie menționat faptul că această metodă este perfectă pentru o parte superficială a leziunilor sau a citologiei intraoperatorii. Proba nu este reprezentativă pentru întreaga leziune.



Fig. 7. Citologia frotiului de amprentă

Citologia de răzuire

Citologia de răzuire poate fi împărțită în două tipuri principale. Răzuirea superficială ne oferă informații despre epidermă, zgârieturi profunde - despre dermă.

Citologia exfoliativă

Studiul microscopic al celulelor vărsate sau obținute din organism, de exemplu lichid, urină, CSF, ureche sau citologie vaginală.

b. Pregătirea și fixarea

Frotiul ar trebui să fie subțire, frotiul gros deseori nu este reprezentativ. Există două tehnici principale de preparare a frotiului:

- tehnica efectuării frotiului de sânge. O mică picătură de depozit trebuie plasată aproape de capătul lamei de sticlă. Picătura trebuie să fie atinsă de cea de-a doua lamelă. A doua lamelă trebuie împinsă pe suprafața primei lamele (Fig. 8).

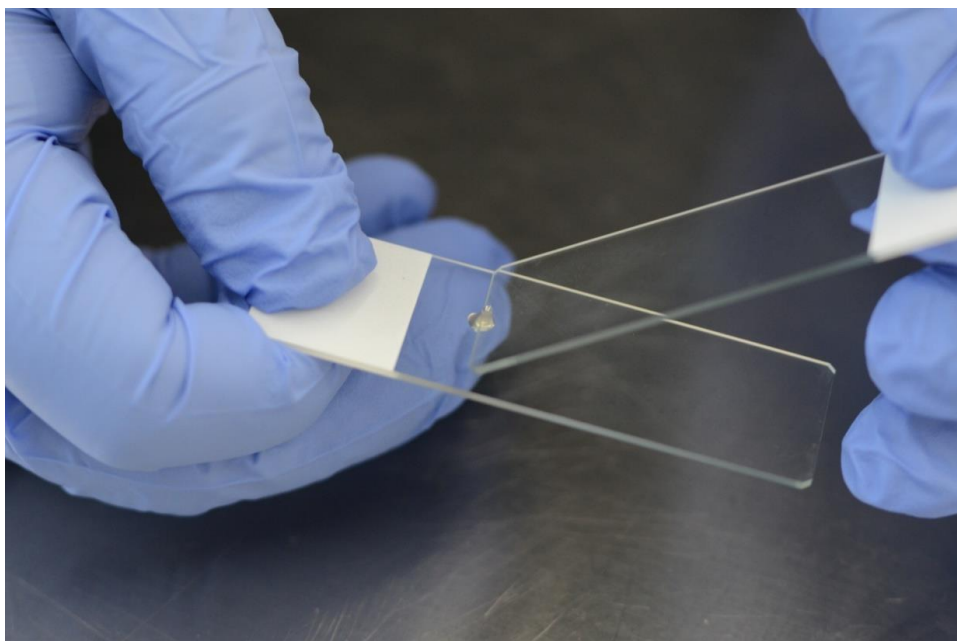


Fig. 8. Tehnica efectuării frotiului de sânge

- pregătirea strivirii. Materialul colectat trebuie plasat pe prima lamelă. A doua lamelă ar trebui strivită de prima lamelă și apoi – **trasă** (Fig. 9).

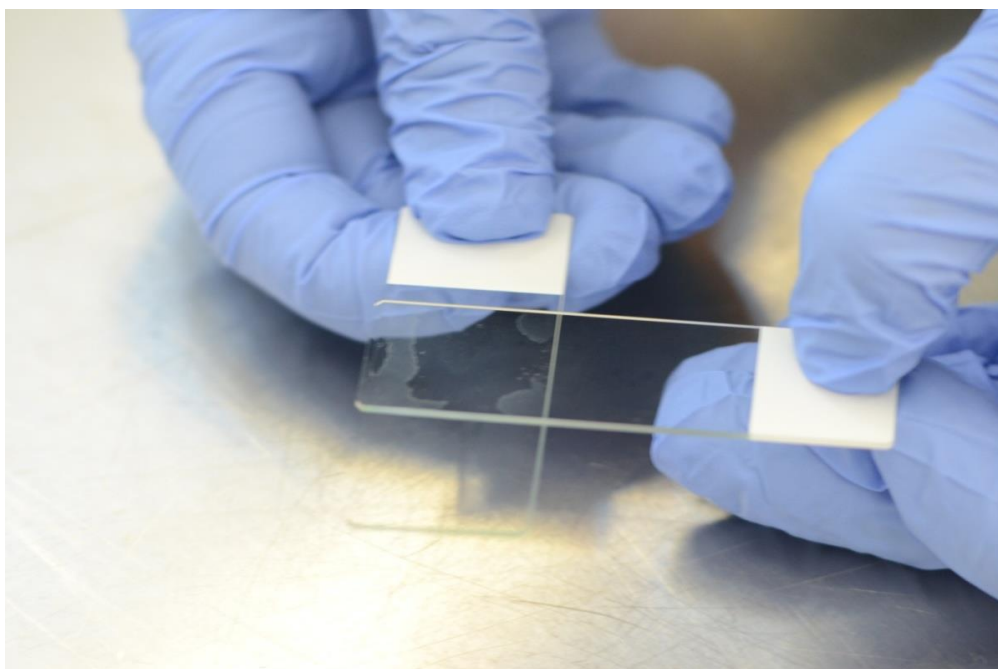


Fig. 9. Pregătirea strivirii

Proba trebuie să fie uscată la aer și fixată. Fixarea ar putea fi cu alcool sau spray fixativ comercial.

Există o mulțime de metode de colorare. Una dintre cele mai populare este varianta comercială Romanowsky de colorare Diff-Quick®, utilizată în mod obișnuit în colorarea citologică pentru colorarea rapidă și diferențierea unei varietăți de frotiuri.

c. Transport

În cazul în care este necesar transportul, trebuie utilizat containerul corespunzător (trusa de transport) (Fig.10).



Fig. 10. Trusa de biopsie citologică

3.3 Agronomie

3.3.1 Solul

Pregătirea solului pentru analiză

Pentru a determina compoziția chimică a solului și proprietățile fizice ale acestuia, se prelevează probe de teren din locuri omogene în relief, vegetație și stare agrotehnică.

Probele de sol sunt prelevate cu sonda lui Nekrasov, Kaczynski sau altele, sau direct din gropi. Pe un lot care are un teren plat, probele sunt prelevate diagonal, pe o suprafață incongruentă, de asemenea, diagonal, dar de la fiecare caracteristică a solului. Probele sunt prelevate din adâncimi adecvate și din mai multe puncte mixte și fiecare probă mixtă se prelevează într-o probă medie de 1 kg, transferată într-o pungă cu etichetă pe care se indică numărul câmpului creionului de grafit, gropi, adâncimea probei, numele gospodăriei și semnătura persoanei care a semnat.

În timpul studierii urmelor mari de teren, probele sunt prelevate din orizonturi genetice - separat de toate tipurile detectate de sol din teritoriu.

Selectarea probelor de sol din tăietură (pe exemplul solului sod-podzolic). Pe peretele frontal al tăieturii utilizând o bandă de măsurare sau un metru de lemn divizați profilul în orizonturi genetice, în jurnalul de teren sau în registru trebuie să indicați indicii lor (NO, E, I, P) și adâncimea apariției. Apoi, aceștia curăță peretele (de sus în jos) și marchează cu un cuțit larg locurile în care vor fi prelevate probele. Probele sunt prelevate din partea inferioară în sus, de la orizontul inferior și se încheie cu partea superioară (strat arabil). Probele sunt prelevate ca monoliți din mijlocul orizontului genetic cu 10 cm în lungime, 8 – 10 cm în lățime și 6 - 8 cm în grosime. Două probe sunt prelevate în stratul arabil - de la o adâncime de 0 – 10 cm și 10 - 20 cm și unul la sub-suprafață - din mijloc. În orizontul iluvial (I), în funcție de dimensiunea acestuia, se prelevează două probe: în părțile inferioare, medii și superioare. Fiecare probă este plasată într-o pungă numerotată, unde se plasează o etichetă pe care se înregistrează adresa, numele câmpului sau al experimentului, numărul secțiunii, orizontul, adâncimea prelevării probelor, data și denumirea executantului. În laborator, solul se zdrobește, se usucă la aer, se selectează reziduuri de plante și se cerne printr-o sită cu orificii de până la 1 mm.

Pregătirea probelor de sol pentru analiza de laborator

Probele de sol selectate sunt plasate în pungi de hârtie sau saci de pânză și etichetate. Eticheta indică locația și adâncimea probei, numărul probei sau suprafața de testare, precum și data finalizării și semnătura. Toate înregistrările sunt realizate cu un creion simplu (non-chimic). Fiecare probă trebuie să aibă două etichete - una

înăuntru, iar cealaltă în afară. Se recomandă ca probele cu structură neperturbată să fie prelevate în cilindri sau cupe de aluminiu în ordinea numerelor cilindrilor, specificând în același timp în raportul de teren numărul cilindrului, locația, adâncimea și data prelevării probelor. Mostrele sunt apoi plasate în boxe speciale și transportate la laborator fără șocuri sau lovituri accidentale severe.

În laborator, probele de sol sunt uscate la aer, într-o încăpere uscată, bine ventilată și protejată de accesul vaporilor de acizi, amoniac și alte gaze în cameră, până la o stare uscată. Pentru a usca solul, se întinde un strat de 2-3 cm pe o foaie de hârtie groasă, zdrobind ușor bucățile mari. Probele uscate sunt plasate în cutii de carton și depozitate până la cercetare.

Majoritatea analizelor de sol sunt efectuate în specimene uscate la aer. Se prelevează o probă medie din proba de sol uscată. Pentru a realiza acest lucru, proba este bine amestecată, împrăștiată pe hârtie sub formă de pătrat sau dreptunghi și divizată diagonal în patru părți egale. Două părți opuse sunt turnate într-o cutie de carton, iar celelalte două sunt amestecate. Operațiunea se repetă până când greutatea probei medii este de 300-400 g, iar solul care nu este inclus în proba medie nu se freacă.

Pentru determinarea humusului și a azotului total, proba medie se prepară după cum urmează. Solul este presărat cu un strat uniform de hârtie sub formă de dreptunghi, care este ulterior divizat în linii verticale și orizontale în pătrate mici cu dimensiunea de 3x3 sau 4x4 cm și din fiecare pătrat se ia o spatulă mică de sol, care este turnată într-o singură probă astfel încât masa sa să fie de aproximativ 5-10 g. Probele selectate în acest mod selecționează cu atenție rădăcinile (cu pensetă și buclă). Apoi solul este turnat într-un mojar de agat și este cernut printr-o sită cu orificii cu diametrul de 0,25 mm. Proba rezultată este depozitată într-o pungă de hârtie. În mod similar, se prelevează o probă medie pentru a determina distribuția dimensiunii particulelor pe sol, masa acesteia fiind de 30–40 g. Este necesar să turnați această parte a solului în porțiuni mici într-un mojar de porțelan cu vârf de cauciuc, să o cernați printr-o sită cu orificii cu diametrul de 1 mm și să o depozitați într-o pungă de hârtie. Preparați restul probei de sol (250-350 g) în același mod și păstrați-o într-un pahar cu dop rodat. Din această parte a probei vor fi prelevate mostre pentru alte teste de laborator.

Prelevarea probelor pentru determinarea proprietăților solului în condiții de laborator

Prelevarea probelor pentru determinarea gravității specifice a solului

Pentru a determina gravitatea specifică, se utilizează un picnometru sau un balon de măsurare cu o capacitate de 100 cm³. Principiul metodei este de a determina volumul unei bucăți de sol în funcție de volumul apei dislocate. Selectați solul uscat. Cantitatea de sol uscat din proba pentru analiza de laborator trebuie să fie de 10 g. Cantitatea de sol absolut uscat din 10 g de aer uscat poate fi determinată prin umiditatea higroscopică, calculată ca procent de sol uscat la aer.

Prelevarea probelor pentru determinarea masei în vrac (volumului)

Masa volumetrică a solului – este masa în grame/1 cm³ de sol cu structură neperturbată, adică masa de 1 cm³ de sol împreună cu porii săi. Masa în vrac depinde de compoziția mineralogică, granulometrică și structurală a solului și de cantitatea de materie organică din acesta. Masa în vrac este întotdeauna mai mică decât masa specifică și variază de la 1-1,8. Există două metode de prelevare a probelor de sol:

Metoda 1: Metoda cilindrică: Introduceți un cilindru metalic cu diametrul de 10 cm cu un volum de 1 dm³ într-un sol cu structură neperturbată. Săpați solul în jurul cilindrului, tăiați cu atenție partea de jos și scoateți cilindrul. Tăiați cu atenție solul proeminent din cilindru, chiar și cu marginile acestuia. Atunci când se efectuează operațiunile de mai sus, trebuie să se asigure că structura solului nu este perturbată și că solul nu se scurge din cilindru. Corectitudinea rezultatelor obținute depinde de acest lucru. Dacă solul se scurge parțial din cilindru, atunci trebuie să fie prelevată o nouă probă. Cilindrul trebuie închis cu un capac pentru ca solul să nu se scurgă din el. După aceasta, cilindrul cu sol trebuie cântărit. Cântăriți cilindrul gol cu capacul și din solul care face obiectul studiului, luați o probă pentru a determina umiditatea. Cunoscând greutatea cilindrului gol și greutatea acestuia în sol, puteți calcula greutatea volumului de sol prelevat.

Metoda 2. *Metoda de tratare cu parafină*: Din solul structurii neperturbate tăiați sub formă de bilă sau altă formă cu dimensiunea de 5x5 cm și cântărită pe scara tehnică sau electronică. Parafina topită se prepară la o temperatură ce depășește temperatura punctului de topire cu aproximativ 2-3°C. O bucată de sol este apoi scufundată în parafină pe o parte sau pe cealaltă pentru a crea un film cu parafină pe suprafața solului. După formarea a 5-10 straturi de parafină, solul cu filmul de parafină este răcit și cântărit. Diferența dintre greutatea parafinei (n) și greutatea pre-parafinei (m) este greutatea parafinei (n-m). Pentru a găsi volumul ocupat de parafină (WP), greutatea parafinei trebuie să fie împărțită la gravitatea specifică (P), egală cu 0,89.

Prelevarea probelor pentru determinarea conținutului de umiditate din sol

Determinarea umidității câmpului și umidității higroscopice

Umiditatea câmpului caracterizează cantitatea de apă din sol în timpul prelevării probelor. Prin definirea acesteia, noi aflăm despre umiditatea totală a solului și dinamica acestuia în timpul sezonului de cultivare a plantelor.

Umiditatea higroscopică pentru plante este inaccesibilă și reprezintă o alimentare cu apă moartă în sol. Cantitatea de umiditate higroscopică din fiecare sol depinde de conținutul de humus, distribuția granulometrică și prezența sărurilor higroscopice. Cu cât în sol este mai mult humus și coloizi minerali, cu atât mai mare este cantitatea de umiditate higroscopică.

La determinarea umidității câmpului, luați în cutii câte 10-20 g de sol și 3-5 g de sol uscat în aer (atunci când se determină umiditatea higroscopică), acoperiți-le cu capac și determinați umiditatea în conformitate cu metoda de analiză.

Prelevarea probelor pentru determinarea capacității de umiditate a solului

La determinarea capacității totale și capilare de umiditate a solului, trebuie să luați probe de sol cu structură neperturbată. Însă în laborator se determină uneori conținutul de umiditate al solului în probe care au o structură distrusă, și anume sunt turnate și cernute printr-o sită cu orificii de 1 mm.

Prelevarea probelor pentru determinarea conținutului de umiditate capilară din sol. Puneți un cerc de hârtie de filtru în grilă, umeziți-l cu apă distilată, puneți grila pe cilindru și cântăriți contragreutatea cu cea mai apropiată valoare de 0,01 g. Apoi, scoateți grila, inserați cilindrul în mandrina de găurit și prelevați o probă de sol la o adâncime dată de sonda Nekrasov sau Kaczynski. După prelevarea probei, scoateți cilindrul din cartușul de găurit, închideți capacul și duceți-l la laborator.

Prelevarea probelor pentru determinarea conținutului total de umiditate din sol. Prelevarea probelor de sol se efectuează în același mod ca și în cazul prelevării probelor pentru determinarea capacității de umiditate capilară a solului.

Prelevarea probelor de sol pentru indicații biologice după acțiunea erbicidelor

Probele sunt prelevate prin eșantionarea aleatorie din analizele convenționale ale solului și agrochimice. Marginile câmpurilor, ascensiunile, locațiile posibilelor opriri ale stropitorii și alte locuri în care pot fi acumulate erbicidele trebuie selectate separat pentru analiză.

Probele de sol pentru indicații biologice sunt selectate prin metoda „plicului”.

În cazul cultivării normale a solului, probele sunt prelevate în straturi: 0-10, 10-20, 20-30 cm. Folosind tehnologia zero, proba este prelevată într-un strat de 10-15 cm.

Proba comună (pentru selectarea strat cu strat, fiecare strat separat) trebuie să fie de cel puțin 5 dm³ (=5l). Pe suprafețele netratate a fost prelevată o probă de control din sol (5 dm³).

Prelevarea probelor și pregătirea solului pentru analiza granulometrică

O probă de sol din zona studiată cu o greutate cuprinsă între 0,5 și 2,5 kg se usucă la aer și se împărștie pe o bucată de hârtie sub formă de pătrat. Proba de sol se împarte apoi diagonal în patru părți utilizând o tijă de sticlă. O parte este complet îndepărtată, cântărită și trecută printr-o sită cu orificii de 10, 7, 5, 3, 2, 1 mm. Cernerea tuturor părților din proba de sol selectată cu o greutate aproximativă de 100 g se efectuează treptat, în porțiuni mici, separat, prin fiecare sită. Reziduul particulelor agregate din fiecare fracțiune de pe o sită se transferă într-o cană de porțelan pre-cântărită (sau pe o foaie de hârtie rugoasă) și se cântărește pe un cântar. Conform datelor obținute, se calculează procentul fiecărei fracțiuni în raport cu masa probei de sol prelevate.

Pregătirea solului pentru analiza granulometrică (după NA. Kachinsky)

Pregătirea de bază a solului pentru analiză este distrugerea prealabilă a agregatelor de sol. În acest scop, acesta este fărâmițat într-un mojar de porțelan cu vârf de cauciuc și este cernut printr-o sită cu orificii cu diametrul de 1 mm. Partea scheletică rămasă după cernerea prin sită se spală de particulele de lut, uscate, cântărite și calculate ca procent din greutatea totală a solului uscat. Apoi se continuă prepararea chimică în conformitate cu metoda lui NA. Kachinski. Aceasta depinde de prezența carbonatului de calciu și magneziului în sol.

Pregătirea solului fără carbonat

Un lot de sol de 10 sau 20 g este turnat într-o cupă de porțelan (cu cât compoziția granulometrică a solului este mai ușoară, cu atât este mai mare lotul de sol care trebuie luat) și porțiunile sunt turnate acolo dintr-un vas de măsurare de 200 ml cu acid clorhidric 0,05 n, amestecând cu o tijă de sticlă cu vârf de cauciuc, ceea ce permite să se așeze la fund; ulterior, suspensia se filtrează printr-un filtru de densitate medie umezit cu apă distilată, cu densitatea medie calibrat la un volum de 300 ml. Ultima porțiune de acid, împreună cu solul, se transferă într-un filtru și se spală cu apă distilată de până la 300 ml, evitând turbiditatea. În cazul în care în balon există o turbiditate care indică trecerea coloizilor prin filtru, spălarea este oprită. Apa de spălare împreună cu filtratul trebuie să fie egală cu 300 ml. Filtratul este complet amestecat și utilizat pentru a determina pierderile rezultate din tratarea

solului cu acid clorhidric și cantitatea de baze absorbite. Amploarea pierderilor rezultate din tratarea cu acid clorhidric are o importanță independentă. Acesta caracterizează prezența sărurilor și carbonaților ușor solubili în sol.

Cu o pipetă, 50 ml de filtrat se colectează și se transferă într-o cupă de porțelan pre-cântărită, pusă într-o baie de apă, se evaporă, se usucă într-un cuptor de uscare timp de 2 ore, se răcește într-un desicator și se cântărește pe un cântar analitic. Calculele se efectuează după formulă.

Pregătirea solului carbonat

Un lot de sol de 10 g este tratat într-o cupă de porțelan de 0,2 n HCl, care se umple de fiecare dată cu aproximativ 50 ml de acid. Solul tratat cu prima porțiune de acid se amestecă cu o tijă de sticlă de 5-6 ori timp de o oră. După aceasta, lichidul este turnat de pe un stick printr-un filtru cu densitate medie într-un balon volumetric de 500 ml și se asigură că tot solul rămâne în cupă. Se adaugă o nouă porție de acid. Dizolvarea carbonaților se repetă până la încetarea formării bulelor de CO₂. După turnarea ultimei porțiuni de acid, cupa de sol este lăsată peste noapte pentru dizolvarea finală a carbonaților și apoi spălată cu 0,05 n HCl până când nu apare nicio reacție la calciu.

Testul de calciu. Colectați din pâlnie aproximativ 3 ml de filtrat și neutralizați-l cu o soluție de amoniac de 10%, care va conferi acestuia din urmă un miros specific, se acidifică cu câteva picături de acid acetic de 10%, se adaugă într-un tub de testare de 2 ml de soluție saturată de oxid de amoniu și se încălzește până a fierbere. Dacă în filtrat există calciu, precipitații de CaCrO₇ se vor precipita.

În prezența calciului, solul este încă tratat cu acid clorhidric. Dacă nu este calciu, se permite ca acidul clorhidric să se scurgă complet din filtru. Filtratul determină cantitatea de substanțe dizolvate din acid. Pentru a realiza acest lucru, măsurați volumul acestuia, sau ajustați-l la nivelul de 500 sau 1000 ml și amestecați bine. Se pipetează 25 ml și se evaporă într-o cană pre-cântărită.

Solul din filtru se spală cu apă într-un balon conic de 500 ml, adăugând treptat 0,1 n NaOH la o reacție ușor alcalină. Suspensia se fierbe ca în prepararea solului fără carbonat.

Pregătirea solului pentru analiza granulometrică prin frecarea cu soluție de pirofosfat de sodiu

Dintr-o probă de sol uscată în aer, cernută printr-o sită cu orificii de 1 mm, se prelevează o probă de 10 g, cântărită cu o precizie de aproximativ 0,01 g și se plasează într-o cupă de porțelan cu un diametru de 10-12 cm. Într-un pahar mic se toarnă un volum mic de pirofosfat de sodiu de 4%. Pentru solurile nesărate și fără gips cu compoziție granulometrică ușoară, pentru solurile argiloase, lut și carbonat se iau - 10 ml și pentru solurile saline și gips - 20 ml.

O bucată de sol este umezită cu o picătură de soluție de pirofosfat de sodiu într-o stare asemănătoare pastei și cu atenție, fără presiune, se freacă cu vârful de cauciuc timp de 10 minute. După măcinare, în cupă se toarnă reziduul unei soluții de pirofosfat, se adaugă apă distilată și se amestecă cu același pistil cu vârf de cauciuc. După măcinare, în cupă se toarnă reziduul soluției de pirofosfat, se adaugă apă distilată și, amestecând cu același pistil, amestecul se aduce într-o stare de suspensie. Reacția de saturație a complexului absorbant de sodiu din sol este prin ecuație.

3.3.2 Semințele

3.3.2.1 Prelevarea de probe de semințe și plante pentru analiză

Un lot de semințe este un anumit număr de semințe omogene de aceeași cultură, soi, reproducere, puritate varietală, calități fizice, an de recoltare și aceeași origine, numerotate și certificate prin documentele corespunzătoare. Mărimea lotului depinde de mărimea semințelor (de la 250 centnere (cereale) la 2 centnere (tutun)). Pentru a analiza calitățile fizice și de însămânțare a semințelor din oricare lot de semințe, este necesar a se prelua un eșantion mediu din acesta – adică un eșantion relativ mic de semințe, care ar trebui să caracterizeze toate caracteristicile unui lot mare de semințe.

Precizia în prelevarea eșantionului mediu poate fi obținută numai atunci când eșantionul nu este prelevat dintr-un singur loc, ci numai dacă acesta este format dintr-un număr mare de eșantioane mici – sondări din diferite părți ale lotului de semințe. Aceasta explică complexitatea metodei de prelevare a eșantionului mediu și selectarea eșantioanelor.

Precizia selecției eșantionului mediu este afectată de următoarele: prelevarea unui eșantion din prea multe semințe, dimensiunea necorespunzătoare a eșantionului mediu și încălcarea regulilor de selectare a acestuia (un număr mic de locuri pentru sondare) .

Eșantioanele medii pentru determinarea calității semințelor sunt prelevate din loturile de semințe pregătite, adică curățate, sortate, uscate (în caz de umiditate ridicată), cântărite, numerotate și etichetate conform formei stabilite.

Formarea eșantionului inițial începe cu sondarea.

Înainte de sondare, lotul de semințe este inspectat cu atenție, acordându-se atenție culorii semințelor, luciului, mirosului, formării de cocloașe, umezelii și omogenității, verificați toate documentele pentru semințele în cauză.

Dacă un lot de semințe cântărește mai mult decât unitatea de control stabilită pentru această cultură, lotul este mai întâi împărțit în părți (unități de control), și apoi se stabilește numărul de sondări pentru fiecare dintre ele pentru a forma eșantionul inițial.

Concomitent cu inspecția preliminară a semințelor, verificați condițiile de depozitare a acestora (procedura de depozitare, îngrijirea acestora, starea de depozitare). Toate caracteristicile identificate ca urmare a inspecției sunt înregistrate în procesul-verbal de eșantionare. După aceea, treceți la sondare.

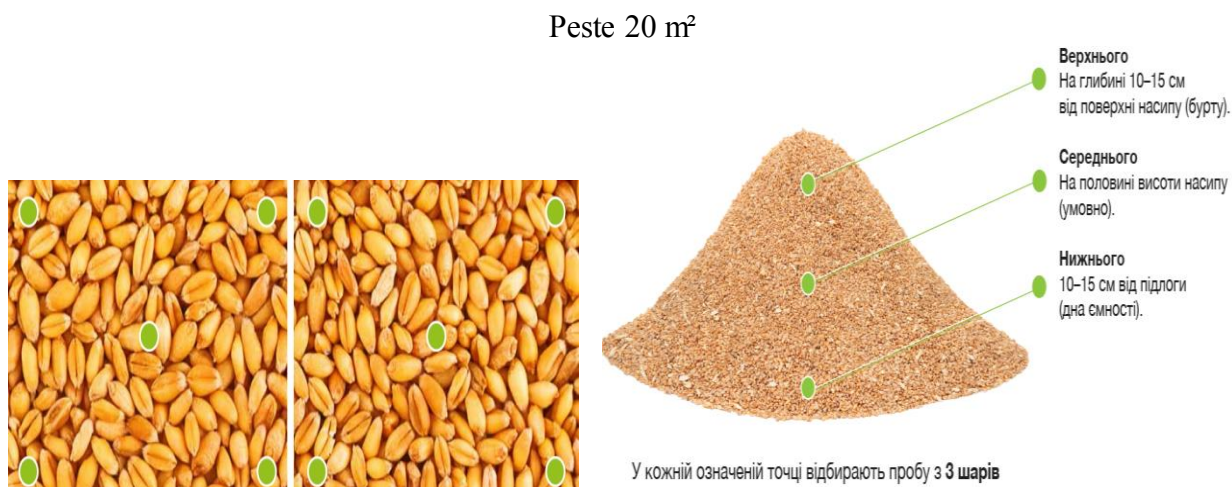
Sarcina principală atunci când efectuați sondarea este de a identifica corect locurile pentru selectare. Este necesar să respectați următoarea ordine: să luați probe din trei straturi - partea superioară, medie și inferioară.

După evaluarea omogenității semințelor din fiecare eșantion, acestea sunt combinate pentru a obține eșantionul original. În cazul unei diferențe accentuate între eșantioane, în funcție de numărul de semințe, acestea se împart în două sau mai multe unități de control și din fiecare se formează un eșantion original.

Din eșantionul inițial obținut sunt prelevate două eșantioane medii prin secțiune transversală: unul pentru determinarea umidității și deteriorării de organism dăunătoare (care este introdus într-un vas de sticlă bine închis și astupat cu ceară sau parafină), al doilea - pentru determinarea calităților fizice și de însămânțare a semințelor.

Probele punctuale din lotul în vrac

Probele punctuale sunt prelevate din fiecare compartiment sau strat sub formă de plic în cinci locuri pentru loturi cu dimensiuni de până la 20 t sau 20 m² de suprafață. Dacă suprafața semințelor este mai mare ca suprafață și greutate decât cea stabilită anterior, aceasta este împărțită condiționat în secțiuni, de aproximativ 20 m fiecare, și se va selecta din fiecare în cinci locuri.



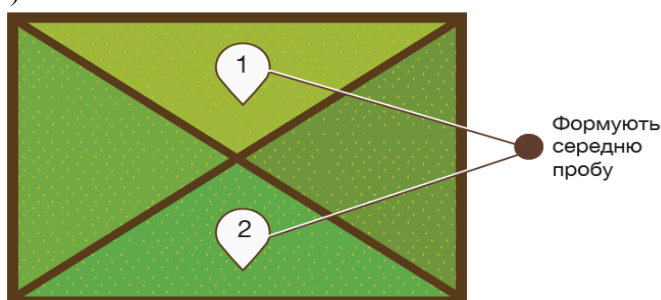
Selectarea probelor punctuale din saci

Greutatea eșantionului mediu ar trebui să fie de până la 2 kg

Numărul de saci / containere, buc.	Numărul de probe, buc.
Pînă la 5	Din fiecare container, dar nu mai puțin de 5
De la 6 pînă la 30	Din 5 containere sau cîte una din fiecare al treilea, dar nu mai puțin de 5
De la 30 pînă la 400	Din 10 containere sau cîte una din fiecare al cincilea, dar nu mai puțin de 10
Mai mult de 400	Din 80 containere sau cîte una din fiecare al șaptelea, dar nu mai puțin de 80

Formarea unui eșantion mediu

Semințele sunt turnate pe o suprafață separată și așezate uniform într-un pătrat. Acestea sunt împărțite în patru părți cu ajutorul unor plăci de lemn (rigle). Două părți opuse se combină și se indică informațiile de pe ambalajul de marcă, celelalte două sunt îndepărtate (depozitate la fermă). Selectarea eșantionului mediu este posibilă și atunci când se utilizează un separator de cereale (DP-5, DP-10 sau alte modificări).



Eșantionarea materialului vegetal

La prelevarea materialului vegetal, câmpul trebuie inspectat cu atenție pentru a determina abaterile de la plantele dezvoltate în mod normal. Plantele ar trebui selectate de pe un câmp în zece locuri diferite (numărul probelor punctuale poate varia în funcție de dimensiunea câmpului și de abaterile existente) - numai de la 20 pînă la 100 de bucăți, în funcție de cultură și de faza de dezvoltare:

Planta	Etapă de dezvoltare	Partea plantei	Numărul de plante pentru analiză
Porumb	În faza de germinare (mai puțin de 30 cm)	Toată partea superioară de la suprafața solului	20-30
	Înainte de căderea paniculei	Frunza superioară, complet dezvoltată	15-25
	De la faza de apariției a paniculei pînă la faza în care coloanele pistilului devin maronii	Frunza întreagă de lângă știulete	15-25
	Nu este recomandată selectarea după ce mătasea devine maronie		
Soia și alte leguminoase	În faza de germinare (mai puțin de 30 cm)	Toată partea superioară de la suprafața solului	20-30
	Etapă inițială a înfloririi	2 sau 3 frunze complet dezvoltate din partea superioară a plantei	20-30

	Nu este recomandată selectarea după începutul umplerii păstăilor		
Grâu, secară, ovăz, orz	În faza de germinare (mai puțin de 30 cm)	Toată partea superioară de la suprafața solului	50-100
	Alungirea tulpinii	Frunzele mature superioare sau frunza flag	20-30
	Nu este recomandată selectarea după alungirea tulpinii		
Floarea-soarelui	În faza de germinare	Toată partea superioară de la suprafața solului	15 -20
	Fazele vegetative până la faza de înflorire completă	Frunzele noi și cele complet mature	25-30
Cartof	În faza de germinare	Toată partea superioară de la suprafața solului	20-25
Analiza pentru prezența nitraților	Fazele vegetative până la faza de înflorire completă	Frunzele noi și cele complet mature	25-30
	Apariția tuberculilor	Lujer	25-30

Pentru a asigura condiții optime pentru plante în timpul transportării, este necesar să lăsați cel puțin 100 g de sol în stratul rădăcinii. Dacă plantele sunt de dimensiuni mari, organele afectate și neafectate (rădăcini, tulpini, frunze, flori și fructe) ar trebui separate. Materialul selectat trebuie ambalat în saci/cutii care să protejeze plantele în timpul transportării.

Selectarea materialului vegetal pentru a stabili tipicitatea

Stabilirea tipicității materialului vegetal din floarea-soarelui și porumb se efectuează în timpul fazelor (faza de germinare - maturitate fiziologică).

Se recomandă prelevarea eșantioanelor în mănuși de cauciuc, care trebuie șterse cu alcool etilic înainte de fiecare eșantionare. Uneltele trebuie, de asemenea, tratate cu alcool în cazul utilizării acestora în procesul de selectare (foarfece, cuțit).

Pe diagonala câmpului, se vor selecta 60 de frunze sau alte părți de la diferite plante. Fiecare parte a plantei trebuie plasată separat într-o pungă de plastic curată. Materialul vegetal al fiecărui eșantion de testare (60 de părți de plante) trebuie plasat într-o pungă de marcă și să fie completată integral eticheta.

Proprietățile fizico-mecanice ale semințelor și eșantionarea pentru determinarea acestora

Prelevarea de probe pentru determinarea greutateii a 1000 de semințe în culturi

Masa a 1000 de semințe reprezintă greutatea acestora, adică este legată de dimensiunea și densitatea structurii lor interne și, prin urmare, determină rezerva de substanțe nutritive acumulate în semințe. Semințele grele sunt de obicei mai pline, asigură o germinare mai mare și o creștere mai bună a plantelor. Masa a 1000 de semințe este necesară pentru a determina necesarul de sămânță pentru însămânțare.

Determinarea masei a 1000 de semințe prin umiditatea condiționată se efectuează în paralel cu analiza purității lor. Din fracția de semințe pure se vor cântări, fără prelevare de probe, două eșantioane a câte 500 de semințe, eroarea nedepășind 0,01 g, și dacă diferența dintre rezultatele cântăririi nu depășește 3%, masa a 1000 de semințe se va calcula ca media aritmetică a celor două eșantioane. Dacă diferența dintre rezultatele cântăririi este mai mare de 3%, se face a treia determinare, și masa a 1000 de semințe se va calcula în baza a două probe cu cea mai mică

diferență. Masa absolută a semințelor, reprezintă masa a 1000 de semințe exprimată la substanța uscată. Acest indice este calculat prin formula:

$$A = \frac{a \cdot (100 - V)}{100}$$

unde A – masa absolută a semințelor, g; a – masa a 1000 de semințe la umiditate reală, g; V – umiditatea semințelor, %.

Prelevarea de probe pentru a determina natura boabelor

Natura boabelor (masa hectolitică) este masa unui anumit volum de boabe, adesea de 1 litru, exprimată în grame. Aceasta depinde de forma și mărimea boabelor: bobul alungit are adesea o masă hectolitică mai mică decât bobul scurt. Odată cu creșterea umidității, masa hectolitică scade. Semințele pline se caracterizează printr-o masă hectolitică mai mare; semințele subțiri, mai puțin pline au o masă hectolitică joasă. Masa hectolitică se determină cu ajutorul unei balanțe speciale - condrometru. Masa boabelor într-un litru al dispozitivului reprezintă masa hectolitică (Tabelul 1).

Tabelul 1 Natura boabelor (g per 1 litru) unor cereale

Cultură	Înaltă	Medie	Joasă
Grâu	>785	725-785	< 725
Secară	>730	685-730	< 685
Orz	>605	545-605	< 545
Ovăz	>480	420-480	< 420

Prelevarea de probe pentru a determina puritatea semințelor

Pentru a determina puritatea semințelor este necesar de separat din eșantionul mediu, prin prelevarea de porțiuni sau cu ajutorul unui separator, două porțiuni cu masa de: pentru porumb, mazăre, fasole și alte culturi cu semințe mari - 200g; pentru grâu, orez, orz, ovăz, hrișcă - 50g; mei - 20g; in - 10g; trifoi, lucernă - 5g. Fiecare porțiune, cernută printr-o sită cu găuri corespunzătoare pentru selectarea semințelor mici și mari, este așezată pe o placă pliantă sau o foaie de hârtie și separată cu grijă cu o spatulă, delimitând cele două fracții principale: a) semințe ale culturii principale; b) impurități.

Semințele culturii principale includ: semințe bine dezvoltate, indiferent de culoare, insuficient de pline, fără embrion sau cu embrion parțial deteriorat: cu 1/3 sau chiar mai puțin din endosperm sau cotiledoane; fără înveliș sau cu înveliș crăpat, crăpate, în care capătul a străpuns învelișul, dar încă nu a ieșit din sămânță.

Impuritățile includ: semințe din cultura principală de dimensiuni mici, sistave, germinate, putrezite și afectate de dăunători, dacă se pierde mai mult de 1/3 din semințe; semințe de buruieni, semințe de alte plante de cultură, materii inerte.

Prelevarea de probe pentru a determina capacitatea germinativă și energia germinativă a semințelor

Capacitatea (facultatea) germinativă a semințelor înseamnă numărul de semințe din eșantion, care produc germeni normali, exprimat procentual la numărul total de semințe din eșantion. Energia germinativă a semințelor reprezintă procentul numeric de semințe germinate normal, într-un timp stabilit pentru fiecare cultură. Cu cât energia germinării semințelor este mai mare, cu atât mai repede și mai simultan apar germenii după însămânțare. Când se prelevează probe pentru determinarea capacității de germinare, se folosesc semințele culturii principale, obținute după

determinarea purității acestora, numărînd, pe rînd, patru probe, fiecare a câte 100 de semințe. Pentru culturile cu semințe mari, numărul semințelor din eșantion este redus la 50. Semințele sunt germinate în vase Petri plasate în termostate la o anumită temperatură.

Pentru a determina calitatea transportării semințelor, eșantionarea trebuie efectuată în așa fel încât probele prelevate să fie reprezentative pentru întreaga cantitate de semințe. Testarea calității semințelor se efectuează pe o parte a eșantionului reprezentativ. Prin urmare, o metodologie de eșantionare precisă din punct de vedere tehnic este foarte importantă, astfel încât rezultatele testării semințelor să fie valabile. Eșantionarea și testarea semințelor fac parte din procesul de achiziție a semințelor, dar pot fi utilizate și de personalul de urgență și de oficialii locali pentru a verifica calitatea semințelor înainte de livrarea către fermieri sau pentru a verifica calitatea semințelor dacă acestea au fost păstrate în depozite mai multe luni.

Scopul eșantionării este obținerea unui eșantion potrivit ca mărime pentru testare și obținerea unui eșantion reprezentativ pentru lotul testat. Toate eșantionările trebuie efectuate rapid, cu expunere minimă la aer, pentru a minimiza modificările umidității semințelor, dacă anume acest lucru urmează să fie testat. Sondatorilor li se amintește că orice mutare și așezare a semințelor în containere poate face ca semințe mai ușoare, goale, să se amplaseze cu ușurință la suprafață, astfel că amestecarea chiar înainte de prelevarea probelor este importantă pentru a asigura o reprezentare exactă a întregului lot de semințe.

Probele primare sunt porțiuni mici de semințe prelevate aleatoriu din lotul de semințe. Toate probele primare prelevate dintr-un lot de semințe sunt apoi combinate și amestecate pentru a forma *proba compusă*. **Probele compuse** sunt reduse la un eșantion mai mic numit *proba expedită*. **Probele expediate** (de laborator) sunt porțiuni de semințe care sunt trimise la laborator pentru testare. **Probele de lucru** (de analiză) sunt subprobe ale probei expediate și reprezintă porțiunea de semințe pe care se efectuează analiza.

Se pot utiliza următoarele intensități de eșantionare:

Nr. de containere	Nr. de eșantioane
1-4 containere	3 probe elementare din fiecare container
5-8 containere	2 probe elementare din fiecare container
9-15 containere	1 probă elementară din fiecare container
16-30 containere	15 probe elementare din lotul prelevat din containerele selectate aleatoriu, cu cel mult 1 probă din fiecare container
31-59 containere	20 probe elementare din lotul prelevat din containerele selectate aleatoriu, cu cel mult 1 probă din fiecare container

Probele primare

Metoda de obținere a probelor primare trebuie să îndeplinească standardele ISTA (2015). *Alberta* (standardele de testare a semințelor adoptate de Guvernul Alberta, Canada) recomandă utilizarea unui trier/sonde de eșantionare sau eșantionarea manuală pentru un proces necostisitor, dar eficient de eșantionare. Eșantioanele primare efectuate manual trebuie prelevate din mijlocul containerului, dacă se ia doar o probă, de sus și de jos dacă se iau 2 probe, de sus/mijloc/jos dacă se iau 3 probe etc., pentru a asigura un eșantion compus reprezentativ.

Probele compuse

Probele primare sunt combinate și amestecate bine pentru a face o probă compusă uniformă. Pentru a reduce proba compusă la dimensiunea probei expediate trebuie utilizată o metodă aleatorie.

Proba expedită trebuie transportată într-un container intact, închis ermetic, cu cât mai puțin aer posibil. Pungile de plastic tip Ziploc nu sunt recomandate și sunt acceptabile numai pentru perioade de depozitare foarte scurte de <1 oră.

Flacoanele din sticlă, borcanele din sticlă cu capac de cauciuc sau pungile din folie termoizolate sunt recomandate ca recipiente care sunt cel mai adesea închise ermetic la temperatura camerei, pungile din folie termoizolate fiind cea mai fiabilă și mai rentabilă opțiune.

Trebuie depuse toate eforturile pentru a începe testele de germinație în termen de 2 săptămâni de la primirea probei expediate. Depozitarea intermediară se va realiza în condiții de refrigerare. Testele de umiditate trebuie începute în termen de 24 de ore de la primirea probei expediate; cu toate acestea, probele trebuie aduse la temperatura camerei înainte de deschiderea containerelor.

Cel mai bun moment pentru prelevarea probelor este în timpul sau imediat după curățarea semințelor. Acest lucru reduce numărul de găuriri sau atingeri a semințelor după efectuarea testului. De asemenea, oferă un mod ideal de a obține un eșantion reprezentativ bun. Cu toate acestea, dacă credeți că lotul de semințe poate avea o capacitate redusă de germinare, testarea ar trebui făcută înainte de curățarea semințelor. Acest lucru minimizează cheltuielile și oferă timp pentru obținerea semințelor de înlocuire. Când testul se efectuează înainte sau după curățarea semințelor, este probabil ca tava germinativă sau temperatura solului să fie mai mare decât la semănat. Acest lucru nu contează întrucât scopul este de a identifica numărul plantulelor normale și acest lucru nu este afectat de temperatură.

Prelevarea de probe

Cheia unui bun test de germinare este obținerea unui eșantion reprezentativ. Testul ar trebui efectuat pentru fiecare lot de semințe de 20 de tone. Eșantionarea trebuie să fie aleatorie și să includă numeroase probe pentru a oferi cele mai bune rezultate. Ar trebui prelevate cantități mici (1 cană) de semințe de fiecare dată când semințele sunt mutate (din curățătorul de semințe, depozit sau camion) sau din saci diferiți. Nu se vor preleva probe din siloz, deoarece este periculos și dificil să obțineți un eșantion reprezentativ. După combinarea în vrac a sub-probelor, acestea se amestecă bine și se ia un eșantion de semințe de 1 kilogram.

Apendice

Probă compusă - probă care se obține prin amestecarea probelor primare extrase din containerele cu lotul de semințe în scopul testării.

Probă primară - porțiune mică de semințe prelevată dintr-un punct dintr-un lot de semințe în timpul procesului de eșantionare.

Eșantionare - Metoda prin care se prelevează un eșantion reprezentativ dintr-un lot de semințe pentru a fi trimis la laborator pentru analiză.

Probă expedită - probă transmisă la laboratorul de testare. Aceasta trebuie să aibă cel puțin dimensiunea specificată în reglementările ISTA și poate cuprinde fie toată proba compusă, fie o sub-probă din aceasta.

Sub-probă - porțiunea probei obținute prin reducere utilizând una dintre metodele de eșantionare prescrise în reglementările ISTA.

Referințe

International Rules for Seed Testing ISTA (2009): International Seed Testing Association, Switzerland.

International Rules for Seed Testing, 2004 Edition, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland

Quality Declared Seed: Technical Guidelines for Standards and Procedures, 2006, FAO Plant Production and Protection Paper 185 Rome Italy

3.3.2.2 Prelevarea și determinarea parametrilor de calitate a semințelor

Procedurile standard pentru evaluarea și sortarea calității semințelor care se bazează în principal pe evaluarea proprietăților fizice, morfologice și fiziologice variate ale semințelor sunt utilizate în multe laboratoare agricole din lume. În prezent a apărut necesitatea elaborării unor metode mai precise, rapide și nedistructive de evaluare a calității semințelor. Machine vision (vedere artificială) sau sistemul computerizat de analiză a imaginii se dovedește a fi o metodă foarte convenabilă pentru studiile legate de semințe, deoarece este lipsit de erori umane, este mai rapid și oferă o analiză minuțioasă a semințelor și a germinării plantulelor. Costul în scădere și capacitatea tot mai înaltă a hardware-ului computerului de procesare a imaginii și integrarea acestuia în sisteme cu condiții de mediu controlate sunt alte avantaje asociate acestei tehnici.

Un avantaj suplimentar al acestei metode este faptul că imaginile, indicii de vigoare și alte informații despre un anumit lot/tip de semințe sunt stocate și poate fi dezvoltată o bază de date pentru referință viitoare. Evaluarea fiecărei semințe individuale dintr-un eșantion mare de semințe ajută la dezvoltarea unor metode nedistructive și mai eficiente de sortare a sub-eșantioanelor de semințe cu diferite capacități de germinare. Datele obținute prin această tehnică pot fi prelucrate în continuare statistic și afișate grafic, și poate fi dezvoltată o bază de date pentru a integra datele de analiză a imaginii cu caracteristicile taxonomice și biomorfologice ale speciilor de plante. Această abordare este extrem de utilă pentru prezentul și viitorul plan de cercetare a calității semințelor.

Definiția seminței:

Sămânța este definită ca produsul ovulului fertilizat prin polen și derivată din planta-mamă. Embrionul se dezvoltă din zigot, iar învelișul semințelor se dezvoltă din integumentele ovulului matur care are planta embrionară, material depozitat și o acoperire exterioară de protecție (înveliș sau învelișuri).

Formarea semințelor face parte din procesul de reproducere caracteristic tuturor fanerogamelor (plantelor cu semințe), spermatofitelor, inclusiv plantelor gimnosperme și angiosperme.

Termenul „sămânță” are, de asemenea, un sens general care antedatează cele de mai sus - orice poate fi semănat, de ex. cartof de „sămânță”, „sămânță” de porumb sau „sămânță” de floarea soarelui. În cazul „semințelor” de floarea-soarelui și de porumb, ceea ce este semănat este sămânța închisă într-o coajă sau pănuș, în timp ce în cazul cartofului este vorba despre un tubercul.

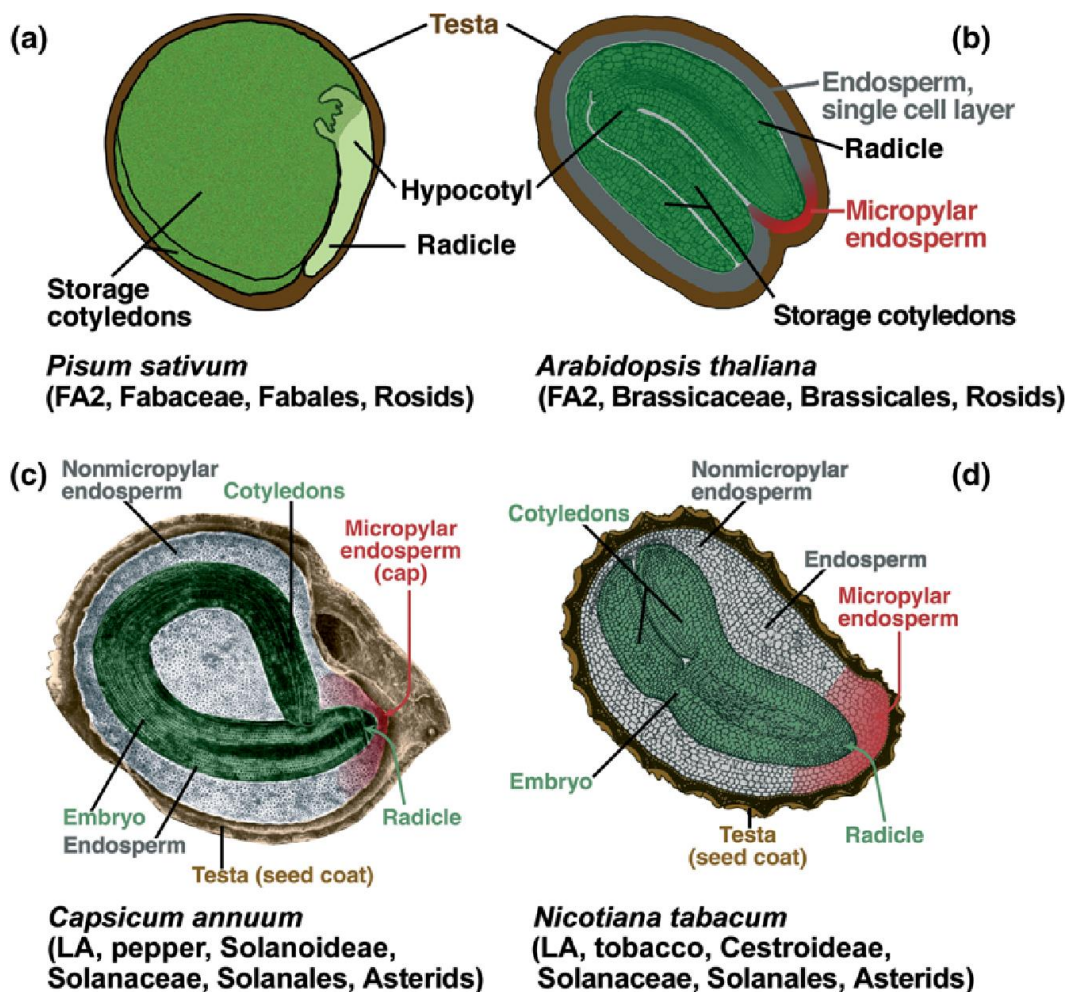
Multe dintre structurile denumite în mod obișnuit „semințe” sunt de fapt fructe uscate. Plantele care produc fructe de pădure se numesc bace. Semințele de floarea-soarelui sunt uneori comercializate, acestea rămânând încă închise în coaja lor dură, care trebuie înlăturată pentru a ajunge la semințe. Structura semințelor poate fi studiată la astfel de tipuri comune precum mazărea, cerealele, fasolea, floarea-soarelui sau migdale.

Alte grupuri de plante au o structură diferită, cum ar fi drupele (ex. piersica) care au un strat dur (endocarp) care este concrescut cu și înconjoară sămânța propriu-zisă. Nucile sunt fructele indehiscente cu o singură sămânță, cu coajă dură, ale unor plante cum ar fi ghinda sau alunul.

Toate sunt formate conform aceluiași plan, deși pot exista diferențe în ceea ce privește forma sau dimensiunea sămânței, proporția relativă a diferitor părți.

Există sute de variații în dimensiunea, forma, culoarea și suprafața semințelor. Semințele variază în funcție de mărime de la mici particule de praf, cum ar fi la unele orhidei, până la nuci de cocos mari duble. Suprafața semințelor poate fi netedă, încrețită, striată, nervurată, brăzdată, reticulată, tuberculată, alveolată, păroasă și pulpoasă sau cu particularități precum amprente digitale.

Pentru a permite plantei să treacă cu succes prin condițiile climatice nefavorabile și dăunătoare, activitatea de viață a sămânței se suspendă temporar. La apariția condițiilor favorabile, sămânța își reia activitatea și se dezvoltă planta. Sub formă de semințe o plantă poate fi transportată pe distanțe lungi fără precauții speciale.



Biodiversity of the structure of mature seeds of angiosperms and the importance of the seed-covering layers. The diploid embryo is surrounded

Biodiversitatea structurii semințelor mature ale angiospermelor și importanța învelișurilor semințelor. Embrionul diploid este înconjurat de două învelișuri: endospermul triploid (la majoritatea speciilor) (țesut nutritiv; în mare parte celule vii) și testa diploidă (învelișul seminței; țesut matern; în mare parte celule moarte). La mai multe specii endospermul este complet obliterat în timpul dezvoltării semințelor și substanțele nutritive sunt depozitate în cotiledoane. Semințele mature de (a) mazăre (*Pisum sativum*) (fără endosperm) și (b) *Arabidopsis thaliana* (strat unic de celule de endosperm) sunt caracterizate de embrioni cu cotiledoane de depozitare. Endospermul micropilar (mai multe straturi celulare) este o condiție germinativă a semințelor de Solanaceae (c, d). FA2 și LA sunt tipuri de semințe. Partea (c) este modificată din Watkins & Cantliffe (1983) și retipărită cu permisiunea ASPB (Societatea Americană a Biologilor Plantelor). Părțile (a), (b) și (d) sunt modificate din „The Seed Biology Place” (<http://www.seedbiology.de>).

Structura seminței

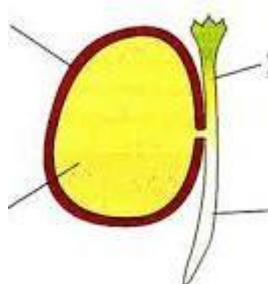
- Părțile seminței sunt:

Învelișul seminței

Formează un strat protector dur

Depozit de substanțe nutritive

Asigură planta embrionară cu hrană



Frunzuliță embrionară

Rădăcină embrionară

Embrionul se dezvoltă în plantă

Calitatea semințelor:

Calitatea semințelor este foarte importantă pentru plantule sănătoase și viguroase, plante rezistente în câmp și, în cele din urmă, o recoltă și o producție bună. Bazele calității semințelor sunt puritatea genetică, puritatea fizică, capacitatea de germinare, vigoarea și sănătatea acestora. La comercializarea semințelor, calitatea este menținută prin respectarea procedurilor standard de testare a semințelor prin care se măsoară viabilitatea și toți factorii fizici și fiziologici care reglementează performanța semințelor.

Testarea semințelor se face practic pentru evaluarea unui lot de semințe și ne spune despre potențialul său de germinare. Însă aceste proceduri de testare au unele limitări, majoritatea acestora necesitând mult timp, multă muncă și uneori rezultatele nu pot fi reproduse în condițiile reale de teren. Este necesar a ne concentra asupra utilizării de noi tehnici pentru testarea semințelor și, de asemenea, se acordă atenție la nivel internațional pentru dezvoltarea metodelor adecvate, cum ar fi analiza imaginii semințelor și a altor organe vegetale, markerilor biochimici și moleculari.

Selectarea eșantioanelor de semințe pentru analiză

Eșantionarea semințelor

Pentru a determina calitatea transportării semințelor, eșantionarea trebuie efectuată în așa fel încât probele prelevate să fie reprezentative pentru întreaga cantitate de semințe. Testarea calității semințelor se efectuează pe o parte a eșantionului reprezentativ. Prin urmare, o metodologie de eșantionare precisă din punct de vedere tehnic este foarte importantă, astfel încât rezultatele testării semințelor să fie valabile. Eșantionarea și testarea semințelor fac parte din procesul de achiziție a semințelor, dar pot fi utilizate și de personalul de urgență și de oficialii locali pentru a verifica calitatea semințelor înainte de livrarea către fermieri sau pentru a verifica calitatea semințelor dacă acestea au fost păstrate în depozite mai multe luni.

Scopul eșantionării este obținerea unui eșantion potrivit ca mărime pentru testare și obținerea unui eșantion reprezentativ pentru lotul testat. Toate eșantionările trebuie efectuate rapid, cu expunere minimă la aer, pentru a minimiza modificările umidității semințelor, dacă anume acest lucru urmează să fie testat. Sondatorilor li se amintește că orice mutare și așezare a semințelor în containere poate face ca semințe mai ușoare, goale, să se amplaseze cu ușurință la suprafață, astfel că amestecarea chiar înainte de prelevarea probelor este importantă pentru a asigura o reprezentare exactă a întregului lot de semințe.

Probele primare sunt porțiuni mici de semințe prelevate aleatoriu din lotul de semințe. Toate probele primare prelevate dintr-un lot de semințe sunt apoi combinate și amestecate pentru a forma

proba compusă. Probele compuse sunt reduse la un eșantion mai mic numit *proba expeditată. Probele expediate* (de laborator) sunt porțiuni de semințe care sunt trimise la laborator pentru testare. *Probele de lucru* (de analiză) sunt subprobe ale probei expediate și reprezintă porțiunea de semințe pe care se efectuează analiza.

Se pot utiliza următoarele intensități de eșantionare:

Nr. de containere	Nr. de eșantioane
1-4 containere	3 probe elementare din fiecare container
5-8 containere	2 probe elementare din fiecare container
9-15 containere	1 probă elementară din fiecare container
16-30 containere	15 probe elementare din lotul prelevat din containerele selectate aleatoriu, cu cel mult 1 probă din fiecare container
31-59 containere	20 probe elementare din lotul prelevat din containerele selectate aleatoriu, cu cel mult 1 probă din fiecare container

Probele primare

Metoda de obținere a probelor primare trebuie să îndeplinească standardele ISTA (2015). *Alberta* (standardele de testare a semințelor adoptate de Guvernul Alberta, Canada) recomandă utilizarea unui trior/sonde de eșantionare sau eșantionarea manuală pentru un proces necostisitor, dar eficient de eșantionare. Eșantioanele primare efectuate manual trebuie prelevate din mijlocul containerului, dacă se ia doar o probă, de sus și de jos dacă se iau 2 probe, de sus/mijloc/jos dacă se iau 3 probe etc., pentru a asigura un eșantion compus reprezentativ.

Probele compuse

Probele primare sunt combinate și amestecate bine pentru a face o probă compusă uniformă. Pentru a reduce proba compusă la dimensiunea probei expediate trebuie utilizată o metodă aleatorie.

Proba expeditată trebuie transportată într-un container intact, închis ermetic, cu cât mai puțin aer posibil. Pungile de plastic tip Ziploc nu sunt recomandate și sunt acceptabile numai pentru perioade de depozitare foarte scurte de <1 oră.

Flacoanele din sticlă, borcanele din sticlă cu capac de cauciuc sau pungile din folie termoizolate sunt recomandate ca recipiente care sunt cel mai adesea închise ermetic la temperatura camerei, pungile din folie termoizolate fiind cea mai fiabilă și mai rentabilă opțiune.

Trebuie depuse toate eforturile pentru a începe testele de germinație în termen de 2 săptămâni de la primirea probei expediate. Depozitarea intermediară se va realiza în condiții de refrigerare. Testele de umiditate trebuie începute în termen de 24 de ore de la primirea probei expediate; cu toate acestea, probele trebuie aduse la temperatura camerei înainte de deschiderea containerelor.

Analiza formei semințelor

Variația morfologică a semințelor include diferența în dimensiunea și forma semințelor. Forma semințelor este o trăsătură importantă în identificarea și clasificarea plantelor. În plus, aceasta are importanță agronomică, deoarece reflectă componentele genetice și ecologice și afectează recolta, calitatea și prețul de piață. Utilizarea tehnologiilor digitale, împreună cu dezvoltarea metodelor de cuantificare și modelare, permite o descriere mai bună a formei semințelor. Sistemele de procesare a imaginilor sunt utilizate în determinarea automată a dimensiunii și formei semințelor, devenind un instrument de bază în studiul diversității. Forma semințelor este determinată de o varietate de indici (de circularitate, de rotunjire și valoarea *J*). Compararea aspectului semințelor cu o figură geometrică (cerc, cardioid, elipsă, elipsoid etc.) asigură o cuantificare precisă a formei. Metodele de cuantificare a formei bazate pe aceste modele sunt utile pentru o descriere precisă, permițând compararea între genotipuri sau de-a lungul fazelor de dezvoltare, precum și pentru stabilirea nivelului de variație în diferite seturi de semințe.

Forma sămânței este interpretată prin diferite metode care implică mai multe trăsături și diverși indici. Din punct de vedere tehnic, datele pentru analiza formei pot fi obținute în două moduri: manual și automat. Cel mai simplu mod este de a măsura lungimea și lățimea semințelor cu șublerul.



Figura: Procesarea digitală a imaginilor seminței.

(a) Imagini de corespund la 25 de semințe; (b) Imagini binare (alb-negru) ale semințelor obținute prin segmentarea figurii; (c) Contururi ale imaginilor semințelor. (d) Elipsele ajustate fiecărei imagini a seminței (elipsele potrivite sunt date de programul Image J). (e) Sămânță după segmentare și contururile imaginii (sus) și elipsa ajustată. (f) Un exemplu de sămânță cu dreptunghiul de delimitare (sus) și sămânță cu elipsa potrivită, prezentând în ambele cazuri axele majoră și minoră.

Forma semințelor poate fi determinată de raportul lungime/lățime. Deși nu oferă o descriere exactă a formei semințelor, este cel mai simplu indice de estimat și utilizat frecvent de mulți autori.

Indicele de excentricitate (EI):

$$EI = \frac{L}{W}$$

Raportul de aspect al elipsei potrivite a particulei este dat de formula:

$$AR = \frac{MajorAxis}{MinorAxis}$$

Indicele de planeitate (FI) se bazează pe relația dintre dimensiunile particulelor de-a lungul celor trei axe principale. A fost elaborat și folosit pentru a caracteriza forma semințelor. Indicele este reprezentat prin formula:

$$FI = \frac{L+W}{2H}$$

unde L , W și H sunt lungimea, lățimea și înălțimea semințelor. Indicele a variat de la valoare de 1 pentru semințele sferice, până la valori mai mari de 2 pentru semințele fusiforme. Forma seminței se raportează la lungimea, lățimea și înălțimea acestora, dar aceste caracteristici nu sunt totuși complete, alți descriptori de formă ar putea fi mai preciși.

Următorii descriptori de formă sunt utili.

Indicele de circularitate [18-20] sau factorul de formă este după cum urmează:

$$I = \frac{4\pi \times \text{area}}{\text{perimeter}^2}$$

Acest indice (I) este o măsură a similitudinii dintre un plan și un cerc. Acesta variază de la 0 la 1, cu valoarea de 1 pentru cercuri și este o magnitudine utilă ca primă aproximare la forma semințelor.

Informații mai detaliate pot fi găsite la **Updated Methods for Seed Shape Analysis: Emilio Cervantes, José Javier Martín, and Ezzeddine Saadaoui. Hindawi Publishing Corporation Scientifica Volume 2016, Article ID 5691825, 10 pages** <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5691825>

Forma semințelor este una dintre caracteristicile pentru descrierea semințelor și analiza variabilității intra- și interspecifice. Disponibilitatea software-ului pentru analiza imaginii digitale ajută la elaborarea mai multor indici care permit modelarea formei semințelor, în conformitate cu curbele virtuale (cardioid, elipsă, cerc, etc.). Acest lucru permite cuantificarea formei semințelor care poate fi utilizată în taxonomia comparativă, genetică, fiziologie și biochimie. Forma semințelor este influențată de factorii genetici și de mediu. Aceasta se raportează la statutul taxonomic și poate fi, de asemenea, raportată la fiziologia germinării și randamentul produselor din semințe (amidon, uleiuri nevolatili, proteine etc.).

Descrierea morfologică a structurilor plantelor este o cerință necesară pentru înțelegerea relațiilor dintre structură și funcția în evoluție și poate contribui la definirea situațiilor de dezvoltare asociate cu compoziția și activitatea genomică. Schimbările de formă pot fi rezultatul fie a programelor de dezvoltare într-un mediu „normal”, sau răspunsul la schimbări (stres) în condițiile de mediu. Modelarea formei semințelor prin figuri geometrice este o aproximare ușoară care poate ajuta la înțelegerea și cuantificarea variației morfologice a semințelor, modificări ale cursului de îmbibare (absorbție) și modificări ale mutanților, precum și diferențe între genotipurile înrudite. Analiza formei semințelor are aplicații neașteptate în botanică și agrobiologie.

Testarea semințelor

Testarea semințelor oferă informații esențiale pentru determinarea calității transportării semințelor, determinând parametri precum germinarea, puritatea fizică și conținutul de umiditate. În acest fel, se stabilește dacă se respectă specificațiile tehnice ale comenzii și dacă fermierilor

vulnerabili le sunt furnizate semințe de calitate. Testarea semințelor trebuie efectuată într-un laborator național specializat sau într-un laborator acreditat ISTA.

Sămânță declarată de calitate (QDS)

Semințele utilizate pentru operațiuni de urgență trebuie să respecte standardele de calitate pentru a se asigura acordarea semințelor de calitate producătorilor agricoli vulnerabili. FAO a elaborat o schemă a semințelor declarate de calitate care prevede standarde de calitate utilizate ca standarde minime pentru semințele achiziționate în cadrul activităților de acordare de suport cu semințe.

Deteriorarea semințelor

Temperatura și umiditatea relativă a mediului de depozitare sunt doi factori importanți la care trebuie să se acorde atenție pentru un mediu favorabil de depozitare a semințelor. Conținutul de umiditate al semințelor și tipul de cultură sunt, de asemenea, factori importanți în depozitarea semințelor. Cu cât temperatura și umiditatea relativă sunt mai scăzute, cu atât mai sigure sunt condițiile de păstrare a semințelor. Prin urmare, în cadrul operațiilor de urgență, semințele nu trebuie păstrate pentru perioade lungi de timp în condiții tropicale pentru a evita problemele legate de deteriorarea semințelor din cauza temperaturilor ridicate și umidității relative înalte.

Depozitarea semințelor

Depozitarea eficientă a semințelor necesită ca: sămânța să fie uscată până la un anumit conținut de umiditate stabilit, zona de depozitare să fie bine ventilată, dacă este necesar, să se efectueze tratarea semințelor pentru a preveni atacul insectelor și inspecția periodică a semințelor depozitate. Semințele nu trebuie păstrate perioade lungi de timp dacă temperatura și umiditate relativă sunt înalte.

Proprietățile fizico-mecanice ale semințelor și metodele de determinare a acestora

Atribute ale calității semințelor

În cadrul operațiunilor de suport cu semințe, este necesar a acorda atenție **calităților fizice, fiziologice, fitosanitare și genetice** ale semințelor, astfel încât producătorilor agricoli vulnerabili să li se ofere semințe de calitate din culturile corespunzătoare și soiuri ale acestor culturi.

Furnizarea la timp de semințe de calitate a culturilor și soiurilor corespunzătoare producătorilor agricoli pentru a spori securitatea semințelor și securitatea alimentară este una dintre strategiile principale ale operațiunilor de urgență ale FAO. Înțelegerea aspectelor tehnice și operaționale ale calității semințelor de către implementatorii de proiecte este esențială pentru realizarea acestei strategii. Semințele de calitate sunt esențiale pentru producția agricolă: sămânța de calitate joasă limitează randamentul potențial și reduce productivitatea muncii producătorului agricol. Există patru parametri de bază pentru atributele calității semințelor:

- Calitățile fizice ale semințelor într-un anumit lot de semințe¹
- Calități fiziologice care se referă la aspectele de performanță ale semințelor.
- Calitatea genetică care se referă la caracteristicile genetice specifice ale soiului de semințe.
- Sănătatea semințelor, care se referă la prezența bolilor și a dăunătorilor în lotul de semințe.

Când semințele au calități fizice, fiziologice, de sănătate și genetice bune, producătorii agricoli au șanse mai mari de a obține o recoltă bună. Semințele de înaltă calitate sunt un factor major în obținerea unei recolte bune și dezvoltarea rapidă a plantelor chiar și în condiții

¹ **Lot de semințe** - o cantitate identificabilă de semințe de un soi, omogene prin origine și istorie și cu un număr de referință controlat într-un sistem de asigurare a calității semințelor.

nefavorabile, deși alți factori precum precipitațiile, practicile agronomice, fertilitatea solului și combaterea dăunătorilor sunt, de asemenea, importante.

Atribute ale calității semințelor - fizice

Calitățile fizice ale semințelor dintr-un lot de semințe se caracterizează prin următoarele:

- **Minim de semințe deteriorate:** Semințele deteriorate (sparte, crăpate sau vestejite) nu pot germina și sunt mai susceptibile de a fi atacate de insecte sau microorganisme. Majoritatea semințelor deteriorate pot fi eliminate în timpul procesării (condiționării) semințelor.
- **Minim de semințe de buruieni sau materii inerte:** Semințele de bună calitate nu trebuie să conțină semințe de buruieni (în special tipuri nocive), pleavă, pietre, murdărie și semințe ale altor culturi. Aproape toate aceste impurități pot fi eliminate în timpul procesării/ condiționării.
- **Minim de semințe bolnave:** Decolorarea sau pătarea sunt simptome ale semințelor care pot transporta microorganisme care au atacat deja sau vor ataca semințele când acestea vor începe să crească. Planta poate trăi și răspândi boala la alte plante.
- **Semințe aproape uniforme ca mărime:** Semințele mature de dimensiuni medii și mari vor avea în general o germinare și o vigoare mai mare decât semințele mici și imature. La condiționarea (procesarea) lotului de semințe, semințele mici și ușoare sunt, în mod normal, eliminate.

Parametrii de calitate fizică, cum ar fi uniformitatea semințelor, conținutul de material inert și semințele decolorate pot fi detectate prin examinarea vizuală a probelor de semințe. Examinarea atentă a unui pumn de semințe este primul pas pentru a înțelege mai bine calitatea semințelor care sunt oferite producătorilor agricoli și oferă prima, dar nu singura posibilitate de a decide dacă este necesară curățarea semințelor.

Atribute ale calității semințelor - fiziologice

- **Capacitate înaltă de germinare și vigoare:** Procentul de germinație este un indicator al capacității semințelor de a ieși din sol pentru a produce o plantă în câmp în condiții normale. Vigoarea semințelor este capacitatea semințelor de a ieși din sol și de a supraviețui condițiilor de câmp potențial stresante și de a crește rapid în condiții favorabile. Pierderea capacității unei semințe de a germina este ultimul pas (nu primul pas) într-un proces lung de deteriorare (pierderea treptată a viabilității). Scăderea vigoriei semințelor și alte schimbări fiziologice au loc înainte de pierderea capacității de germinație. Prin urmare, semințele cu germinație acceptabilă pot avea o vigoare redusă.

Importanța calității fiziologice nu poate fi supra-apreciată. Semințele își pot îndeplini rolul biologic numai dacă sunt viabile. Prin urmare, semințele uniforme din punct de vedere fizic ale unui soi adaptat vor fi inutile dacă au o germinație și o vigoare redusă sau dacă nu germinează atunci când sunt plantate. **Diferența dintre cereale și semințe este că primele pot sau nu să germineze, iar ultimele trebuie să germineze.** Iată de ce procesul de germinare, și anume o parte semnificativă a acestuia, reprezintă o specificație tehnică importantă pentru semințe.

Atribute ale calității semințelor - genetice

- **Semințe de același soi:** În cadrul culturilor (speciilor) cum ar fi porumbul, orezul sau arahidele există mii de tipuri distincte de aceste culturi. **Aceste tipuri distincte de**

culturi sunt denumite soiuri. Plantele produse de un soi de semințe prezintă aceleași caracteristici și aceste caracteristici sunt reproductibile de la o generație la alta. Definiția unui soi este un ansamblu de plante cultivate care se distinge în mod clar prin oricare din caracteristici (morfologice, fiziologice, citologice, chimice sau altele) și care, atunci când sunt reproduse (sexual sau asexual), își păstrează caracterele distinctive.

- Există **soiuri moderne** care sunt rezultatul creșterii plantelor și al programelor de dezvoltare a soiurilor, testelor multi-locuții, sistemelor naționale de lansare a soiurilor și sistemelor formale de producere a semințelor. Un alt tip de soiuri de culturi sunt **soiurile tradiționale (soiuri naturale)** produse și conservate de producătorii agricoli, care pot fi populația locală de plante selectată de fermieri sau uneori sunt soiuri moderne care au fost lansate cu mulți ani în urmă. Semințele diferitelor soiuri ale aceleiași culturi sunt adesea dificil sau imposibil de distins după recoltare. Amestecarea diferitor soiuri ale aceleiași culturi sau specii poate avea loc atunci când cerealele/semințele sunt vândute și intră în sistemul de comercializare formală și informală. Un amestec de soiuri poate fi o problemă, deoarece: soiurile mixte se pot coace (matura) în diferite perioade, ceea ce poate crea deficiențe la recoltare, manipulare post-recoltare și pot oferi randamente mai mici. În plus, fiecare sămânță de soiul nedorit dintr-un amestec va produce sămânță atunci când este plantată și acele semințe vor produce mai multe semințe, astfel încât în fiecare an proporția soiului nedorit va deveni mai mare. Inspecția pe câmp urmată de prășit (îndepărtarea plantelor nedorite) în perioada de creștere a culturii de semințe este unul dintre pașii întreprinși pentru a asigura puritatea semințelor certificate. Cu toate acestea, trebuie subliniat faptul că soiurile tradiționale, în special ale soiurilor polenizate încrucișat, utilizate de fermierii subzistenți, sunt adesea populații de plante care sunt foarte uniforme. Acest caracter eterogen poate fi un avantaj în unele circumstanțe cum ar fi precipitații reduse, fertilitate scăzută și afectarea de dăunători și boli. În alte situații, cum ar fi semințele de fasole în Burundi, fermierii preferă să planteze un amestec de mai multe tipuri diferite de fasole.

Determinarea masei absolute (TSW) a semințelor în diferite culturi

În cadrul acestui test se folosesc doar semințe pure, conform definiției date în secțiunea Analiza Purității de mai sus; cu toate acestea, semințele din analiza oficială a purității nu pot fi utilizate pentru a determina masa a 1000 de boabe (TSW) din cauza probabilității de schimbare a umidității semințelor în timpul expunerii de lungă durată la condițiile ambientale. Din acest motiv, testele TSW trebuie finalizate rapid pentru a minimiza erorile.

Opt (8) repetări de semințe pure a câte 100 de semințe trebuie extrase aleatoriu din proba expedită. Masa fiecărei repetări se înregistrează în grame până la trei zecimale și se determină masa medie a acestor 8 repetări. Masa medie a 100 de semințe este utilizată pentru a calcula masa a 1000 de semințe. Varianța, deviația standard și coeficientul de varianță trebuie calculate prin următoarele formule:

$$\text{Varianța} = \frac{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}{n(n-1)}$$

unde: x = masa fiecărei repetări în grame

n = numărul de repetări

Σ = suma

Deviația standard

$$s = \sqrt{\text{Varianță}}$$

Coeficientul de varianță

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

unde: $\bar{x}$ = masa medie a 100 de semințe

Dacă coeficientul de varianță nu depășește 4.0, atunci masa a o mie de semințe este acceptată și este raportată la 3 zecimale. Pentru semințele de iarbă, coeficientul de varianță nu trebuie să depășească 6.0. La solicitare, se poate oferi un instrument Excel pentru efectuarea calculelor de mai sus.

Dacă limita este depășită, încă opt repetări trebuie extrase și cântărite. Apoi trebuie calculată deviația standard folosind toate cele 16 repetări și orice repetare care deviază de la medie cu de două ori mai mult decât deviația standard, trebuie să fie eliminată. Masa repetărilor rămase se va utiliza apoi pentru a determina masa a 1000 de semințe.

Determinarea umidității

Scopul testului de umiditate este de a determina umiditatea totală a unui lot de semințe pentru a stabili condițiile optime de depozitare și pentru a maximiza durata de viață a semințelor. Cele două metode de testare a umidității indicate mai jos nu pot fi substituite între ele, adică indicii eRH (umiditatea relativă de echilibru) nu ar trebui convertiți în MC (umiditatea relativă) pentru prezentarea rezultatelor testului și invers.

Testarea umidității trebuie să înceapă în termen de 24 de ore de la primirea probelor la laboratorul de testare.

Conținutul de umiditate

Conținutul de umiditate al semințelor în *Alberta* este definit ca cantitatea de apă dintr-un eșantion raportată la masa eșantionului inițial, numită și conținut de umiditate în bază umedă. Se va utiliza un cântar (termo-balanță) cu o precizie în grame de până la cel puțin 3 zecimale. Conținutul de umiditate este determinat folosind metoda uscării în etuvă la temperatură constantă scăzută: 103°C ($\pm 2^\circ$) timp de 17 ore (± 1 oră). Etuva trebuie să poată usca eșantioanele în conformitate cu secțiunea 9.1.4.2 din ISTA (2015) și se vor folosi numai containere metalice pentru probe.

Prelevarea de probe

Se vor efectua teste duble pe două probe de lucru extrase independent, cu masa de 4 până la 5 grame fiecare. Pentru loturile de semințe foarte mici, mai puțin de 200 de grame, dimensiunile și/sau numărul redus al eșantionului se găsesc în **Tabelul 2**.

Tabelul 2 Dimensiuni reduse acceptabile ale probelor pentru testarea conținutului de umiditate pe loturi de semințe foarte mici.

Total semințe în lotul de semințe	Dimensiunea eșantionului
50 până la 200 grame semințe	Utilizați două probe de 1 gram
30 până la 50 grame semințe	Utilizați două probe de 0,5 grame
10 până la 30 grame semințe	Utilizați o probă de 0,5 grame
<10 grame semințe	Testarea conținutului de umiditate nu este obligatorie. Se recomandă măsurarea activității apei. Un accent deosebit ar trebui acordat procedurilor adecvate de manipulare, timpului de uscare și agitare/amestecare.

Semințele nu pot fi expuse la aerul ambiant mai mult de două minute din momentul în care au fost scoase din containerul de eșantionare expediat până când au fost introduse în containerele de uscare și cântărite. Fiecare container și capacul acestuia trebuie să aibă etichetate corespunzător.

Metoda

Containerele și capacele trebuie șterse cu alcool și uscate înainte de fiecare utilizare. Proba este distribuită uniform pe suprafața containerului. Containerul gol și capacul sunt cântărite și se

înregistrează greutatea respectivă. Proba este plasată în container și se înregistrează greutatea semințelor, containerului și a capacului. Probele, containerele și capacele sunt uscate la 103°C (± 2°) timp de 17 ore (± 1 oră). La sfârșitul timpului de uscare, containerul trebuie închis cu capac înainte de a fi mutat în exicator (cu o substanță corespunzătoare) pentru maximum 30 de minute. După răcire, containerul cu capacul intact și semințele în interior sunt cântărite din nou. Toate masele sunt înregistrate în grame cu aproximație până la trei zecimale.

Calcularea

Pentru a calcula conținutul de umiditate (procentului de apă) este utilizată următoarea formulă:

$$\text{Conținut de umiditate \%} = \frac{\text{pierdere masei}}{\text{masa inițială}} \times 100 = \frac{M2-M3}{M2-M1} \times 100$$

unde $M1$ = greutatea containerului și a capacului;

$M2$ = greutatea containerului, capacului și conținutului înainte de uscare

$M3$ = greutatea containerului, capacului și conținutului după uscare

Media celor două repetări este procentul de conținut de umiditate al probei expediate, rotunjit până la 0.1%. Media MC expedită pentru înregistrare și depozitare trebuie să aibă o valoare de 4.0-8.0% MC.

Eroarea admisă (toleranța)

Diferența dintre cele două repetări este rotunjită până la 0.1%. Dacă diferența dintre cele două repetări este mai mare de 0.3%, testul nu se încadrează în limitele erorii admise, acesta trebuie repetat.

Dacă rezultatul obținut pentru cel de-al doilea test se încadrează în limitele de toleranță (eroare admisă) indicate mai sus, se va raporta al doilea rezultat. Dacă rezultatele celui de-al doilea test sunt în afara limitelor de toleranță, atunci primul și al doilea rezultat ale testului sunt comparate pentru stabilirea nivelului de toleranță ($\leq 0.3\%$). Dacă acestea se încadrează în limitele de toleranță, atunci se raportează media primului și celui de-al doilea test. Dacă cele două teste sunt în afara limitelor de toleranță, atunci trebuie verificat echipamentul, trebuie revizuite instrucțiunile și întregul test trebuie repetat de la început.

Umiditate relativă de echilibru

Semințele sunt „higroscopice”, ceea ce înseamnă că absorb (și pierd) apa relativ repede în mediul său. Acest transfer de apă din și în va ajunge în cele din urmă la un echilibru între sămânță și mediu. Umiditatea relativă a aerului într-un mediu închis care conține semințe în echilibru se numește umiditate relativă de echilibru, notată cu „% eRH”. La fel cum evaporarea este utilizată pentru a măsura conținutul de umiditate al semințelor, un tip de higrometru numit contor de activitate a apei este utilizat pentru a măsura umiditatea relativă de echilibru. Măsurarea umidității semințelor în acest mod este de obicei o metodă rapidă, precisă și nedistructivă.

Higrometrul trebuie setat la tipul de măsurare „activitatea apei”. Indicii oferiți de higrometru reprezintă umiditatea relativă de echilibru (eRH). Cu toate acestea, activitatea apei este exprimată pe o bază zecimală, adică pe o scară de la 0 la 1 și unitățile sunt „ a_w ”, în timp ce umiditatea relativă de echilibru este exprimată ca procent, adică de la 0 la 100% eRH. În termeni simpli, aceasta înseamnă că indicele activității apei ar trebui să fie înmulțit cu 100 sau efectiv, zecimea este mutată cu 2 poziții spre dreapta.

Ex.: indicele direct pe higrometru poate fi 0,226 a_w → acest lucru este raportat ca 22.6% eRH

Toate măsurările eRH trebuie efectuate numai atunci când semințele și echipamentul sunt la temperatura de 20-30°C; totuși, temperatura nu trebuie raportată cu eRH.

Prelevarea de probe

Cerințele privind prelevarea de probe sunt similare cu cele pentru testarea **conținutului de umiditate**:

- Trebuie efectuate câte două teste pe două probe de lucru extrase independent. Semințele trebuie să constituie cel puțin 20% din volumul containerului utilizat cu dispozitivul de măsurare.
- Dimensiunea probei expediate poate avea valoare mai mică, dar numai dacă testul eRH va fi nedistructiv.
- Ca și în cazul eșantionării pentru testarea **conținutului de umiditate**, semințele de arbori/arbuști mari în care masa absolută (1000 semințe) depășește adesea 200g (de exemplu, nucile de pin alb și alun) trebuie tăiate în jumătăți înainte de testare. Datorită valorii în mod normal ridicate a acestor semințe, trebuie testat doar 1 eșantion format din 5 semințe și, din nou, acest lucru ar trebui menționat la prezentarea rezultatului.
- Pentru loturi de semințe foarte mici, unde nu este posibilă prelevarea a două probe independente în conformitate cu regula de 20% din volum, se acceptă să se utilizeze întregul lot de semințe într-un singur eșantion de lucru, dar acest lucru ar trebui menționat la prezentarea rezultatului. Dacă dimensiunea lotului de sămânță este atât de mică încât un singur volum de eșantion din containerul de testare este mai mic de 20%, volumul ar trebui să fie aproximat și, de asemenea, menționat la prezentarea rezultatului.

Ex.: 17,5% eRH, 1 probă, 10% volum

Metoda

- Semințele trebuie să aibă aproximativ aceeași temperatură ca și echipamentul și aerul din încăperea. Măsurările eRH se acceptă numai atunci când sunt efectuate la o temperatură cuprinsă între 20-30°C.
- Ștergeți containerele cu alcool și uscați-le înainte de fiecare utilizare. Semințele se vor distribui uniform pe suprafața containerului de eșantionare și se va umple cel puțin 20% din volumul containerului.
- Măsurările pot fi efectuate cu instrumentul setat pe modul full (măsurare efectivă) sau pe modul "rapid" (măsurare estimată/extrapolată). Modul rapid trebuie setat pentru cel puțin 5 minute și pentru toate măsurările se va aștepta ultimul indice.
- Dacă alegeți să utilizați măsurarea în echilibru complet, timpul de finalizare (10-30 minute) depinde în cea mai mare parte de temperatura stabilă a semințelor din interiorul camerei, în acest caz se vor utiliza semințe la temperatura camerei și dispozitivul de măsurare se va poziționa departe de curenții de aer/încălzitoare /ventilatoare.

Calcularea

Higrometrul va oferi un indice al activității apei (de la 0 la 1.0 a_w) dacă este setat corect. Acesta este convertit în umiditate relativă de echilibru (eRH) prin înmulțirea măsurării activității apei cu 100.

Ex.: $0,278a_w \times 100 = 27,8\% \text{ eRH}$

Valoarea eRH raportată este indicele mediu a celor două probe cu o aproximație până la o zecimală, de ex. 23.2% eRH.

Eroarea admisă (toleranța)

Diferența dintre cele două repetări este rotunjită până la 0.1%. Dacă diferența dintre cele două repetări este mai mare de 0.3%, testul nu se încadrează în limitele erorii admise, acesta trebuie repetat.

Determinarea purității semințelor

Scopul analizei purității este de a determina compoziția procentuală de masă a semințelor pure față de semințele altor specii și resturile (materii inerte) care alcătuiesc proba.

Din proba expedită trebuie extrasă proba de lucru, cântărită și înregistrată în grame cu aproximație de trei zecimale. Pentru speciile care nu sunt enumerate aici, trebuie utilizată proba lucru cu o masă estimată care să conțină cel puțin 2500 semințe.

Proba de lucru este apoi separată cu mâna, sita sau suflantă în două componente: semințe pure ale speciei testate și semințe ale altor specii sau resturi. Pentru definirea clară a semințelor pure, altor semințe și materii inerte. Cele două componente trebuie apoi cântărite și înregistrate în grame cu o aproximație de trei zecimale.

Suma maselor celor două fracții componente trebuie comparată cu masa inițială a probei de lucru pentru a stabili dacă aceasta s-a redus sau a crescut. Dacă se constată o discrepanță de peste 5% comparativ cu masa probei inițiale, testul trebuie eliminat și se va efectua o testare repetată.

Se va raporta procentul de sămânță pură, care se calculează prin următoarea formulă:

$$\text{Sămânță pură (\%)} = \frac{\text{masa fracției de sămânță pură}}{\text{masa totală a probei de lucru}} \times 100$$

Procentul de semințe pure este rotunjit și raportat cu aproximație de până la o zecimală.

Determinarea facultății germinative și a energiei germinative a semințelor

Scopul testului de germinație este de a determina potențialul germinativ al unui lot de semințe. Procentul de germinație este viabilitatea estimată a unui lot de semințe, testat în anumite condiții și într-o perioadă anumită de timp. Fiecare test trebuie să fie format din 400 de semințe care sunt extrase din proba de lucru și apoi împărțite aleatoriu în patru repetări a câte 100 de semințe.

Facultatea germinativă și energia germinativă a semințelor sunt cei mai importanți indicatori ai calității de însămânțare. Semințele cu o facultate germinativă bună și energie germinativă sporită, în cazul utilizării unei tehnologii agricole normale, dau întotdeauna și concomitent lăstari integri. Facultatea germinativă a semințelor are o mare importanță industrială: aceasta determină capacitatea seminței de a germina pentru însămânțare, rata de însămânțare.

Facultatea germinativă a semințelor reprezintă cantitate de semințe germinate în mod normal în proba prelevată pentru analiză, exprimată în procente. Aceasta se determină prin capacitatea de germinare în condiții optime stabilite de standard pentru fiecare cultură.

Standardul privind calitatea varietală și de însămânțare a semințelor stabilește cerințe ridicate în ceea ce privește rata de germinare. Semințele care nu îndeplinesc cerințele standardului privind facultatea germinativă nu pot fi utilizate pentru însămânțare. La semănarea semințelor cu facultate germinativă redusă scade randamentul; este mai bine ca astfel de semințe să fie utilizate în scopuri alimentare și tehnice.

Concomitent cu facultatea germinativă se determină și energia germinativă. Energia germinativă, care caracterizează germinarea concomitentă a semințelor, reprezintă numărul de semințe germinate în mod normal într-o anumită perioadă de timp stabilită pentru fiecare cultură, exprimat în procente.

(плохой перевод на английский, переведенно с оригинала
<http://www.comodity.ru/grainquality/sortseedgrain/67.html>)

Calcularea ratei de însămânțare

Densitatea corectă a plantelor este un factor important în maximizarea randamentului culturilor leguminoase. Pentru a obține populația țintă, este nevoie nu doar de semințe de calitate, ci

este necesar să calculați cu precizie ratele de însămânțare. Este surprinzător faptul că o ușoară variație a mărimii semințelor sau a capacității germinative a acestora modifică rata de însămânțare necesară pentru a obține populația țintă de plante. Mărimea, calitatea și capacitatea germinativă a semințelor variază în dependență de soi, de la an la an, de la teren la teren și trebuie verificate pentru fiecare linie de însămânțare utilizată.

Calitatea semințelor pentru însămânțare

Dimensiunea mare a semințelor de culturi leguminoase le face vulnerabile la deteriorarea mecanică de tăietorul combinei la recoltare și în timpul manipulării ulterioare. Aceste deteriorări nu sunt întotdeauna vizibile. Deteriorările pot fi reduse prin încetinirea vitezei tamburului tăietorului combinei, deschiderea concavei, acționarea cu atenție a șnecurilor și reducerea numărului de tăieri. În mod ideal, ar trebui să se utilizeze un tambur rotativ și un transportor acționat de curea sau un elevator pentru transportarea cerealelor.

Semințele care trebuie utilizate pentru însămânțare trebuie prelucrate cu o atenție deosebită. În mod ideal, semințele care urmează să fie utilizate pentru anii următori ar trebui să fie produse ca culturi semincere specifice și nu doar prelevate aleatoriu dintr-o zonă a întregului teren la recoltare. Dacă acest lucru nu este posibil, trebuie păstrată sămânța din cea mai bună parte a culturii, unde lipsesc buruienile și bolile și cultura s-a maturizat uniform. Cerealele care vor fi utilizate pentru semințe ar trebui recoltate primele, pentru a evita orice contaminare cu buruieni și boli din alte culturi de leguminoase sau din alte părți ale terenului. Semințele se vor păstra separat de semințele în vrac, manipularea acestora fiind redusă la minim.

Sămânța care a fost deteriorată va genera un răsad anormal - lăstarul, rădăcina sau chiar ambele pot fi deteriorate. Dacă rădăcina este deteriorată, răsadul va germina, va răsări și apoi, în general, va muri. Acest lucru se datorează faptului că rădăcina este slabă și nu poate crește normal. Dacă lăstarul este deteriorat, răsadul va germina și poate răsări.

În plantulele deteriorate de mazăre și fasole, unde cotiledoanele rămân sub nivelul solului, lăstarul durează mai mult să răsără, pare deformat și poate fi galben sau verde pal.

Plantulele anormale care totuși răsar, nu au vigoare, și astfel sunt mai vulnerabile la rigurile de adaptare în câmp. Factori precum temperatura, bolile, insectele, adâncimea de însămânțare și crustarea solului pot mai mult să afecțeze capacitatea de adaptare a plantulelor slabe. Iar plantulele care răsar au puține șanse să supraviețuiască pentru mult timp, producând puțină substanță uscată și contribuind puțin sau deloc la recolta finală.

Adaptarea nesatisfăcătoare a culturilor comerciale se poate adesea datora semințelor de calitate proastă.

Calitatea semințelor culturilor leguminoase trebuie verificată întotdeauna înainte de însămânțare. Lotul de semințe trebuie verificat vizual a pentru a detecta orice crăpături a învelișului semințelor sau alte deteriorări cauzate de insecte și boli, precum și trebuie efectuat un test de germinație pentru a identifica numărul de semințe viabile normale sau nedeteriorate.

Testarea pentru stabilirea bolilor transmise prin sămânță poate fi efectuată în laboratoare specializate pentru o serie de boli, cum ar fi virusul mozaicului de castraveți la lupinul cu frunza înguste, arsura bacteriană la mazărea de câmp și ascochitoza la năut. Lupinul alb trebuie verificat prin „screening UV” pentru a depista posibila contaminare a semințelor amare (număr mare de alcaloizi).

Testul de germinație

Toate semințele culturilor leguminoase care urmează a fi utilizate pentru însămânțare trebuie testate pentru potențialul de germinație. În mod ideal, se vor utiliza doar semințe de culturi leguminoase cu un potențial de germinație mai mare de 80%. Testul de germinație se poate face în laborator sau acasă.

Când facem testul

Cel mai bun moment pentru prelevarea probelor este în timpul sau imediat după curățarea semințelor. Acest lucru reduce numărul de găuriri sau atingeri a semințelor după efectuarea testului. De asemenea, oferă un mod ideal de a obține un eșantion reprezentativ bun. Cu toate acestea, dacă credeți că lotul de semințe poate avea o capacitate redusă de germinare, testarea ar trebui făcută înainte de curățarea semințelor. Acest lucru minimizează cheltuielile și oferă timp pentru obținerea semințelor de înlocuire. Când testul se efectuează înainte sau după curățarea semințelor, este probabil ca tava germinativă sau temperatura solului să fie mai mare decât la semănat. Acest lucru nu contează întrucât scopul este de a identifica numărul plantulelor normale și acest lucru nu este afectat de temperatură.

Prelevarea de probe

Cheia unui bun test de germinare este obținerea unui eșantion reprezentativ. Testul ar trebui efectuat pentru fiecare lot de semințe de 20 de tone. Eșantionarea trebuie să fie aleatorie și să includă numeroase probe pentru a oferi cele mai bune rezultate. Ar trebui prelevate cantități mici (1 cană) de semințe de fiecare dată când semințele sunt mutate (din curățătorul de semințe, depozit sau camion) sau din saci diferiți. Nu se vor preleva probe din siloz, deoarece este periculos și dificil să obțineți un eșantion reprezentativ. După combinarea în vrac a sub-probelor, acestea se amestecă bine și se ia un eșantion de semințe de 1 kilogram. (*текст повторяется*)

Testul de germinație la domiciliu

Pregătirea testului

O metodă comodă este utilizarea unei tăvi pătrate plate cu mărimea de aproximativ 30 cm și adâncimea de 5 cm. În partea de jos se va așeza o foaie de hârtie pentru a acoperi găurile de scurgere și tava se va umple cu nisip curat, amestec de ghiveci sau cu pământ cu capacitate de drenaj. Dacă nu aveți o tavă, testul se poate face în orice fel de recipient cu autodrenaj sau într-o parte mai răcoroasă a grădinii.

Testele de germinație în condiții de laborator se efectuează în mod normal la temperatura de 20°C, deci dacă testul urmează să fie efectuat în încăpere, respectați temperatura dată.

Numărați 100 de semințe (inclusiv cele deteriorate) și semănați 10 rânduri a câte 10 semințe - rândurile facilitează numărarea plantulelor. Semințele trebuie să fie semănate la adâncimea normală de însămânțare de 2-3 cm. Așezați semințele deasupra nisipului sau pământului și împingeți-le cu o bucată de diblă sau un creion, apoi acoperiți-le cu ceva nisip. Semințele mai mari, cum ar fi cele de fasole, pot fi testate cu succes în aceleași tăvi și trebuie semănate cât mai adânc posibil.

Udați cu grijă! Mențineți substratul umezit (nu ud). Udarea excesivă va rezulta în dezvoltarea de fungii pe suprafața semințelor, provocând putrezirea semințelor și afectând germinarea normală.

Dacă nu aveți o tavă, semănați 100 de semințe în rânduri în grădină la o adâncime normală, numărând cu atenție numărul de semințe semănat. Mențineți pământul umed.

Numărarea

Plantulele trebuie numărate după 7-10 zile, când majoritatea plantulelor sunt în poziție verticală. Nu așteptați până când răsar ultimele plantule - acestea sunt cele slabe și deteriorate.

Se vor număra numai plantulele normale. Nu numărați plantulele bolnave, decolorate sau deformate sau, în cazul lupinilor, pe cele cărora le lipsește un cotiledon.

Scopul este să cunoașteți numărul total de plantule normale, viguroase și sănătoase. Dacă numărați 83 de plantule normale, atunci procentul dvs. de germinare este de 83%.

Calcularea ratei de însămânțare

Rata de însămânțare poate fi calculată utilizând populația țintă de plante, procentul de germinare, masa a 100 de semințe și factorul de teren (a se vedea următoarea ecuație).

$$\text{Rata de \u00e2ns\u00e2m\u00e2n\u021bare (kg/ha)} = \frac{\text{popula\u021bia-\u021cint\u0103 a plantei (pl/m}^2\text{)} \times \text{masa a 100 semin\u021be (grame)} \times 10}{\text{procentul de germinare} \times \text{factorul de teren}}$$

Pasul 1 – popula\u021bia-\u021cint\u0103 (densitatea) a plantelor

Care este densitatea optim\u0103 a plantelor? Acest lucru va varia \u00een func\u021bie de cultura leguminoas\u0103 plantat\u0103, regiune, precipita\u021bii \u0219i timpul de \u00e2ns\u00e2m\u00e2n\u021bare (la timp sau mai t\u00e2rziu).

Un exemplu aplicat este dup\u0103 cum urmeaz\u0103:

- maz\u0103re de c\u00e2mp
- sem\u00e2nat\u0103 \u00een a 3-ea s\u0103pt\u0103m\u00e2n\u0103 a lunii mai
- cu precipita\u021bii anuale de 425 mm

Popula\u021bia-\u021cint\u0103 pentru acest exemplu de plat\u0103 este de 40 plante/m².

Pasul 2 - determinarea masei a 100 de semin\u021be

Acest lucru se face prin num\u0103rarea unui anumit num\u0103r de semin\u021be (cel pu\u021cin 200) \u0219i c\u00e2nt\u0103rirea acestora. Num\u0103rul de semin\u021be per kilogram sau dimensiunea semin\u021belor pot fi ob\u021cinite \u0219i la cerere, prin efectuarea testului de germina\u021bie \u00een condi\u021bii de laborator. Cu c\u00e2t s-au num\u0103rat mai multe semin\u021be, cu at\u00e2t r\u0103spunsul este mai precis. Num\u0103ra\u021bi \u00eentotdeauna fiecare lot de semin\u021be, nu presupune\u021bi niciodat\u0103 c\u0103 sunt acelea\u0219i dac\u0103 provin de pe terenuri diferite, soiuri sau ani diferi\u021bi.

\u00c2n exemplul dat, 100 de semin\u021be c\u00e2nt\u0103reau 21 de grame.

Dac\u0103 ave\u021bi num\u0103rul de semin\u021be per kilogram calculat prin efectuarea testului de laborator, acesta poate fi transformat cu u\u0219urin\u021b\u0103 \u00een masa a 100 de semin\u021be, dup\u0103 cum urmeaz\u0103:

$$\text{Masa a 100 semin\u021be} = \frac{1000}{\text{semin\u021be per kg}} \times 100$$

Pasul 3 - ajustare pentru germinare \u0219i factorul de teren

S\u0103 presupunem c\u0103 doar 80% din semin\u021bele germinate \u0219i r\u0103s\u0103rite bine se vor adapta \u00een condi\u021bii de c\u00e2mp - temperatura, umiditatea, tipul solului, ad\u00e2ncimea de \u00e2ns\u00e2m\u00e2n\u021bare, insectele \u0219i bolile vor afecta supravie\u021cuirea. Factorul de teren poate fi ajustat \u00een func\u021bie de \u00e2ncrederea dvs. \u00een opera\u021biunea de \u00e2ns\u00e2m\u00e2n\u021bare \u0219i condi\u021biile de c\u00e2mp. O estimare realist\u0103 a adapt\u0103rii este de 80%.

\u00c2n exemplu, germinarea semin\u021belor de maz\u0103re de c\u00e2mp este de 93%, popula\u021bia-\u021cint\u0103 este de 40 de plante pe m² \u0219i masa a 100 de semin\u021be este de 21 grame. La calcularea ratei de \u00e2ns\u00e2m\u00e2n\u021bare, se va utiliza echivalentul zecimal al factorului de teren (0,80 pentru 80%).

Rata dvs. de \u00e2ns\u00e2m\u00e2n\u021bare	Exemplul	S\u0103m\u00e2n\u021ba
Pasul 1 popula\u021bia-\u021cint\u0103 (plante/m ²)	= 40 pl/m ²	TD (<i>target density – popula\u021bia \u021cint\u0103</i>)
Pasul 2 masa a 200 semin\u021be masa a 100 semin\u021be (grame)	= 42 = 42+2 = 21 grame	+2 100sw (<i>masa a 100 semin\u021be</i>)
Pasul 3 Germinarea (%)	= 93%	G
SR rata de \u00e2ns\u00e2m\u00e2n\u021bare (gk/ha)	= 113 kg/ha	SR

$$SR = \frac{TD \times 100sw \times 10}{G \times 0.8}$$

Determinarea viabilității semințelor

Viabilitatea semințelor este capacitatea embrionului de a germina și aceasta poate fi afectată de o serie de condiții diferite. O varietate de factori pot afecta viabilitatea semințelor, cum ar fi capacitatea plantei de a produce semințe viabile, dăunătorii și agenții patogeni și condițiile de mediu, cum ar fi inundațiile sau căldura. Vârsta semințelor afectează, de asemenea, sănătatea și capacitatea de germinare a acestora. Semințele sunt embrioni vii și, în timp, celulele mor și nu pot fi înlocuite. Perioada de timp în care o sămânță rămâne viabilă poate fi influențată atât de genetică, cât și de mediu. Unele semințe pot rămâne viabile în condiții optime mulți ani, iar altele doar pentru un ciclu sezonier.

Viabilitatea mostrelor de semințe este o măsură a procentului de semințe (numărului de semințe) vii după depozitare și care s-ar putea dezvolta în plante care se vor reproduce singure, în condiții adecvate.

Viabilitatea este de obicei măsurată pentru a evalua dacă semințele sunt potrivite pentru un anumit scop, cel mai des pentru a produce o cultură, dar și în scopuri industriale, în special pentru mălcirea orzului. Rezultatele testului de germinație sunt utilizate pentru a determina dacă lotul de semințe este potrivit pentru însămânțare.

Viabilitatea semințelor poate fi testată prin mai multe metode simple. Testul de germinație a semințelor este probabil cel mai simplu: semințelor li se oferă resursele necesare (aer, apă, căldură și lumină) pentru a germina și a se transforma în plantulă. Doar așezați semințele în sol sau într-un ghiveci cu sol și urmăriți câte vor crește. Cu toate acestea, un dezavantaj al utilizării solului, ghivecelor și resurselor exterioare este fluctuația de mediu care poate pune la îndoială adevărata viabilitate a semințelor.

Două dintre motivele principale pentru care semințele nu germinează în condiții adecvate sunt fie că acestea sunt moarte, fie că sunt în stare latentă. Semințele moarte pot fi identificate deoarece, de obicei, acestea se înmoaie și putrezesc în timpul testului fiind atacate de bacterii și ciuperci. Semințele care rămân tari sau absorb apă, dar rămân ferme și în stare bună în timpul testului de germinație sunt probabil latente. Latența semințelor este o stare obișnuită pentru unele culturi imediat după recoltare (latență post-recoltare) și pentru multe specii sălbatice înrudite cu plantele de cultură.

Este important de știut că semințele care se păstrează într-o bancă de gene vor crește pentru a produce plante. Prin urmare, acestea trebuie să aibă o viabilitate ridicată la început și în timpul depozitării. Viabilitatea semințelor la începutul depozitării va determina, de asemenea, în condițiile de mediu, durata de depozitare a mostrelor.

Viabilitatea trebuie determinată la începutul perioadei de depozitare și la intervale regulate în timpul depozitării pentru a prezice timpul corect pentru regenerarea mostrelor. Testul de viabilitate durează de la câteva zile la câteva săptămâni sau chiar luni pentru a da un rezultat precis. Dacă este posibil, rezultatele trebuie să fie disponibile înainte ca semințele să fie ambalate și plasate în banca de gene, astfel încât semințele de calitate slabă să poată fi identificate și regenerare înainte de depozitare. În cazul în care viabilitatea nu poate fi stabilită înainte de depozitare, semințele trebuie să fie depozitate pe termen lung pentru a le asigura siguranța, în așteptarea rezultatelor testului.

Cel mai precis test de viabilitate este testul de germinație și acest lucru va fi descris aici. Testul de germinație se face în condiții controlate pentru a afla câte semințe vor germina și vor produce plantule normale, care s-ar putea dezvolta în plante normale mature din punct de vedere

reproductiv. Comitetul consultativ pentru depozitarea semințelor al IBPGR (Consiliul Internațional pentru Resursele Genetice Vegetale) recomandă ca pentru testul inițial de germinație a speciilor pentru care este disponibilă o tehnică rezonabilă de germinare, să fie acceptat un minim de două repetări folosind 200 de semințe (100 semințe per repetare), cu condiția că capacitatea germinativă să depășească 90%. În caz contrar, alte 200 de semințe ar trebui să fie testate și rezultatul general privind viabilitatea semințelor va fi media celor două teste. Sunt disponibile și alte teste biochimice pentru a testa viabilitatea. Acestea au avantajul de a fi mai rapide, dar nu sunt la fel de exacte și necesită abilități și practici considerabile în implementarea și interpretarea lor. Acestea nu sunt recomandate de Comitetul consultativ pentru depozitarea semințelor al IBPGR pentru uz general ca teste pentru viabilitatea semințelor.

Proceduri

Diferitele metode de determinare a viabilității semințelor servesc la asigurarea semințelor cu un substrat care oferă acestora cantitatea corespunzătoare de apă pe care semințele trebuie să o asimileze (să o absoarbă) și să germineze.

Toate semințele au cerințe specifice de lumină și temperatură, dar o regulă generală este că majoritatea semințelor vor germina atunci când temperatura este între 20 și 30°C, este suficientă apă în substrat și semințele primesc cantitatea de lumină necesară.

Semințele pentru test trebuie selectate aleatoriu din întregul lot de semințe. Standardele internaționale pentru testarea semințelor sugerează ca 200 de semințe să fie utilizate într-un test de germinație. Dacă această cantitate de semințe este dificil de obținut, pot fi utilizate 100 sau chiar 50 de semințe. Numărul total de semințe disponibile se va diviza în două, astfel încât să se obțină două repetări pentru testul de germinație. Dacă aveți mai multe semințe (salată, varză, roșii etc.), atunci patru repetări a câte 100 de semințe vor oferi rezultate foarte sigure.

Testarea viabilității semințelor prin efectuarea unui test de germinație a semințelor este o modalitate importantă de a deduce calitatea semințelor, de a determina eficacitatea metodelor de depozitare a semințelor și de a vă ajuta să plantați cantitatea adecvată de semințe. Prin efectuarea acestor teste simple de viabilitate a semințelor, puteți economisi mai eficient semințele și puteți ajuta producătorii agricoli să devină mai responsabili în economisirea și plantarea diversității genetice importante.

Pentru a decide dacă este necesară repetarea testului se va lua în considerare procentul mediu de viabilitate a mostrei. Dacă acesta depășește 90%, testul se va accepta ca fiind valid și această valoare se va utiliza ca viabilitate adevărată. Dacă rezultatul este de 90% sau mai mic, testul se va repeta folosind alte 200 de semințe, urmând aceleași proceduri. Procentul mediu de viabilitate se va calcula în baza rezultatelor celor două teste și acesta va fi rezultatul general al testului.

Vigoarea semințelor

Vigoarea semințelor este definită ca „Totalitatea proprietăților semințelor care determină nivelul de activitate și performanță a semințelor sau a lotului de semințe în timpul germinării și apariției plantulelor”. În orice lot de semințe, pierderea vigorii semințelor reprezintă reducerea capacității semințelor de a îndeplini toate funcțiile fiziologice necesare pentru a se dezvolta. Acest proces, numit îmbătrânire fiziologică (sau deteriorare), începe înainte de recoltare și continuă în timpul recoltării, prelucrării și depozitării. Procesul reduce treptat capacitățile de performanță, din cauza, *de exemplu*, a modificărilor integrității membranei celulare, activității enzimei și sintezei proteinelor. Aceste modificări biochimice pot apărea foarte repede (în câteva zile) sau mai lent (ani), în funcție de factorii genetici, de producție și de mediu care nu sunt încă pe deplin înțeleși. Punctul final al acestei deteriorări este, în cele din urmă, moartea semințelor (adică, pierderea completă a germinării). Cu toate acestea, semințele își pierd vigoarea înainte de a pierde capacitatea de germinare. De aceea loturile de semințe cu valori similare ridicate ale germinației se pot deosebi

în funcție de vârsta fiziologică (gradul de deteriorare) și, prin urmare, se deosebesc în ceea ce privește vigoarea și capacitatea de a se dezvolta. Aceste diferențe de vigoare a semințelor există în loturile de semințe din speciile agricole, horticoale și silvicoale (ISTA, 2009).

Efectul depozitării asupra viabilității și vigorii

Cel mai mare randament de semințe în agricultură se atinge în condiții normale de nutriție și de mediu. Potențialul de stocare al loturilor de semințe este legat de stadiul lor de deteriorare (starea de vigoare) la începutul perioadei în stocare. Dacă mediul de depozitare expune semințele la condiții de stres (de exemplu, modificări de temperatură sau umiditate relativă în condiții de depozitare necontrolată), loturile de semințe cu vigoare sporită vor putea rezista mai bine acestor stresuri de mediu și vor scădea calitatea la un ritm mai lent decât loturile de semințe cu vigoare mai redusă. Chiar și în condiții controlate de depozitare (adică, temperatură scăzută și conținut scăzut de umiditate a semințelor), performanța după depozitare depinde de starea de vigoare a lotului de semințe (IATA, 2009). Utilizarea containerelor sigilate ermetic, a desicanților și a temperaturilor scăzute îmbunătățește stocabilitatea, deoarece mai multe procese și produse fiziologice și biochimice sunt regulate în timpul depozitării uscate. Îmbătrânirea accelerată a semințelor indusă de câteva zile de expunere la temperaturi ridicate și umiditate este recunoscută drept un indicator exact al viabilității și al stocabilității semințelor. Unele dintre efectele dăunătoare ale îmbătrânirii sunt asociate cu deteriorările care apar la nivelul membranelor, acizilor nucleici și proteinelor. Standardizarea condițiilor adecvate de condiționare, ambalare și depozitare a semințelor ar putea asigura o calitate satisfăcătoare a semințelor de ceapă în momentul însămânțării. Rata de deteriorare a semințelor este influențată de factori de mediu și biologici confuzi. Temperaturile ridicate în timpul depozitării sporesc deteriorarea semințelor, la fel ca și conținutul ridicat de umiditate a semințelor. Efectele relative ale conținutului de umiditate a semințelor și ale temperaturii asupra longevității diferă în funcție de specie și de compoziția structurală și biochimică a semințelor. Un model complet de pierdere a viabilității ar putea fi înțeles pe baza umidității semințelor și a temperaturii de depozitare. Fluctuațiile drastice, precum și temperaturile și umiditatea ridicată predominante în condițiile subtropicale indiene sporesc pierderea capacității de germinației la semințele de ceapă stocate.

Viabilitatea semințelor după mai mulți ani de depozitare

Eroziunea genetică a materialului păstrat în băncile de gene este considerată o problemă relevantă la nivel internațional (FAO, 1997). Din acest motiv, se recomandă monitorizarea principalilor factori care cauzează eroziunea genetică în colecțiile *ex situ* pentru a minimiza pierderea diversității genetice. Acești factori includ calitatea scăzută a materialului original, uscarea excesivă a semințelor înainte de depozitare, creșterea temperaturii sau a conținutului de umiditate al semințelor în timpul conservării, lipsa regenerării, pierderi de germoplasmă în timpul înmulțirii, modificări fiziologice ale semințelor în timpul depozitării, fără a se stabili careva pierdere a germinației cauzată de lipsa monitorizării viabilității (FAO, 1997). În general, combinația de $3\pm 7\%$ a conținutului de umiditate și temperatură de depozitare sub 8°C , ar permite conservarea pe termen lung a semințelor (FAO/IPGRI, 1994). Însă, și în cazul semințelor stocate în condiții controlate, viabilitatea poate scădea ca urmare a unui proces de deteriorare.

Testarea vigorii semințelor

Testul standard de germinație este un indicator al calității semințelor, care poate fi utilizat pentru a prezice potențialul de răsărire în condiții de câmp, dacă condițiile solului sunt aproape ideale. Cu toate acestea, condițiile în care se găsesc semințele în timpul examinării sunt adesea în conflict cu condițiile de câmp. Germinarea în condiții de câmp depinde de viabilitatea semințelor. Viabilitatea semințelor sau vigoarea semințelor sunt ansamblul de caracteristici care determină activitatea și comportamentul loturilor de semințe cu capacitate de germinație acceptabilă din punct de vedere comercial în diferite condiții de mediu. În completare la cele menționate mai sus,

longevitatea semințelor este determinată de vigoarea acestora fără consecințe negative (ISTA, 2009). Pentru a obține informații mai precise despre calitatea lotului de semințe se utilizează diferite teste de vigoare. Testarea viabilității semințelor folosind diferite teste de vigoare a semințelor este foarte semnificativă, deoarece testele de vigoare dau rezultate, care sunt adesea mai bine corelate cu rezultatele germinării pe câmp în condiții de mediu nefavorabile, decât rezultatele obținute prin aplicarea testului standard de germinație în laborator.

Testele de vigoare ar putea fi grupate în trei grupe:

- Testele fizice determină caracteristici ale semințelor, cum ar fi mărimea și masa. Aceste teste sunt ieftine, rapide, pot fi aplicate unui număr mare de probe și sunt corelate pozitiv cu vigoarea semințelor. Principala caracteristică a dezvoltării semințelor este acumularea de materiale nutritive, care este, de asemenea, în corelație directă cu vigoarea, adică cu dimensiunea și masa semințelor.
- Testele fiziologice care utilizează parametri de germinație și creștere. Există două tipuri de astfel de teste: Primul tip, când germinarea se face în condiții favorabile (germinarea standard în laborator și testul intensității creșterii). Al doilea tip, atunci când semințele sunt expuse la condiții de mediu nefavorabile (test la rece, test de îmbătrânire accelerată și test Hiltner).
- Testele biochimice sunt considerate metode indirecte pentru estimarea valorii semințelor. Acestea include: testul Tetrazolijum, măsurările conductometrice, activitate enzimatică și respirația.

Comitetul ISTA pentru vigoarea semințelor a stabilit două criterii de evaluare a performanței metodelor de testare a vigorii semințelor pentru diferite culturi: (i) Metoda reproductibilității vigorii, și (ii) Relația dintre rezultatele testelor de vigoare și răsărirea plantulelor în solul de câmp.

Nu există un test de vigoare universal acceptat pentru toate tipurile de semințe. Determinarea următoarelor teste de vigoare va fi utilă pentru a obține informații suplimentare despre calitatea semințelor.

1. Testele de creștere

Principiul: Testele de creștere se bazează pe principiul că semințele viguroase cresc într-un ritm mai rapid decât semințele cu vigoare slabă chiar și în medii favorabile. Semințele viguroase germinează, metabolizează și se adaptează mai rapid în câmp. Prin urmare, orice metodă utilizată pentru a determina rapiditatea creșterii plantulelor va indica nivelul de vigoare a semințelor.

Aparate și echipamente: Sunt necesare toate echipamentele și materialele folosite și pentru efectuarea unui test de germinație. De asemenea, este necesar un cântar de laborator și o etuvă cu aer.

Procedura

(a) *Prima numărare:* Testul se face împreună cu testul obișnuit de germinație. Se calculează numărul plantulelor normale, germinate în prima zi de numărare, după cum se specifică în testul de germinație pentru fiecare specie. Numărul de plantule normale oferă o idee despre nivelul de vigoare a semințelor în probă. Cu cât numărul plantulelor normale este mai mare, cu atât este mai ridicată vigoarea semințelor.

(b) *Rata de creștere a plantulelor și masa uscată:* Plantulele sunt crescute fie în laborator, seră sau câmp. În laborator, trebuie să se urmeze metoda prosopului de bucătărie din hârtiei. Zece semințe sunt plantate în mijlocul prosopului umede, astfel încât micropilele să fie orientate spre partea de jos pentru a evita răsucirea rădăcinii. Prosoapele de hârtie rulate se păstrează în germinator unde se mențin la temperatura recomandată pentru cultura în referință. După o anumită perioadă de timp (5-10 zile), prosopul de hârtie este îndepărtat și se aleg cinci plantule, se măsoară lungimea acestora și se calculează lungimea medie a plantulelor. Loturile de semințe care dezvoltă

plantule mai înalte sunt considerate mai viguroase decât loturile de semințe care dezvoltă plantule mai scurte. Pentru determinarea masei uscate, plantulele sunt preluate și uscate într-o etuvă la temperatura de 100°C timp de 24 de ore. Masa uscată a plantulelor oferă informații suplimentare pentru evaluarea vigurii semințelor.

(c) *Viteza de germinație*: În substratul recomandat pentru germinare se plantează 100 în patru repetări. Substratul este păstrat într-un germinator unde se mențin la temperatura recomandată pentru cultura în referință. Numărul de plantule care apar zilnic sunt numărate din ziua plantării semințelor în mediu până când germinarea este completă. Ulterior, se calculează indicii de germinație (GI) utilizând următoarea formulă:

$$GI = \frac{n}{d}$$

unde, n = numărul de plantule care apar în ziua „d”
 d = zi după plantare

Lotul de semințe cu un indice de germinație mai mare este considerat a fi mai viguros.

(d) *Indicele de vigoare a seminței (IVS)*: Acesta se calculează prin determinarea procentului de germinație și a lungimii plantulelor aceluiși lot de semințe. Cincizeci de semințe fiecare în patru repetări sunt germinate în prosop de hârtie, așa cum este stabilit pentru specia de cultură în testul de germinație. În timpul evaluării numărului de plantule normale la momentul numărării finale, se măsoară și lungimea a 5 plantule selectate aleatoriu. Indicele de vigoare a seminței este calculat prin înmulțirea capacității de germinare (%) și a lungimii plantulelor (mm). Lotul de semințe care oferă un indice de vigoare a seminței mai mare este considerat a fi mai viguros.

2. Testul Hiltner (Testul zgurii de cărămidă)

Principiul: Testul a fost elaborat de Hiltner în Germania, în 1917. Acesta a observat că semințele culturilor de cereale afectate de boala Fusarium au reușit să germineze în timpul testului obișnuit, dar nu au reușit să răsară din stratul de 2-3 mm de zgură de cărămidă. În comparație, semințele sănătoase au putut să iasă din stratul de zgură de cărămidă. Principiul este că plantulele slabe nu sunt capabile să genereze suficientă forță pentru a depăși presiunea zgurii de cărămidă, astfel această metodă poate fi utilizată pentru a diferenția nivelurile de vigoare a semințelor de cereale. Această metodă s-a dovedit a fi una reproductibilă și a fost asociată cu răsărirea în condiții de câmp în cazul grâului.

Aparate și echipamente: cutie de germinație, tavă de aluminiu, nisip, marcator pentru nisip, zgură de cărămidă de 2-3 mm, germinator, probă de semințe.

Procedura: Nisipul este cernut, umezit și așezat în cutia de germinație, lăsând aproximativ 3 cm goale până la partea superioară. În fiecare cutie se așează câte 100 semințe în adânciturile făcute de ajutorul unui marcator pentru nisip. După aceasta, peste semințe se așează un strat de 2-2,5 cm de zgură de cărămidă poroasă. Cutia este păstrată în germinator la temperatura corespunzătoare. La sfârșitul perioadei de germinație, cutia este scoasă din germinator și sunt numărate plantulele care au răsărit prin stratul de zgură de cărămidă. Procentul de plantule dezvoltate este utilizat pentru a compara vigoarea semințelor din diferite loturi. Testul trebuie repetat de 3-4 ori pentru a obține valoare de încredere.

3. Testul la rece (cold-test)

Principiul: Testul la rece a fost elaborat în SUA pentru a evalua vigoarea semințelor de porumb. În SUA, când porumbul este plantat la sfârșitul primăverii, solul este umed și rece. Semințele slabe nu germinează și nu se adaptează. Prin urmare, pentru a simula condițiile reale de câmp observate în momentul plantării porumbului, a fost dezvoltat testul la rece. Testul își propune să facă diferența între loturile de semințe slabe și cele viguroase, supunându-le la o temperatură

scăzută înainte de germinarea la temperatura optimă. Testul a fost criticat pentru utilizarea solului de câmp, care variază foarte mult de la un loc la altul.

Aparate și echipamente: tavă de aluminiu, sol de câmp, marcator pentru nisip, germinator, probă de semințe.

Procedura: După măcinare și cernerea corespunzătoare, solul este așezat în tavă la o adâncime de până la 2 cm. Pe nisip sunt așezate 50 semințe, care sunt acoperite cu un alt strat de sol gros de 2 cm. Solul este compactat și udat suficient pentru a atinge aproximativ 70% din capacitatea sa de reținere a apei. Temperatura apei trebuie să fie de 10°C. După udare, tăvile sunt acoperite cu pungi din polietilenă și plasate în frigider la temperatura de 10°C pentru o săptămână. După o săptămână tăvile sunt scoase și plasate în germinator la temperatura de 25°C. Apoi se numără plantulele care au apărut după 4 zile. Procentul de germinație este calculat prin numărarea plantulelor normale ca și în cazul testului de germinație. Cu cât procentul de germinație este mai mare, cu atât este mai ridicată vigoarea.

4. Testul de accelerare a îmbătrânirii

Principiul: Testul de accelerare a îmbătrânirii a fost elaborat la Laboratorul de Tehnologie a Semințelor, Universitatea de Stat din Mississippi, SUA, pentru determinarea potențialului de depozitare a loturilor de semințe. Procesul de îmbătrânire este accelerat prin expunerea semințelor la temperaturi ridicate și umiditate relativă sporită într-o cameră înainte de germinația standard. Loturile de semințe care arată o germinație ridicată în cadrul testului de accelerare a îmbătrânirii vor menține o viabilitate ridicată și în timpul depozitării în condiții ambiante. Prin urmare, testul de îmbătrânire indică performanța lotului de semințe în timpul depozitării în condiții ambiante. Testele efectuate la Pantnagar cu semințe de soia Bragg au arătat o relație pozitivă între testul de accelerare a îmbătrânirii de 3 zile (temperatura de 42-45°C, umiditatea relativă de 95-100%) și viabilitatea după 6 luni de depozitare în condiții ambiante. Un dezavantaj al testului este dezvoltarea de fungi pe semințe în condițiile de temperatură și umiditate ridicate.

Aparate și echipamente: cameră de accelerare a îmbătrânirii, echipamente pentru testul de germinație, probe de semințe, borcan etanș, pânză de muselină, plasă de sârmă etc.

Procedura: O sută de semințe fiecare în patru repetări sunt legate într-o pânză fină de muselină. Semințele sunt plasate în borcan pe o plasă de sârmă. Partea inferioară a borcanului este umplută cu apă. Nu trebuie să existe contact direct între apă și semințe. Borcanul este acoperit cu capacul și sigilat cu ceară de parafină pentru a-l face etanș la aer. Borcanul este apoi plasat în camera de accelerare a îmbătrânirii menținută la temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 3-5 zile. După perioada respectivă borcanul se scoate și semințele sunt răcite într-un desicator. Semințele sunt apoi testate cu ajutorul unui test de germinație obișnuit specific diferitelor culturi. Procentul de germinație oferă nivelul de vigoare a semințelor. Cu cât procentul de germinație este mai mare, cu atât vigoarea semințelor este mai ridicată.

Importanța testării vigoriei semințelor

Vigoarea semințelor este o componentă importantă a calității semințelor și aceasta trebuie să fie la niveluri satisfăcătoare, pe lângă criteriile tradiționale de calitate precum umiditatea, puritatea, capacitatea de germinație și sănătatea semințelor, pentru a obține o adaptabilitate optimă și o producție ridicată de culturi. Pe măsură ce tehnicile agricole și horticole devin din ce în ce mai sofisticate, nevoia de semințe cu vigoare mare va crește și vor fi necesare standarde de testare, similare cu cele recunoscute pentru germinare. Tehnologia de testare a vigoriei semințelor nu a fost perfecționată până acum, astfel încât nici nu există o singură metodă universal acceptată de testare a vigoriei semințelor. Sunt necesare cercetări pentru a îmbunătăți în continuare metodele actuale de testare a vigoriei semințelor și pentru a dezvolta noi metode care se referă mai mult la condițiile de câmp/ de depozitare.

Apendice

Puritate analitică - Procentul de semințe din aceeași specie de cultură, dar nu neapărat același soi de cultură. Impuritățile poate include materii inerte, semințe de buruieni, semințe deteriorate. Procedurile obișnuite de testare a semințelor nu pot, în toate cazurile, să facă distincția între diferite soiuri ale aceleiași specii, semințele din diferite culturi (specii) pot fi identificate în laboratorul de semințe prin examinarea îndeaproape a seminței.

Semințe certificate - Semințele care corespund unui standard stabilit de calitate, produse în cadrul unui sistem de multiplicare controlată, fie din semințe de bază, fie dintr-o generație anterioară de semințe certificate. Acestea sunt folosite fie pentru producerea unei alte generații de semințe certificate, fie pentru semănare pentru a produce alimente, furaje etc.

Semințe comerciale - Semințele destinate producției de culturi, dar care nu au fost produse sub un sistem de certificare recunoscut.

Probă compusă - probă care se obține prin amestecarea probelor primare extrase din containerele cu lotul de semințe în scopul testării.

Germinare - Inițierea creșterii active a tuturor părților embrionare esențiale necesare pentru dezvoltarea cu succes a plantulelor. Într-un test de semințe, este considerată ca răsărirea și dezvoltarea din semințe a acelor structuri esențiale care indică capacitatea embrionului de a se dezvolta într-o plantă normală în condiții favorabile de câmp.

Capacitate germinativă - Procentul de semințe pure care germinează în cadrul unui test standard în plantule normale, după cum sunt definite în Regulile de testare a semințelor.

ISTA - Asociația internațională de testare a semințelor, care împreună cu laboratoarele membre stabilesc standardele și procedurile internaționale pentru testarea semințelor.

Conținut de umiditate - Masa apei disponibile într-o probă de semințe exprimată ca procent din masa totală a semințelor în momentul determinării.

Certificat fito-sanitar - Un certificat emis de o autoritate legal constituită a administrației guvernamentale sau de stat, care să ateste că un lot de semințe a fost inspectat și s-a constatat că este liber de infestare cu boală în carantină. Aceste certificate sunt frecvent utilizate în acordul internațional de comerț cu semințe pentru a preveni răspândirea între țări a bolilor transmise de semințe.

Probă primară - porțiune mică de semințe prelevată dintr-un punct dintr-un lot de semințe în timpul procesului de eșantionare.

Semințe pure - Se referă la speciile menționate pe etichetă sau care se consideră că predomină în test și trebuie să includă toate soiurile botanice și soiurile din specia respectivă, inclusiv semințe întregi, semințe nematurate, semințe bolnave și semințe mai mari de jumătate din dimensiunea inițială sau după cum sunt definite de regulile ISTA pentru testarea semințelor.

Semințe înregistrate - O clasă de semințe din schema de semințe certificate, produse din semințe de fundație și plantate pentru a produce semințe certificate.

Umiditate relativă - Raportul, exprimat în procente, dintre fracția vaporilor de apă prezentă efectiv în aer și cea mai mare fracție pe care ar putea să o conțină la temperatura respectivă.

Eșantionare - Metoda prin care se prelevează un eșantion reprezentativ dintr-un lot de semințe pentru a fi trimis la laborator pentru analiză.

Sămânță - ovulul maturat format dintr-o plantă embrionară împreună cu un depozit de substanțe nutritive sau alte structuri, inclusiv ovulul folosit de producătorii agricoli ca material de plantare.

Lot de semințe - O cantitate de semințe de un soi, omogene prin origine și istorie și cu un număr de referință controlat.

Conținutul de umiditate în echilibru al semințelor - Procentul de umiditate dintr-o sămânță la o anumită temperatură și umiditate relativă.

Vigoarea semințelor - Este totalitatea proprietăților semințelor care determină nivelul de activitate și performanță a semințelor sau a lotului de semințe în timpul germinării în diferite condiții de mediu. Un lot de semințe cu grad ridicat de vigoare este unul care este capabil să funcționeze bine chiar și în condiții de mediu care nu sunt optime pentru specie.

Probă expeditată - probă transmisă la laboratorul de testare. Aceasta trebuie să aibă cel puțin dimensiunea specificată în reglementările ISTA și poate cuprinde fie toată proba compusă, fie o sub-probă din aceasta.

Sub-probă - porțiunea probei obținute prin reducere utilizând una dintre metodele de eșantionare prescrise în reglementările ISTA.

Referințe

1. International Rules for Seed Testing ISTA (2009): International Seed Testing Association, Switzerland.
2. International Rules for Seed Testing, 2004 Edition, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland
3. Quality Declared Seed: Technical Guidelines for Standards and Procedures, 2006, FAO Plant
4. Production and Protection Paper 185 Rome Italy
5. **Emilio Cervantes, José Javier Martín, and Ezzeddine Saadaoui: Updated Methods for Seed Shape Analysis Hindawi Publishing Corporation Scientifica Volume 2016, Article ID5691825, 10 pages**
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/5691825>
6. Hemender et al.; CCAST, 27(1): 1-11, 2018; Article no.CCAST.40945

CAPITOLUL 4. ANALIZA DE LABORATOR ȘI EFECTUAREA ACESTEIA

Domeniul general de aplicare

Scopul acestui capitol este de a prezenta pe scurt câteva concepte generale și instrumente practice importante pentru efectuarea analizei de laborator în orice cercetare aplicată. Acest capitol cuprinde material ce stabilește o parte din fundamentele desfășurării cercetării cu bune practici de laborator. Capitolul conține definiții principale, cerințe și orientări pentru organizarea laboratorului, cerințe de validare a metodei, descrierea generală a metodelor, teste.

4.1 Conceptul de analiză (cercetări aplicate)

Analize și rapoarte. Identifică și descrie elementele de bază necesare pentru gestionarea testelor analitice și studiilor științifice, planificarea, efectuarea, raportarea, monitorizarea acestora și etica la laborator.

4.1.1. Introducere

Este bine cunoscut faptul că toate cunoștințele și teoriile științifice au provenit din observațiile practice și din experimentare: acest lucru este valabil și pentru disciplinele variate precum microscopia și genetica moleculară. Investigațiile în știința aplicată, știința și tehnologia agroalimentară, fie de industria agroalimentară, agențiile guvernamentale de siguranță alimentară sau universități, necesită adesea determinarea compoziției și caracteristicilor materiei prime, alimentelor și furajelor. Tendințele și cerințele consumatorilor, reglementările naționale și internaționale și realitățile industriei alimentare reprezintă o provocare pentru oamenii de știință din domeniul agroalimentar și pentru laboratoarele de testare analitică, care lucrează pentru a monitoriza compoziția alimentelor și pentru a asigura calitatea și siguranța aprovizionării cu alimente.

Natura eșantionului și motivul specific pentru analiză dictează alegerea metodelor analitice. Viteza, precizia, acuratețea, robustețea, specificitatea și sensibilitatea sunt, adesea, factori cheie în această alegere. Pentru a asigura utilitatea unei metode este necesară validarea acesteia pentru o anumită matrice de testare analizată. Metodele de analiză elaborate și aprobate de mai multe organizații științifice nonprofit permit efectuarea de comparații standardizate ale rezultatelor între diferite laboratoare și evaluarea procedurilor mai puțin standardizate. Astfel de metode oficiale sunt esențiale în analiza materiei prime, a alimentelor și a furajelor, pentru a asigura că acestea îndeplinesc cerințele legale stabilite de agențiile de stat. Reglementările și standardele internaționale

relevante pentru analiza materiei prime, a produselor alimentare și a furajelor sunt menționate în prezentul capitol, dar sunt examinate mai detaliat în alte capitole.

4.1.2. Cerințe generale de laborator și procedurale

Cerințe de bază

Orice lucrare de laborator care implică lucrul cu organisme vii, animale sau microorganisme trebuie chibzuită cu atenție. Legea privind sănătatea și siguranța impune laboratoarelor și instituțiilor academice să asigure un mediu de lucru sigur și fără riscuri pentru sănătate. După caz, trebuie să se ofere instruire și informații cu privire la practicile de lucru în siguranță. Personalul de laborator trebuie să acționeze cu diligență rezonabilă pentru a asigura sănătatea și siguranța sa și a celor din jur și nu trebuie să utilizeze în mod greșit echipamentele de siguranță. Munca în condiții de siguranță înseamnă respectarea unui cod de practici sigure, susținut de legislație, alături de obligația morală de a evita vătămarea personală și a celor din jur. Aspectele etice și umane care trebuie luate în considerare înainte de efectuarea oricărei lucrări includ: posibile daune faunei și florei; siguranța altora în cadrul grupului; semnificația lucrării dvs. pentru alții, de exemplu pentru proprietarii de terenuri sau alți utilizatori. Fără un cadru etic, se pot lua doar decizii subiective, bazate exclusiv pe opinii și puncte de vedere personale, decât pe analize obiective, așa cum este discutat mai detaliat în alte capitole.

Organizarea laboratorului

Laboratorul trebuie să dispună de încăperile, echipamentele, personalul calificat, sistemele și serviciile de asistență necesare pentru gestionarea și desfășurarea activităților de laborator. Toate laboratoarele de cercetare aplicată și de testare agroalimentară trebuie să respecte cerințele în vigoare cu privire la reglementările de siguranță și recomandările de siguranță pentru producători și acestea trebuie să activeze în conformitate cu liniile directoare prezentate în GLP și standardele ISO/IEC 17025. Bazarea pe aceste standarde care abordează atât riscurile, cât și oportunitățile, stabilește un fundament pentru creșterea eficacității sistemului de management al laboratorului, obținerea unor rezultate îmbunătățite și prevenirea efectelor negative. Laboratorul este responsabil să decidă care sunt riscurile și oportunitățile care trebuie abordate. Este foarte important ca în orice laborator să nu existe conflicte de interese sau, dacă există, să fie rezolvate astfel încât să nu influențeze negativ activitățile ulterioare ale laboratorului. Laboratorul documentează cerințele de competență pentru fiecare funcție care influențează rezultatele activităților de laborator, inclusiv cerințele privind studiile, calificarea, instruirea, cunoștințele tehnice, abilitățile și experiența.

Încăperile și condițiile ambiante trebuie să fie adecvate activităților de laborator și nu trebuie să afecțeze negativ validitatea rezultatelor. Trebuie prevăzut spațiu de laborator separat, după caz, pentru efectuarea procedurilor de rutină și specializate. Separarea fizică prin utilizarea diferitor încăperi este cel mai eficient și preferabil mod de a asigura zone separate de lucru, dar pot fi utilizate și alte metode ca protecție împotriva contaminării, cu condiția ca eficacitatea acestora să fie similară. De exemplu, contaminarea accidentală a ADN-ului poate fi cauzată de praf și răspândirea de aerosoli. În consecință, organizarea zonei de lucru în laborator se bazează, în mod logic, pe includerea sistematică a etapelor metodologice implicate în producerea rezultatelor și pe principiul „fluxului direct” pentru manipularea eșantionului. Personalul trebuie să poarte diferite halate de laborator în diferite zone de lucru, de asemenea, să poarte mănuși de unică folosință. Mănușile și halatele de laborator trebuie schimbate cu regularitate. Reactivii și soluțiile trebuie păstrate la temperatura camerei, dacă nu se specifică altfel. Influențele care pot afecta negativ validitatea rezultatelor pot include, dar nu se limitează la, contaminarea microbiană, praf, perturbații electromagnetice, radiații, umiditate, sursă electrică, temperatură, sunet și vibrații și toți acești parametri trebuie să fie monitorizați, controlați și înregistrați.

În general, laboratoarele dețin echipamente, inclusiv: instrumente de măsurare, care trebuie calibrate, software, standarde de măsurare, materiale de referință, date de referință, reactivi, consumabile sau aparate auxiliare, care sunt necesare pentru efectuarea corectă a activităților de laborator și care pot influența rezultatele. Fiecare echipament trebuie să aibă proceduri de standard

de operare (SOP) pentru operarea, calibrarea și întreținerea de rutină. Aparatele și echipamentele trebuie întreținute conform instrucțiunilor producătorului.

Personalul trebuie să utilizeze metode și proceduri adecvate pentru toate activitățile de laborator și, după caz, pentru evaluarea incertitudinii de măsurare, precum și tehnici statistice pentru analiza datelor. Rezultatele măsurărilor trebuie să poată fi urmărite și demonstrate cu ajutorul sistemului internațional de unități (SI). Toate metodele, procedurile și documentația justificativă, precum instrucțiunile, standardele, manualele și datele de referință relevante pentru activitățile de laborator, trebuie să fie actualizate și să fie puse la dispoziția personalului. Laboratorul trebuie să valideze metodele interne nestandardizate, dezvoltate în laborator. Caracteristicile de performanță ale metodelor validate pot include: domeniul de măsurare, acuratețea, incertitudinea măsurării rezultatelor, limita de detectare, limita de cuantificare, selectivitatea metodei, linearitatea, repetabilitatea sau reproductibilitatea, robustețea față de influențele externe sau sensibilitatea încrucișată împotriva interferențelor din matricea eșantionului sau a obiectului testat și eroarea sistematică. Aceste informații sunt analizate mai detaliat în alte capitole.

Protocoloale și proceduri standard de operare

Laboratoarele trebuie să aplice proceduri standard de operare (SOP), care reprezintă o descriere a modului de efectuare a anumitor teste de laborator sau activități de rutină care nu sunt specificate în detaliu în planurile de studiu sau în ghidurile de testare. Protocoloalele de studiu definesc „ce” și „când” se va face în timpul testării; SOP-urile definesc „cum” să se desfășoare activități specificate în protocol. SOP-urile trebuie să fie suficient de detaliate pentru a oferi indicații importante personalului pentru desfășurarea activităților de laborator de rutină. Dacă pentru studiu se vor aplica excepții de la SOP, atunci aceste excepții ar trebui descrise în protocol. Protocolul trebuie să enumere SOP-urile utilizate într-un anumit studiu. Dacă o activitate de studiu sau o cercetare nu este încă „standard” sau se intenționează a fi o acțiune unică, este acceptabil să se includă o descriere detaliată a „modului de desfășurare” a activității în protocolul de studiu sau într-un caiet de laborator. Cu toate acestea, dacă astfel de activități devin de rutină, ar trebui elaborat un SOP. Primul SOP care ar trebui scris este SOP-ul pentru scrierea SOP-urilor. Acest SOP ar trebui să conțină îndrumări privind conținutul fiecărui SOP, sistemul de numerotare pentru SOP-uri și sistemul de evaluare, revizuire și acceptare a SOP-urilor. Copiile SOP-urilor trebuie să fie accesibile personalului de laborator. Procedurile standard de operare sunt documente vii și necesită totuși îngrijire și întreținere. Actualizarea manualelor SOP continuă să fie un efort major pentru laboratoare.

O bună tehnică de laborator a inclus întotdeauna etichetarea adecvată a reactivilor și soluțiilor, care trebuie să includă cele patru informații: „Identitatea”, „titrul sau concentrația”, „cerințe de stocare”, „data de expirare”. Pentru astfel de materiale nu există o dată de expirare cunoscută și este acceptabil să se indice „NICI UNA” sau „N/A” (nu se aplică) pe etichetă pentru data de expirare. În acest caz, este suficient să se atribue date de expirare în baza referințelor din literatură și/sau a experienței de laborator.

Procedura generală de cercetare/testare aplicată și agroalimentară include următorii pași:

- Eșantionarea;
- Obținerea unei probe reprezentative;
- Omogenizarea probei de laborator;
- Reducerea probei de laborator la proba de testare;
- Pregătirea și mărunțirea probei;
- Extragerea analitului;
- Testarea, interpretarea și raportarea rezultatelor.

Efectuarea analizei este unică pentru fiecare componentă sau caracteristică de analizat și poate fi unică pentru un anumit tip de materie primă, alimente și furaje. Alegerea unei metode depinde în mare măsură de obiectivul măsurării. De exemplu, metodele utilizate pentru măsurări rapide

procesate online pot fi mai puțin precise decât metodele oficiale. Metodele menționate ca de referință, definitive, oficiale sau primare sunt cele mai aplicabile într-un laborator analitic bine echipat și dotat cu personal. În analiza eșantioanelor, toate rezultatele depind de obținerea unui eșantion reprezentativ și de conversia eșantionului într-o formă care poate fi analizată. Eșantionarea este punctul inițial pentru identificarea eșantionului. Laboratoarele analitice trebuie să țină evidența probelor primite și să poată stoca datele analitice obținute din analize.

Pentru a lua decizii și a acționa pe baza rezultatelor obținute în urma efectuării testului care a determinat compoziția sau caracteristicile unei materii prime, alimente și furaje, trebuie să se întocmească raportul de testare corespunzător.

Raportul de testare

În general, raportul de testare trebuie să conțină cel puțin următoarele informații:

- 1) toate informațiile necesare pentru identificarea probei de laborator;
- 2) orice informație specială referitoare la eșantionul de laborator (de exemplu, dimensiune insuficientă, stare degradată);
- 3) referință la standardele internaționale;
- 4) declarația privind data și tipul de proceduri de eșantionare utilizate (de exemplu, referire la planul de eșantionare și metoda de eșantionare utilizate de laborator sau de alte organisme, atunci când acestea sunt relevante pentru validitatea sau aplicarea rezultatelor);
- 5) data recepționării;
- 6) condițiile de depozitare, dacă este cazul;
- 7) data de începere/sfârșit a analizei, dacă este cazul;
- 8) persoana responsabilă de analiză;
- 9) dimensiunea probei de laborator și a probei de testare;
- 10) rezultatele în conformitate cu cerințele unei anumite metode și unitățile utilizate pentru raportarea rezultatelor, precum și calibratorii și metoda de calcul utilizată;
- 11) orice observații speciale făcute în timpul testării;
- 12) orice abateri, adăugiri la sau excluderi de la specificația testului;
- 13) se vor furniza informații cu privire la unități.
- 14) incertitudinea măsurării și nivelul de încredere trebuie, la cerere, să fie puse la dispoziția utilizatorului rezultatelor.

Laboratorul va fi responsabil pentru toate informațiile furnizate în raport, cu excepția cazului în care informațiile sunt furnizate de client. Datele furnizate de client trebuie să fie clar identificate. În plus, la raport se va adăuga o declarație de declinare a responsabilității atunci când informațiile sunt furnizate de client și pot afecta valabilitatea rezultatelor. În cazul în care laboratorul nu a fost responsabil de etapa de eșantionare (de exemplu, eșantionul a fost furnizat de client), acesta va preciza în raport că rezultatele se aplică eșantionului așa cum a fost primit.

Orice laborator care efectuează studii de laborator neclinice trebuie să ofere spațiu dedicat pentru stocarea datelor brute, documentației, protocoalelor, specimenelor și a rapoartelor intermediare și finale pentru studiile finalizate. Condițiile de depozitare (de exemplu, temperatura, umiditatea) în arhive ar trebui, în mod rezonabil, să depindă de natura documentelor, specimenelor și probelor stocate.

Pe lângă testarea eșantioanelor, laboratoarele efectuează activități specifice, inclusiv, dar fără a se limita la următoarele: dezvoltarea, modificarea, verificarea, validarea metodelor și participă la testele de competență.

4.2 Validarea metodei

Introducere

Validarea analitică, asigurarea calității și controlul calității sunt termeni larg utilizați în prezent în laboratoarele de încercări.

Validarea analitică, primul nivel al asigurării calității în laborator, reprezintă conform ISO „confirmarea prin furnizare de dovezi obiective că au fost îndeplinite cerințele pentru o anumită utilizare sau o aplicare intenționate”.

Asigurarea calității (AC) reprezintă “managementul calității concentrat asupra furnizării încrederii că cerințele calității vor fi îndeplinite.”

Controlul calității (CC) este „parte a managementului calității, concentrată pe îndeplinirea cerințelor calității”. Laboratoarele trebuie să folosească metode de analiză adecvate încercărilor pe care le efectuează.

Chiar dacă în laborator se folosesc metode standardizate, laboratorul trebuie să se convingă el însuși că gradul de validare a unei anumite metode analitice este adecvat pentru scopul cerut și că laboratorul însuși este capabil să îndeplinească orice date de performanță stabilite.

Laboratoarele de testare elaborează un program de control al calității pentru a da credibilitate și relevanță rezultatelor măsurătorilor obținute în laborator.

Definiții

Validare – confirmare, prin examinarea și furnizarea de dovezi obiective că au fost îndeplinite cerințele specifice pentru un anumit scop sau o anumită utilizare și există un echilibru între costuri, riscuri și posibilități tehnice.

Mărime (măsurabilă) - atribut al unui fenomen, al unui corp sau al unei substanțe diferențiat calitativ și determinat cantitativ.

Valoarea adevărată (a unei mărimi) - valoare compatibilă cu definiția unei mărimi particulare date.

Măsurare - ansamblu de operațiuni având ca scop determinarea unei valori sau a unei mărimi.

Rezultat al unei măsurări (rezultatul analizei) - valoarea atribuită unui măsurand, obținută printr-o măsurare.

Media aritmetică - suma rezultatelor unei măsurări (suma rezultatelor analizei) raportată la numărul de valori.

Abatere - diferența dintre valorile individuale ale unei cantități și media aceluiași valori individuale.

Abatere standard - valoare numerică în unități de valori observate care măsoară împrăștierea rezultatelor.

Fidelitatea - diferență admisă între rezultatele testelor obținute în aceleași condiții de testare. Măsurarea fidelității se exprimă prin repetabilitate și reproductibilitate.

Repetabilitate - diferență admisă între rezultatele testelor obținute pe același subiect analizat, cu același dispozitiv, de același operator de testare.

Reproductibilitate - diferență admisă între rezultatele testelor obținute în două sau mai multe laboratoare.

Exactitate - diferență admisă între rezultatul testului și o valoare de referință acceptată (un material de referință).

Eroare sistematică - diferența dintre media rezultatelor obținute în urma testului și valoarea de referință acceptată (un material de referință).

Material de referință - material sau substanță cu una sau mai multe proprietăți suficient de omogene și bine stabilite pentru a fi utilizate la etalonarea unui dispozitiv de măsurat, evaluarea unei metode analitice sau atribuirea de valori materialelor.

Interval de analiză - limite ale intervalului de valori care, cu o anumită probabilitate, includ valoarea măsurandului.

Documente de referință

- **SM SR EN ISO/CEI 17025:2006** Cerințe generale pentru competența laboratoarelor de încercări și etalonări;
- **ISO 5725-3:2014 (1-6)** Exactitatea (justețea și fidelitatea) metodelor de măsurare și a rezultatelor măsurărilor;
- **Hotărârea Guvernului nr.265 din 06.04.2009** pentru transpunerea prevederilor Deciziei Comisiei nr.2002/657 din 14 august 2002 de stabilire a normelor de aplicare a Directivei 96/23/CE a Consiliului privind funcționarea metodelor de analiză și interpretarea rezultatelor;
- **Hotărârea Guvernului nr.520 din 22.06.2010** pentru transpunerea anumitor prevederi ale Regulamentului (CE) nr.1881/2006 al Comisiei din 19 decembrie 2006 privind stabilirea nivelurilor maxime pentru anumiți contaminanți din produsele alimentare;
- **Ghidul EURACHEM** - Adecvarea la scop a metodelor analitice - Un ghid de laborator pentru validarea metodelor și concepte legate de aceasta (The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics), ediția a II-a, 2014;
- **Hotărârea Guvernului nr.941 din 01.10.2010** pentru transpunerea Regulamentului (CE) nr.333/2007 al Comisiei din 28 martie 2007 de stabilire a metodelor de prelevare a probelor și de analiză pentru controlul oficial al nivelurilor de plumb, cadmiu, mercur, staniu anorganic, 3-MCPD și benzo(a)piren în produse alimentare;
- **EA 4/02 M:2013** – Estimarea incertitudinii de măsurare în etalonare;
- **EA 4/14:2013** – Selecția și utilizarea materialelor de referință;
- **EA 4/16:2013** – Liniile directoare privind exprimarea incertitudinii în încercări cantitative;
- **EA-4/18:2003** – Liniile directoare privind nivelul și frecvența de participare la încercări de competență;
- **ILAC-P9/06:2014** – Politica ILAC pentru participarea la activități de furnizare de încercări de competență.

Validarea și/sau verificarea metodelor de testare (încercări)

Laboratoarele pot utiliza atât metode standardizate (naționale și internaționale), cât și metode nestandardizate, emise de organizații tehnice relevante și literatura de specialitate, chiar și cele care conțin informații suficiente și concise despre procedura de efectuare a testelor (încercărilor) și care sunt validate în mod obligatoriu pentru a demonstra fiabilitatea și caracterul adecvat scopului sau pentru a determina modul în care laboratorul reușește să atingă performanța indicată.

Laboratorul trebuie să confirme că acesta poate aplica corect aceste metode prin teste de recuperare, teste de repetabilitate și reproductibilitate, diagrame de control, estimarea incertitudinii de măsurare.

Abaterile de la metodele standardizate trebuie identificate și justificate prin validare. Validarea metodelor de testare se realizează conform unui plan anual de validare.

Stabilirea gradului de extindere al validării

Gradul de extindere a validării și/sau verificării trebuie să țină cont de:

- relevanța parametrilor evaluați pentru utilizarea intenționată (ex: pentru determinarea reziduurilor poate fi relevantă determinarea limitelor de detecție ale metodei sau selectivitatea);
- relevanța parametrilor evaluați pentru a satisface cerințele clientului (ex: limita de detecție cu concentrația maximă admisibilă);
- natura modificărilor aduse atunci când sunt implementate îmbunătățiri ale metodei;

- natura diferențelor atunci când se compară diferite metode, echipamente diferite etc.

Validarea trebuie să fie un echilibru între costuri, riscuri și posibilități tehnice.

Validarea trebuie să fie atât de cuprinzătoare cât este necesar pentru a satisface nevoile legate de utilizare sau domeniul de aplicare dat.

Tehnicile utilizate pentru a determina performanțelor unei metode pot să fie una din următoarele:

- etalonare, utilizând standarde de referință sau materiale de referință;
- compararea rezultatelor obținute prin alte metode;
- comparații inter-laboratoare;
- evaluarea sistematică a factorilor ce influențează rezultatul;
- evaluarea incertitudinii rezultatelor.

Validarea metodelor de testare este „aprobarea” pentru o anumită utilizare, pentru o combinație de analit/matrice.

Validarea include trei segmente importante:

- utilizare specifică (cerință analitică care trebuie îndeplinită);
- dovezi obiective (parametrii de performanță ai metodei sunt calculați prin prelucrarea statistică a datelor din experiențele planificate);
- confirmare (adecvarea la scopul metodei).

Condițiile tehnice pentru validarea metodei

Pentru a fi siguri că datele furnizate ca urmare a procesului de validare sunt corecte, trebuie îndeplinite următoarele cerințe:

- Responsabilul de validare trebuie să fie o persoană competentă;
- Condițiile de mediu trebuie să corespundă cerințelor specificațiilor metodei (ex: specificațiile date de producătorul echipamentului, reactivilor, literatura de specialitate);
- Echipamentul de măsurare trebuie să fie în stare bună de funcționare, trebuie să fie etalonat înainte de validare, intervalul dintre două etalonări trebuie stabilit conform cerințelor ILAC G-24, după fiecare reetalonare, laboratorul trebuie să revalideze parametrii afectați (ex: incertitudinea de măsurare);
- Reactivii utilizați trebuie să fie potriviți pentru echipamentele care urmează să fie utilizate și termenul de valabilitate nu trebuie să fie expirat;
- Materialele de referință utilizate în procesul de validare trebuie să fie adecvate metodei care trebuie validate (ex: matricea și nivel de concentrație) și termenul de valabilitate nu trebuie să fie expirat.

Mijloacele de determinare a parametrilor de performanță includ:

- etaloane de referință,
- materiale de referință certificate;
- probe oarbe (matrici care nu conțin analit);
- probe cu analit adăugat sau probe fortificate;
- probe cu conținut de analit;
- noțiuni de statistică.

Definirea parametrilor de performanță ai metodelor analitice

1. Selectivitate/specificitate - capacitatea unei metode de a distinge între substanța analizată supusă măsurării și alte substanțe conexe (izomeri, metaboliți, produse de degradare, constituenți de matrice etc.) sau capacitatea unei metode de a separa semnalul de interes de interferențe.

Specificitatea este starea perfectă de selectivitate.

Notă: Este important să identificați cele mai probabile interferențe și să verificați efectul acestora. Interferențele pot apărea atunci când metoda răspunde semnificativ la alte specii prezente sau uneori când semnalul analitului este crescut sau redus de alte specii, indiferent dacă este observat sau nu.

$$SE = \frac{PC}{PC+NF} \times 100$$

SE = selectivitate

RC = numărul rezultatelor fiabile

NF = numărul rezultatelor nefiabile

$$SP = \frac{NC}{PF+NC} \times 100\%$$

SP = specificitate

NC = numărul de rezultate nefiabile

PF = numărul de rezultate fals fiabile

2. Repetabilitate (*r*) - gradul de concordanță între rezultatele măsurărilor succesive ale aceluiași măsurand efectuate în aceleași condiții de măsurare (aceeași procedură de măsurare, același observator, același mijloc de măsurare, utilizat în aceleași condiții, același loc, repetarea măsurărilor într-o perioadă scurtă de timp).

Data	Valorile calculate		
	a_1	a_2	a_{med}
14.07	0,408	0,385	0,3975
14.07	0,385	0,386	0,3855
Abaterea standard: $S_r = 0,0084$ $S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (a_i - \bar{a})^2}{n-1}} \quad r = S_r \cdot 2,77$			

3. Reproducibilitate - gradul de concordanță între rezultatele măsurărilor aceluiași măsurand efectuate în condiții de măsurare modificate (observatorul, mijlocul de măsurare, utilizat în condiții modificate, locații diferite, reactivi diferiți, într-o perioadă mai lungă de timp).

Notă: Pentru a obține o estimare reprezentativă a abaterii standard de repetabilitate și reproducibilitate, se recomandă efectuarea a 6-15 probe paralele.

4. Domeniul de lucru /liniaritate

Domeniul de lucru al unei metode definește intervalul de valori pentru care metoda poate fi aplicată. Pentru a determina adecvarea la scop, este necesar să se evalueze domeniul de lucru și să se confirme că acesta corespunde domeniului de concentrație al cerințelor analitice.

Pentru a determina domeniul de lucru, se analizează răspunsul/concentrația. La limita inferioară a domeniului de concentrație, intervalul vizează limita de detecție (LOD), la care este dificil de stabilit dacă semnalul care apare provine de la analit și de la fundal, și limita de cuantificare (LOQ), care este cea mai mică concentrație care poate fi determinată cu o incertitudine acceptabilă. Capătul superior al domeniului de lucru este definit de concentrații la care se observă anomalii semnificative ale sensibilității.

Între aceste limite, există o zonă în care răspunsul apare direct proporțional cu modificarea concentrației (domeniul liniar).

5. Limita de detecție (LOD) este cea mai mică concentrație a unui compus care poate fi detectată și identificată folosind echipamentul și metodologia relevantă. LOD este numeric egal cu de trei ori abaterea standard a mediei determinărilor martor ($n > 20$).

Studierea LOD se aplică metodei integrale repetate, inclusiv orice corecție a liniei datorată probei de referință sau probei martor:

$$LOD = 3s + \text{răspuns la proba martor sau de referință}$$

(unde: *s* - abatere standard)

6. Limita de cuantificare (LOQ) este cel mai scăzut conținut de analit care poate fi analizat cu o certitudine statistică rezonabilă. Dacă atât precizia, cât și acuratețea sunt constante pentru un interval de concentrații în jurul limitei de detecție, atunci limita de cuantificare (LOQ) este numeric egală cu șase până la zece ori abaterea standard a mediei determinărilor martor ($n > 20$).

7. Limita de decizie este limita la care și până la care se poate concluziona cu o probabilitate minimă de eroare că o probă nu este conformă.

8. Stabilitatea/robustețea este sensibilitatea unei metode de analiză la variații ale condițiilor experimentale, care se pot exprima ca listă de probe, de analiți, de condiții de depozitare, de mediu și/ condiții de preparare a probei pentru care metoda poate fi aplicată ca atare sau cu anumite modificări minore.

Testul de robustețe reprezintă un set de experimente care permit analistului să identifice parametrii experimentali care au un efect semnificativ asupra performanței metodei. Variațiile acestor parametri aduc modificări performanței metodei.

Este important să știm care sunt parametrii critici pentru performanța metodei. Aceștia sunt parametrii care trebuie controlați în aplicarea de rutină a metodei. Pentru parametrii critici, sunt stabilite limite de control pentru a asigura performanța dorită a metodei în viitor.

Parametrii cheie tipici vizați în cazul testului de robustețe sunt concentrația și volumele de reactivi; pH; timpul de extracție; temperatura de extracție; raportul de combinație între componentele fazei mobile pentru LC, debitele în sistemele de cromatografie; vârsta coloanei cromatografice.

9. Recuperarea este procentajul real al concentrației unei substanțe recuperată în timpul procedurii de analiză. Aceasta se determină fie folosind material de referință certificat, fie fortificând proba cu o cantitate cunoscută de compus de interes.

$$R\% = C_d/C_{ad} \times 100\%$$

C_d - Concentrația determinată;

C_{ad} - Concentrație adăugată

10. Exactitate/fidelitate – grad de concordanță între valoarea medie obținută pe o serie mare de rezultate ale testului și valoarea de referință acceptată.

11. Incertitudinea de măsurare este parametru asociat rezultatului măsurării, care caracterizează împrăștierea valorilor care, în mod rezonabil, ar putea fi atribuite măsurandului.

Incertitudine standard (u): incertitudinea rezultatului unei măsurări exprimată printr-o abatere standard.

Incertitudine standard compusă (u_c) - incertitudine standard a rezultatului unei măsurări, atunci când acel rezultat este obținut pe baza valorilor unor mărimi diferite, egală cu rădăcina pătrată pozitivă a unei sume de termeni, termenii respectivi fiind varianțele sau covarianțele acelor mărimi, ponderate în conformitate cu variația rezultatului măsurării în funcție de variația mărimilor respective.

Incertitudinea extinsă (U) este mărimea care definește un interval în jurul rezultatului unei măsurări, interval în care este de așteptat să fie cuprinsă o fracțiune ridicată a distribuției valorilor ce, în mod rezonabil, pot fi atribuite măsurandului. Incertitudinea extinsă este calculată prin incertitudinea standard compusă și un factor de putere.

Factorul de putere (k) este un factor numeric utilizat ca multiplicator al incertitudinii standard compuse pentru a obține incertitudinea extinsă.

Incertitudinea standard (u) a rezultatului testului independent, care caracterizează erorile aleatorii ale măsurărilor, se calculează utilizând formula:

$$u_{Ai} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

unde:

x_i – rezultatul celui de-al doilea test

$\bar{x}$ - media aritmetică a unui șir de n măsurări

Incertitudine standard compusă (u_c) se calculează utilizând formula:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^m u_i^2} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2}$$

unde:

u_i – evaluările de tip A și B a incertitudinii

m – numărul de factori evaluați

Pentru a obține o incertitudine extinsă U , etapa finală constă în înmulțirea incertitudinii standard compuse cu un factor de putere ales. Incertitudinea extinsă este necesară pentru a oferi un interval, în care se poate considera că este inclusă o mare parte din dispersia valorilor, care poate fi atribuită în mod responsabil măsurandului:

$$U = k \cdot u_c,$$

Prezentarea rezultatelor

Incetitudinea extinsă determină un interval în care se presupune că măsurandul se încadrează într-un anumit nivel de încredere. U se obține înmulțind $u_c(y)$, incertitudinea standard compusă, cu un factor de putere k . Alegerea factorului k se bazează pe nivelul dorit de încredere. Pentru un nivel de încredere de 95%, k este 2.

În lipsa altor cerințe, rezultatul testului y trebuie declarat împreună cu incertitudinea extinsă U , calculată folosind un factor de putere $k=2$ (care are un nivel de încredere de aproximativ 95%). Se recomandă următoarea prezentare:

$$y = x \pm U \text{ (UNITĂȚI)}$$

Selectarea parametrilor de performanță

Criteriile de validare sunt diferențiate în funcție de nivelul de acțiune aplicat pentru fiecare grup de reziduuri.

Pentru contaminanți, există o serie de ghiduri și anumite specificații legislative pentru cerințele de validare sau de performanță, cum ar fi Regulamentul (CE) nr.333/2007 pentru metalele grele (Pb, Cd, Hg, Sn anorganic), Regulamentul (CE) nr.401/2006 pentru micotoxine, Regulamentul (CE) nr.1883/2006 pentru dioxine, și PCB-uri asemănătoare dioxinelor, Regulamentul (CE) nr.396/2005 - proceduri de stabilire a ghidului tehnic de validare.

Pentru reziduurile medicamentelor de uz veterinar se aplică Decizia Comisiei 657/2002.

Pentru criteriile microbiologice, se aplică Hotărârea Guvernului Republicii Moldova nr.221 din 16.03.2009.

Parametrii de performanță vizați trebuie să ia în considerare tipul metodei de analiză utilizată (screening/confirmare, calitativ/cantitativ).

Analistul responsabil de validarea unei metode întocmește un Raport de validare care stabilește cerințele de analiză și parametrii de performanță supuși încercării.

Datele obținute din încercările pentru stabilirea parametrilor de performanță ai metodei sunt interpretate pentru a determina dacă metoda este potrivită utilizării preconizate, ținând cont de limitele de performanță impuse de standardele de lucru, de ecuația Horwitz sau de dispozițiile Regulamentelor privind performanța metodelor de încercări și interpretarea rezultatelor.

Revizuirea raportului de validare a metodei se va efectua ori de câte ori apar modificări majore (schimbarea echipamentului, înlocuirea analistului responsabil, extinderea domeniului de aplicare a metodei etc.).

4.2.1 Utilizarea testelor de competență și a altor comparații inter-laboratoare în procesul de acreditare

Testele de competență/comparațiile inter-laboratoare reprezintă unul din mecanismele fiabile și eficiente pentru a demonstra competența laboratorului/organismului de inspecție (în cazul în care activitățile de testare, care afectează și determină în mod direct rezultatul inspecției, sunt disponibile și justificate sau când sunt impuse de lege sau autorități).

Participarea la schemele PT oferă informații despre performanța sistemului de măsurare/activitate (echipamente, metode, personal etc.) și prezintă aspecte ale sistemului de management (analiza cererii, recepția și pregătirea probei, prelucrarea datelor, raportarea rezultatelor etc.), reprezentând adecvarea managementului riscurilor și identificarea necesităților de instruire ale personalului laboratorului/organismului de inspecție.

4.2.2 Selectarea și utilizarea materialelor de referință

Materialele de referință sunt un instrument important în realizarea unui număr de aspecte ale calității măsurării sunt folosite în scop de validare a metodei, etalonare, estimare a incertitudinii de măsurare, instruire precum și pentru QC intern și QA extern.

1. Tipuri de materiale de referință

MR-urile sunt utilizate pentru a susține măsurările referitoare la compoziția chimică, proprietățile biologice, clinice, fizice, tehnice și alte particularități, cum ar fi gustul și mirosul. Ele pot fi caracterizate prin „identitate” (de exemplu, structura chimică, tipul de fibră, specii microbiologice etc.) sau prin „valori ale proprietate” (de exemplu, cantitatea de substanță a entităților chimice specificate, duritate etc.). Câteva din cele mai întâlnite tipuri de materiale de referință sunt:

1. **Substanțe pure** caracterizate din punct de vedere a purității chimice și/sau a urmelor de impurități.

2. **Soluții etalon și amestecuri de gaze**, adesea preparate prin metoda gravimetrică din substanțe pure și utilizate în scopuri de etalonare.

3. **Materiale de referință matrice**, caracterizate din punct de vedere a compoziției constituenților chimici majori, minori sau în urme. Aceste materiale pot fi preparate din matrici care conțin componenții de interes sau prin prepararea amestecurilor sintetice.

4. **Materiale de referință fizico-chimice**, caracterizate din punct de vedere a proprietăților precum punctul de topire, vâscozitatea și densitatea optică.

5. **Obiecte de referință sau artefacte**, caracterizate din punct de vedere a proprietăților funcționale precum gustul, mirosul, cifra octanică, punctul de inflamare și duritatea. Acest tip include, de asemenea, specii microscopice caracterizate din punct de vedere a unor proprietăți care variază de la tipul de fibră până la speciile microbiologice.

2. Clasificarea materialelor de referință

Două clase de materiale de referință sunt recunoscute de ISO, „materiale de referință certificate” (MRC) și „materiale de referință” (MR). Prin definiție, MRC-urile trebuie să poată fi trasabile la o realizare exactă a unității în care sunt exprimate valorile de proprietate. Fiecare valoare de proprietate trebuie să fie însoțită de o incertitudine la un nivel declarat de încredere. MR-urile sunt materiale ale căror valori de proprietate sunt suficient de omogene și bine stabilite pentru a fi utilizate la etalonarea unui instrument de măsurare, evaluarea unei metode de măsurare sau atribuirea de valori materialelor.

4.3 Efectuarea analizelor

Introducere

Necesitate – boală, export, auto-control

Cerere – scrisă, orală, cerere specială

Contract – termen, reguli de eșantionare, preț
Efectuarea analizei – controlul în timpul analizei, datele brute, controlul după analiză, managementul datelor brute, întocmirea raportului
Transmiterea – pe hârtie, electronic, riscul fraudării
Punerea în aplicare

4.3.1 Trasabilitatea

Trasabilitatea este gestionarea documentelor scrise de mână sau/și în format electronic, întocmite în timpul analizei. Scopul trasabilității este de a permite controlul la diferite etape de analiză, de a verifica dacă toate etapele sunt realizate în mod corespunzător și de a permite validarea *a posteriori* a rezultatelor analizei. Trasabilitatea trebuie să permită urmărirea integrității analizei, inclusiv a erorilor care apar din cauza unor operații (eroari de calcul, situații legate de echipament etc.).

Există diferite mijloace care permit realizarea trasabilității:

Trasabilitatea suportului de hârtie: Colectarea documentelor prezentate la diferite etape (fișe de eșantionare, cum ar fi depozitarea/reducerea stocului înainte de analiză, pregătirea probelor, pregătirea reactivilor, consumabilelor, echipamentelor etc.). Aceste documente sunt plasate fizic într-un dosar în timpul analizei.

Aceste documente trebuie prezentate pentru a permite:

- O citire ușoară: documentele trebuie să fie lizibile. Ștersăturile, dacă sunt inevitabile, trebuie să fie lizibile și ele, de exemplu ștergere adaptabilă - ~~ștergerea~~ inacceptabilă.
- Mijloacele de scriere care creează texte ce pot fi șterse trebuie excluse.

Avantaje: utilizare ușoară în timp, deoarece nu este nevoie de un software special

Dezavantaje: stocare voluminoasă, supuse deteriorării, mai puțin ecologic

Trasabilitatea digitală: Trasabilitatea digitală poate lua diferite forme, cum ar fi fișiere cu texte, tabele Excel, fișiere video și audio. Astăzi, localizarea sistemelor de informații, cum ar fi laptop-urile, tablete, permit introducerea informațiilor chiar în timpul analizei.

Avantaje: diferite mijloace în funcție de tipul dorit de salvare.

Dezavantaje: citirea fișierelor este mai puțin ușoară datorită evoluției software-ului. Pierderea datelor din cauza „re-scrierii” (ștergem și re-scriem).

4.3.2 Incertitudinea rezultatelor

Fiecare măsurare a rezultatului este umbrită de o „eroare” care reprezintă suma incertitudinilor sistematice și aleatorii. Aceste incertitudini trebuie cunoscute și calculate de laborator.

Exemple de incertitudini care apar în timpul analizei:

- Omogenitatea probelor
- Reactivii
- Echipamentul
- Personalul
- etc.

Avantaje: „Limitele” analizei sunt cunoscute.

Dezavantaje: timpul și costul calculării incertitudinilor, confuzie pentru anumiți clienți dacă incertitudinile sunt prezentate în raportul de analiză.

NB: Calcularea incertitudinilor este o muncă lungă realizată de o echipă de laborator. Nu este posibil să enumerăm aici toate acțiunile necesare pentru acest proces, dar este necesar un minim de cunoștințe pentru lansarea calculului:

- *Matematică și mai ales statistică*
- *Cunoașterea Excel*
- *Cercetarea și implementarea planului de calcul preluat din literatura de specialitate și/sau normele naționale și internaționale care se referă, în mod special, la domeniul de lucru (de exemplu: chimie, metrologie etc.)*
- *În anumite cazuri, utilizarea instrumentelor informatice speciale.*

4.3.3 Control în timpul analizei

Analizele pe care le efectuăm au un impact important asupra clientului care le-a comandat. Un rezultat al analizei poate confirma sau infirma o boală gravă (cancer, diabet etc.) tratarea căreia poate fi dificilă pentru o persoană, un alt rezultat poate avea un impact asupra stării de producție, poate suspecta o contaminare importantă (metale grele, radionucleide etc.). Din aceste motive, este necesar a aplica un control cât mai sever în timpul efectuării analizei: controale interne și controale externe, dacă acestea există.

Controalele interne vor lua diferite aspecte, cum ar fi eșantioane contaminate voluntar și adăugate la începutul analizei sau la diferite etape de analiză, intervale de eșantionare pentru analize chimice. Analizele sunt efectuate două în paralel pentru a atenua problemele omogenității eșantionului care nu pot fi controlate de către tehnician în cazurile de matrice complexe (mușchi, ficat, rinichi etc.).

Avantaje: Rezultatele seriilor de analize sunt „garantate” de controlul intern. Costurile suplimentare sunt atenuate de serii mari de probe.

Dezavantaje: Creșterea costurilor în cazul seriilor mici de probe. Timpul necesar pentru analize este crescut.

Controalele externe sunt aplicate eșantioanelor în care contaminanții sunt dați cu incertitudinea aferentă. Aceste materiale de referință certificate sunt vândute cu rezultate cunoscute ale contaminării, rezultatul în sine este dat cu incertitudine.

Avantaje: Rezultatele sunt garantate și validate prin utilizarea materialelor de referință certificate.

Dezavantaje: Uneori costul materialelor de referință este mare.

4.3.4 Datele brute (primare)

Toate datele prezentate în timpul analizei înainte de prelucrarea acestora reprezintă date primare. Aceste date pot fi scrise de mână, pot fi în formă de fișe, pot fi scrise în caietul de lucru completat în timpul analizei, pot fi prezentate sub formă de grafice sau documente numerice. Aceste date vor fi prelucrate (calculate, interpretate etc.) pentru a permite întocmirea rezultatului analizei.

Exemple de date primare:

- Cantitatea de probe prelevate pentru analiză
- Realizarea de soluții standard (în cazul analizelor chimice)
- Grafice realizate de echipamente sau operatori
- etc.

Aceste date ar trebui să rămână lizibile; calcularea și prelucrarea acestor date trebuie să fie explicate și trasabile.

Avantaje: datele primare ar trebui să permită verificarea analizei sau chiar refăcerea teoretică a acestora prin intermediul lor.

Dezavantaje: Depozitarea este voluminoasă, fragilă. Managementul arhivelor.

4.3.5 Controlul după analiză

Înainte de întocmirea raportului de analiză, este necesar a efectua un control de către o persoană competentă care să aibă o viziune critică asupra rezultatului. Acest control trebuie să asigure că analiza a fost efectuată în condiții corespunzătoare. Controlul trebuie să permită o altă vizualizare a analizei și a posibilelor erori comise și urmărite.

Aceste controale se referă în principal la următoarele:

- Calculele și riscurile de erori legate de unități
- Cazurile de neconformitate, cauzele neconformităților și eliminarea acestora
- Re-transcrierea valorilor date de echipamente
- Efectuarea planificării întreținerii și controlului metrologic

Avantaje: datele primare ar trebui să permită verificarea analizei sau chiar refacerea teoretică.

Dezavantaje: depozitare voluminoasă, fragilă.

4.3.6 Întocmirea raportului de analiză

Raportul de analiză se va întocmi după efectuarea tuturor analizelor. Cu toate acestea, trebuie luate toate măsurile de precauție pentru a evita erorile. Imaginați-vă impactul unui rezultat accidental sau întâmplător în cancerologie sau diabetologie etc.

Raportul de analiză trebuie să corespundă cerințelor legislației naționale în ceea ce privește forma, informațiile furnizate, precum și cerințelor organismelor naționale de acreditare.

Procedurile de verificare trebuie scrise și aplicate pentru a minimiza riscul erorilor de transcriere.

Avantaje: rezultate „sigure” pentru clienți.

Dezavantaje: este nevoie de mai mult timp pentru prezentarea rezultatelor.

4.4 Rezultatele obținute și coerența acestora. Calitatea rezultatelor de analiză

Aspectele generale privind asigurarea calității sunt prezentate în standardul ISO/IEC 17025. Scopul oricărui laborator acreditat este de a furniza date fiabile și valabile conform destinației. Specialiștii de laborator folosesc metode validate, teste de adecvare a sistemului și verificări de control a calității la etapa de desfășurare a procesului pentru a se asigura că datele obținute sunt fiabile, și există ghiduri și proceduri specifice disponibile pentru a asigura conformitatea. După ce metodele au fost validate și s-a demonstrat că sunt adecvate scopului pentru o singură matrice, aceste metode nu se vor aplica matricelor similare sau altor matrice înainte de a stabili dacă sunt potrivite pentru astfel de matrice suplimentare. Rezultatele tuturor porțiunilor de test trebuie să fie consecvente. Atunci când cel puțin o porțiune de test dă un rezultat pozitiv și cel puțin una dă un rezultat negativ, analiza se repetă.

Calitate – îndeplinirea unor anumite cerințe specifice (care includ standardele stabilite de sistemul de control al calității, suplimentar la cerințele interne acceptate). Calitatea analitică - corespunderea rezultatelor obținute cu ipotezele acceptate. Calitatea informațiilor poate fi divizată în componente: calitatea rezultatelor, calitatea procesului, calitatea instrumentelor și calitatea muncii și a organizării.

Controlul calității - un sistem complex de acțiuni pentru a obține măsurarea (rezultatele determinării) cu un nivel de calitate necesar.

Un program de control al calității include:

- Asigurarea unui nivel adecvat al calificărilor personalului
- Asigurarea etalonării corespunzătoare a instrumentelor și echipamentelor de laborator
- Bune practici de laborator (GLP)
- Proceduri standard.

Laboratorul își monitorizează activitatea prin comparație cu rezultatele altor laboratoare, dacă sunt disponibile și adecvate. Această monitorizare va fi planificată și revizuită și va include următoarele: participarea la testarea competenței, participarea la comparații inter-laboratoare, altele decât testarea competenței.

4.5 Discuții cu clientul

Tipuri de clienți

Se pot identifica trei categorii de relații cu clienții. Aceste categorii sunt rezultatele modului în care furnizorul ia în considerare și își tratează clienții.

Clientul rege: Clientul este, în mod greșit, considerat o persoană a cărei cereri trebuie satisfăcute. Motivele motivației furnizorului pot fi diferite (dogme interne, financiare, etc.). laboratorul care acționează în acest mod, comite o greșeală dublă: în primul rând, nu-i permite clientului să-și cizeleze cererea și, prin urmare, nu poate ști dacă în realitate cererea este justificată sau nu, prea epuizantă sau insuficientă. A doua greșeală: furnizorul devine un „sclav” al clientului său, el face tot posibilul pentru a-l satisface, astfel că în continuare acest client va cere un preț mai mic și în cele din urmă îl va părăsi pe furnizor pentru a găsi pe cineva „mai puțin scump”.

Clientul partener: Cu acest client, furnizorul a creat relații de încredere, permițându-i să-și specifice cererea, nevoile exacte pe termen scurt și mediu, pentru a fi sigur că cererea corespunde procedurii necesare și suficiente pentru client. Prețul conform serviciilor solicitate și furnizate este agreeat de ambele părți (furnizor și client). Datorită negocierilor ambele părți sunt mulțumite de rezultat.

Clientul prizonier: Cine nu s-a simțit în astfel de postură interacționând cu unii furnizori de internet sau telefonie? La începutul contractului, prețul este redus și crește atunci când clientul devine atașat. Dacă acesta cere explicații, nu primește, în mod clar, un răspuns, cererile formulate rămân fără răspuns. Dacă clientul solicită unele servicii suplimentare, acesta trebuie să plătească un preț mai mare. Serviciile propuse de furnizor sunt furnizate fără acordul preliminar al clientului și sunt facturate la prețuri mai mari. În cele din urmă, clientul va pleca la un alt laborator chiar dacă prețurile sunt puțin mai mari.

Pentru o comunicare eficientă, cererea clientului trebuie să fie:

Precizată: De ce are nevoie? Care este termenul limită? Care este numărul? Este cererea sa compatibilă cu tehnicile aplicate de laborator? Rezultatele vor fi expuse în conformitate cu cerințele normative sau reglementate în vigoare? Precizările trebuie făcute în parteneriat cu laboratorul. Partea financiară va fi abordată cu aceleași precizări.

Scrisă: Laboratorul trebuie să asigure trasabilitatea cererilor. La acestea se poate face referință în caz de necesitate.

„Problemele” care pot da crezare rezultatelor remise în timpul analizei trebuie clarificate clientului, cu efectele acestora asupra rezultatelor. Acestea trebuie comunicate fără întârziere.

Rezultatul și verificarea acestuia: rezultatele trebuie să fie clare, precise, fără posibilitatea de a duce la erori de înțelegere. Pe de altă parte, rezultatul trebuie analizat de un expert din afara laboratorului, sau cel puțin din afara unității analitice, pentru a evita „prejudecățile”.

4.6 Etica de laborator

4.6.1. Prevederi generale

Respectarea principiilor etice în laborator are ca scop asigurarea faptului că personalul laboratorului ia în considerare și gestionează potențialele riscuri și conflicte etice atunci când planifică și desfășoară activități cu respect pentru persoane, beneficiu și corectitudine. Înainte de a

întreprinde orice fel de activitate în cadrul laboratorului, personalul laboratorului trebuie să consulte regulile specifice ale laboratorului/unității/instituției de cercetare și reglementările de stat-naționale/internaționale aplicabile.

De obicei, codurile de etică susțin, printre altele, „politica de nediscriminare”, care prevede nediscriminarea persoanelor implicate în orice fel de activitate de laborator pe criterii de rasă, culoare, sex, etnie, origine națională, religie, stare civilă, sarcină, dezabilități, identitate de gen, orientare sexuală, informații genetice etc.

Regulile și principiile de etică care trebuie respectate depind de specificitatea activității/cercetării efectuate în laborator, deși, în general, o bună practică de laborator înseamnă că laboratorul raportează doar rezultatele eșantionului care îndeplinesc toate criteriile de conformitate și califică, în mod corespunzător, toate rezultatele care nu îndeplinesc nici unul dintre aceste criterii. În acest sens, laboratoarele sunt încurajate să elaboreze politicile sale de etică și să le adauge la manualul de asigurare a calității al laboratorului. Specialiștii de laborator trebuie să urmeze cursuri de instruire în domeniul de etică. De asemenea, trebuie dezvoltat și implementat, pe scară largă, programul de detectare și descurajare a fraudei (de exemplu, tehnici de validare și verificare a datelor; notarea specialistului).

Frauda în laborator, de obicei asociată cu un prejudiciu perceput, este definită ca „falsificarea intenționată în timpul raportării a rezultatelor de analiză și de asigurare a calității care nu respectă cerințele metodologice și contractuale, pentru a le face să pară că au respectat astfel de cerințe” (2006). Principalele momente vulnerabile, conform EPA OIG (2006), includ: cenzurarea informațiilor pe baza limitelor de raportare; manipularea de date; nerespectarea SOP-urilor/metodelor de referință; falsificarea datelor existente; etalonarea necorespunzătoare; integrări manuale inadecvate; suprascrierea fișierelor: aplatizarea vârfurilor, extragere, ștergere; pregătire inadecvată; proces necorespunzător de colectare a probelor; păstrarea incompletă a evidenței; eșantion etichetat greșit; lipsa confirmării competenței; nesolicitarea colectorului; raportarea datelor pentru probe neanalizate (laborator uscat); timpii de păstrare nu sunt asigurați; integritatea eșantionului necunoscută; utilizarea selectivă a datelor QC; analiza secvențierii; prelevarea probelor după preparare; deformarea. Fraudele de măsurare includ ștergerea/adăugarea, manipularea sau fabricarea directă a datelor. Motivele pentru care conducerea admite astfel de comportament se împarte, de obicei, în trei categorii: de a evita să pară „rău” în fața conducerii superioare, de a evita penalități financiare sau pur și simplu de a mulțumi clientul. Pentru a evita acest lucru, ar trebui să se țină cont de faptul că consecințele fraudei ar putea fi mult mai devastatoare decât „beneficiul” „calculat” și că „reputația pătată” nu ar putea fi restabilită cu ușurință.

În ceea ce privește cele menționate mai sus, responsabilitățile angajaților de laborator ar trebui să includă: respectarea politicii de etică și a practicilor demonstrate în conduita zilnică; solicitarea unei evaluări adecvate atunci când modul de acționare este neclar sau nedeterminat; păstrarea vigilenței în ce privește situațiile care ar putea duce la acțiuni necorespunzătoare, ilegale sau la încălcarea directă a practicilor de etică; raportarea oricărui fel de încălcare a politicii și practicilor de etică.

Diverse sondaje de laborator și feedback-uuri ale personalului efectuate cu privire la etică au inspirat următoarele comentarii despre comportamentul etic în laborator (citată din „Defensibility and Ethics in the Laboratory” de Jo Ann Boyd, Quality Assurance, Chemistry and Chemical Engineering, Southwest Research Institute, 6220 Culebra, San Antonio, TX 78016, USA):

- Asigurați-vă că deciziile pe care le luați sunt decizii care vă vor permite să dormiți noaptea și să vă simțiți bine cu voi înșivă.
- Țineți cont de reputația organizației pe care o reprezentați și că afacerea lor depinde direct de dvs. și de satisfacția clientului.

Unul dintre cele mai importante aspecte în activitatea de laborator este **justificabilitatea** datelor, care este asigurată, în esență, de dovezi documentate de la primul până la ultimul pas al

procesului. Documentația trebuie să fie suficient de cuprinzătoare și suficient de detaliată pentru a permite specialiștilor de laborator și laboratoarelor externe să re-analizeze datele, dacă este necesar, și să ofere date reproductibile urmând procesele originale și aceiași pași documentați. Procesul de testare analitică și documentația necesită provocări continue de etică pentru a se asigura că chiar și testele care sunt efectuate incorect sunt documentate și că există dovezi ale unei acțiuni corective adecvate. Toate aceste eforturi sunt necesare pentru a oferi clientului date justificabile din punct de vedere juridic și pentru a-i oferi încrederea că laboratorul a efectuat o muncă de calitate.

4.6.2. Etica în timpul interacțiunii cu animalele

Numeroase specii de animale sunt utilizate în cadrul cercetărilor științifice, în timpul testării medicamentelor și în cadrul studiilor în domeniul științelor biomedicale și agriculturii, precum și în laboratoarele veterinare, pentru înțelegerea proceselor biologice de bază și îmbunătățirea calității vieții omului și a animalelor.

Având în vedere amploarea problemelor, au fost elaborate numeroase protocoale și linii directoare. Unul dintre exemple este publicația Consiliului Organizațiilor Internaționale de Științe Medicale (CIOMS) intitulată „The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” (*Principiile directoare internaționale pentru cercetarea biomedicală care implică animale*) (1985).

Ghidul de etică a contribuit la exactitatea rezultatelor și la mai multe evoluții în diferite aspecte ale științei animalelor de laborator, cum ar fi:

- Elaborarea diferitor modele animale pentru bolile umane;
- Dezvoltarea ingineriei genetice pentru producerea de animale transgenice pentru combaterea diferitor boli umane pe care nu au fost utilizate cu succes nici un model animal.
- Grijă și gestionarea mai bună a animalelor, reducerea suferințelor animalelor, perfecționarea tehnicilor utilizate în experimentele asupra animalelor.
- Căutarea de alternative pentru înlocuirea sau reducerea numărului de animale utilizate (simularea computerizată, aplicarea matematică și sistemele biologice *in vitro* s-au dovedit a fi într-o anumită măsură reușite, dar nu pot fi încă generalizate).

Conform liniilor directoare elaborate de Asociația Psihologilor din America (APA), cercetătorii care lucrează cu animale non-umane (achiziție, îngrijire, adăpostire, utilizare și dispunere) trebuie să-și desfășoare activitățile în conformitate cu legile și reglementările federale, de stat și locale în vigoare, politicile instituționale și convențiile internaționale (Secțiunea 8.09 din *Principiile etice ale psihologilor și Codul de conduită* (APA, 2010)).

Principiile etice și liniile directoare privind utilizarea animalelor subliniază valoarea vieții animalelor și stabilesc cele mai bune practici în utilizarea modelelor animale. Aspectele care trebuie luate în considerare sunt utilizarea unui număr minim de animale, obținând în același timp precizia cercetării; utilizarea corectă a animalelor sălbatice pentru a nu încălca legile sau politicile de conservare a faunei sălbatice; considerarea animalelor drept ființe vii, care includ ghidul privind transportarea animalelor, mediul în care se află animalele, îngrijirea animalelor, gestionarea, tehnici și înregistrări în experimentele asupra animalelor.

Referințe

1. American Psychological Association. (2010). Ethical principles of psychologists and code of conduct (2002, Amended June 1, 2010). Retrieved September 19, 2011
<http://www.apa.org/ethics/code/index.aspx>
2. American Veterinary Medical Association (2007) AVMA Guidelines on Euthanasia. Retrieved April 8, 2010 http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf
3. Animal Welfare Act 7 U.S.C. § 2131 et seq. Retrieved April 8, 2010
http://awic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=3&tax_level=3&tax_subject=182&topic_id

=1118&level3_id=6735

4. National Institutes of Health Office of Laboratory Animal Welfare (2002). Public Health Service policy on the humane care and use of laboratory animals. Bethesda, MD: NIH. Retrieved September 27, 2011 <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>
5. National Research Council (2006). *Guidelines for the humane transportation of research animals*. Washington, DC: The National Academies Press.
6. U. S. Department of Agriculture (1989) Animal welfare; Final Rules. *Federal Register*, 54(168), (Aug 31, 1989), 36112- 36163.
7. U. S. Department of Agriculture (1990) Guinea pigs, hamsters, and rabbits; Final Rule. *Federal Register*, 55(136), (July 16, 1990), 28879-28884.
8. U. S. Department of Agriculture (1991) Animal welfare; Standards; Part 3, Final Rule. *Federal Register*, 55(32), (Feb 15, 1991), 6426-6505.
9. Dess, N. K. & Foltin, R. W. (2004). The ethics cascade. In C. K. Akins, S. Panicker, & C. L. Cunningham (Eds.). *Laboratory animals in research and teaching: Ethics, care, and methods*. (pp 31-39). Washington, DC: APA.
10. National Research Council (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. (8th Edition). Washington, DC: The National Academies Press.

4.6.3. Etica în timpul interacțiunii cu subiecții umani

Cercetarea pe subiecți umani trebuie să fie diferențiată de practicarea medicinei, sănătatea publică și alte forme de îngrijire a sănătății, concepute pentru a contribui direct la sănătatea oamenilor sau a comunităților.

Cercetarea pe subiecți umani include:

- studii ale proceselor fiziologice, biochimice sau patologice sau studii a răspunsului la o intervenție specifică la subiecții sănătoși sau pacienți;
- studii controlate de măsuri diagnostice, preventive sau terapeutice la grupuri mai mari de persoane, menite să arate un anumit răspuns generalizat la aceste măsuri pe fundalul variației biologice individuale;
- studii concepute pentru a determina modelele de măsuri preventive sau terapeutice specifice pentru oameni și comunități;
- studii privind comportamentul/răspunsurile legate de sănătatea umană într-o varietate de circumstanțe și medii.

Pacienții, personalul medical, cercetătorii, companiile farmaceutice și alții se bazează pe rezultatele cercetărilor de laborator pentru activități și decizii care au impact asupra sănătății individuale și publice, și asupra bunăstării. Prin urmare, trebuie să se asigure că studiile propuse sunt temeinice din punct de vedere științific, se bazează pe cunoștințe prealabile corespunzătoare și pot genera informații valoroase. Cercetările pe subiecți umani pot utiliza fie observația, fie intervenția fizică, chimică sau psihologică; acestea pot genera, de asemenea, înregistrări/pot utiliza datele existente care conțin informații biomedicale sau de altă natură despre persoane care pot sau nu să fie identificabile din înregistrări sau informații. Utilizarea unor astfel de înregistrări și protecția confidențialității datelor obținute din aceste înregistrări sunt discutate în Linii directoare internaționale pentru evaluarea etică a studiilor epidemiologice (CIOMS, 1991) și în Linii directoare etice internaționale pentru cercetarea în domeniul sănătății care implică oameni (CIOMS, 2016).

Cercetarea pe subiecți umani trebuie să fie efectuată și supravegheată strict numai de către persoane calificate și cu experiență, în conformitate cu un protocol care precizează clar: scopul cercetării; motivele implicării subiecților umani; natura și gradul oricăror riscuri cunoscute pentru subiecți; sursele de recrutare a subiecților; și mijloacele propuse pentru a se asigura că consimțământul subiecților va fi informat și voluntar.

Noile vaccinuri și medicamente, înainte de a fi aprobate pentru uz general, trebuie testate pe subiecți umani în cadrul studiilor clinice; astfel de studii constituie o parte substanțială a tuturor cercetărilor care implică subiecți umani.

Cercetările care implică subiecți umani (inclusiv țesuturi umane sau date identificabile) pot fi justificate din punct de vedere etic numai dacă sunt efectuate în conformitate cu **trei principii etice de bază**, și anume **respectul față de persoane, beneficiu și justețe**.

- **Respectul față de persoane** încorporează cel puțin două considerații etice principale, și anume: a) respectul pentru autonomie, și b) protecția persoanelor cu autonomie afectată sau diminuată.
- **Beneficiul** se referă la obligația etică de a maximiza beneficiile și de a minimiza daunele.
- **Justețea** se referă la obligația etică de a trata fiecare persoană în conformitate cu ceea ce este moral și corect, de a oferi fiecărei persoane ceea ce i se datorează.

Liniile directoare au drept scop aplicarea acestor principii la cercetările/studiile de laborator pe subiecți umani. Conform liniilor directoare, personalul laboratorului și sponsorii cercetărilor trebuie să se asigure că studiile propuse pe subiecți umani respectă principiile etice general acceptate și se bazează pe cunoașterea adecvată a literaturii științifice pertinente. Aceste considerații ar trebui reflectate în protocolul de cercetare. Protocolul ar trebui să fie evaluat științific și etic de unul sau mai multe organisme de revizuire, constituite în mod corespunzător și independente față de echipa de cercetare, în țara organizației sponsorizante (International Ethical Guidelines for Health-related Research, CIOMS, 2016, *Guideline-urile 1 și 23*).

Pentru toate studiile care implică oameni, trebuie furnizate informații speciale în limbaj/altă formă de comunicare pe care individul o poate înțelege înainte de a solicita participarea la cercetare și ar trebui obținut consimțământul informat voluntar al potențialului subiect. În cazul unei persoane care nu este capabilă să dea consimțământul în cunoștință de cauză, studiul are nevoie de permisiunea unui reprezentant autorizat legal, în conformitate cu liniile directoare și legislația aplicabilă. Renunțarea la consimțământul informat trebuie considerată ca fapt neordinar și excepțional și trebuie, în toate cazurile, aprobată de un comitet de analiză etică. (CIOMS, 2016, *Guideline-urile 9,10*). Liniile directoare definesc obligațiile investigatorilor/cercetătorilor de laborator, evaluarea potențialelor beneficii și riscuri, inclusiv minimizarea riscurilor atunci când există o justificare etică și științifică pentru efectuarea cercetărilor cu persoane incapabile să dea consimțământul informat (CIOMS, 2016, *Guideline-urile 4,16*) și compensarea profitului pierdut, restituirea costurilor de călătorie și altor cheltuieli suportate pentru participarea la un studiu, inclusiv servicii medicale gratuite. Pentru toate cercetările care implică subiecți umani, investigatorul trebuie să se asigure că poverile și beneficiile sunt distribuite echitabil, echilibrate în mod rezonabil și riscurile sunt reduse la minimum (CIOMS, 2016, *Guideline-urile 3,4,13*).

Există aspecte speciale în ceea ce privește cercetarea pe *populații și comunități cu nivel limitat de resurse*, cercetări care implică *copii, femei (inclusiv gravide și care alăptează), persoane vulnerabile*, acestea fiind examinate în liniile directoare (CIOMS, 2016, *Guideline-urile 18,19*). Înainte de a începe un studiu pe o populație sau comunitate cu resurse limitate, cercetătorul trebuie să se asigure că toate procedurile răspund nevoilor de sănătate și priorităților populației sau comunității în care urmează să se desfășoare studiul (CIOMS, 2016, *Guideline-ul 2*). Implicarea copiilor necesită permisiunea părintelui sau a reprezentantului legal și acordul (consimțământul) și justificarea faptului că cercetarea ar putea să nu se desfășoare la fel de bine cu adulții. Justificare specială este necesară și în cazul implicării persoanelor vulnerabile și, dacă acestea sunt selectate, este necesară aplicarea, cu strictețe, a mijloacelor de protejare a drepturilor și bunăstării persoanelor date (CIOMS, 2016, *Guideline-urile 15,17*).

De regulă, subiecții implicați în cercetare din grupul de control al unui studiu al unei intervenții diagnostice, terapeutice sau preventive trebuie să primească o intervenție eficientă stabilă. În unele circumstanțe, poate fi acceptabil din punct de vedere etic să se utilizeze un

comparator alternativ, cum ar fi placebo sau „fără tratament” (*Guideline-ul 5: Alegerea controlului în studiile clinice*).

Placebo poate fi utilizat:

1. atunci când nu există o intervenție eficientă stabilită;
2. atunci când reținerea unei intervenții eficiente stabilite ar expune subiecții la disconfort temporar sau întârziere în ameliorarea simptomelor;
3. când utilizarea unei intervenții eficiente stabilite ca comparator nu ar produce rezultate fiabile din punct de vedere științific și utilizarea placebo nu ar adăuga nici un risc de vătămare gravă sau ireversibilă a subiecților.

Este necesar să fie asigurată securitatea și confidențialitatea datelor de cercetare ale subiecților. Subiecților trebuie să li se comunice limitele, legale/alte, pentru a proteja confidențialitatea, precum și posibilele consecințe în cazul încălcării confidențialității. Investigatorii trebuie să se asigure că subiecții cercetării care suferă vătămări ca urmare a participării lor în cadrul cercetării au dreptul la tratament medical gratuit și asistență financiară/de altă natură pentru a compensa orice deficiență, dezabilitate sau handicap (CIOMS, 2016, *Guideline-urile 12,14*).

Cercetările care implică materiale biologice umane (țesuturi, organe, sânge, ADN, ARN, proteine etc.) pot fi colectate/depozitate în scopuri specifice (cercetare, medicale sau diagnostice) și pot fi utilizate și în viitor. În liniile directoare, termenul „biobancă” este utilizat pentru colectarea materialelor biologice stocate și a datelor conexe. O persoană ale cărei materiale biologice și date conexe sunt utilizate în cercetare este un participant la studiu și se aplică aceleași principii etice. Având în vedere că caracterul exact al studiilor viitoare este de obicei necunoscut și este imposibil să se obțină consimțământul informat specific la momentul colectării materialului, consimțământul informat extins este o alternativă acceptabilă pentru consimțământul informat specific. Liniile directoare reglementează regulile de depozitare, utilizare și destinația finală a materialelor biologice și la care alte surse de informații personale se pot referi rezultatele analizelor (CIOMS, 2016, *Guideline-ul 11*).

Multe țări nu au capacitatea de a evalua/asigura calitatea științifică/acceptabilitatea etică a cercetărilor care implică oameni, propuse sau desfășurate pe teritoriul acestora. În cadrul cercetărilor colaborative sponsorizate externe, sponsorii și investigatorii (cercetătorii) au obligația etică de a se asigura că proiectele de cercetare pentru care sunt responsabili contribuie, în mod eficient, la capacitatea națională sau locală de a proiecta și desfășura cercetări biomedicale și de a oferi revizuire științifică și etică și monitorizarea acestor cercetări.

Referințe

International Ethical Guidelines for Health-related Research Involving Humans. Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) in collaboration with the World Health Organization (WHO). CIOMS, 2016

4.6.4. Siguranța și etica în laborator

Aplicarea și controlul reglementărilor și legilor de siguranță în laboratoarele științifice/de diagnostic țin de responsabilitatea întregului personal și reprezintă o parte integrantă a planificării, pregătirii și implementării oricăror activități de laborator. Aceste controale constau, dar nu sunt limitate la, politici, orientări, cerințe de instruire, proceduri standard de funcționare, echipamente de protecție personală și audituri de laborator. Este obligatoriu ca toți angajații de laborator și studenții să participe la cursuri speciale pentru a cunoaște procedurile de siguranță și restricțiile definite în manualele detaliate de siguranță în laborator (GLSM) pentru manipularea în condiții de siguranță a materialelor periculoase și acționarea în cazul altor pericole comune de laborator. GLSM descrie nivelul minim de practici de siguranță pe care trebuie să le cunoască toți indivizii implicați în operațiile de laborator.

În 1990, OSHA a emis standardul Expunerea profesională la substanțe chimice periculoase în laboratoare (29 CFR 1910.1450). Standardul OSHA Pathogens Bloodborne (BBP) (29 CFR 1910.1030) a fost elaborat pentru a proteja lucrătorii de pericolele pentru sănătate ale expunerii la agenții patogeni transmisibili prin sânge. Deoarece lucrătorii de laborator pot fi expuși la o varietate de substanțe periculoase la locul de muncă, alte standarde OSHA oferă proceduri pentru prevenirea sau reducerea expunerii la unele dintre cele mai frecvente substanțe chimice/periculoase: Standardul pentru echipamentul de protecție personală (PPE) (29 CFR 1910.132), Standardul pentru protecția mâinilor (29 CFR 1910.138), Standardul privind ținerea evidenței (29 CFR 1904) etc. Centrele din SUA pentru Controlul și Prevenirea Bolilor (CDC) împreună cu Institutele Naționale de Sănătate (NIH) au publicat manualul pentru Biosecuritate în laboratoarele microbiologice și biomedicale (Ediția a V-a, 2009) (*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*) care a devenit codul de practică pentru biosecuritate și o referință autoritară pentru evaluarea riscurilor în laboratoarele microbiologice și biomedicale.

Principiile generale de siguranță în laborator definite de standarde și linii directoare sunt considerate universale și ar trebui interpretate în ansamblu, deoarece cuprind referințe încrucișate. Aceste documente pot fi utilizate de cercetătorii individuali sau de laboratoare pentru identificarea sau recunoașterea pericolelor și evaluarea riscurilor și pentru formularea unui plan de minimizare/gestionare a riscurilor înainte de începerea lucrului.

Principiile generale pentru practica de laborator în siguranță sunt:

1. Cunoașterea materialelor (a. reduce la minim expunerile la substanțe chimice; b. abordarea tuturor substanțelor chimice ca fiind periculoase și aplicarea precauțiilor; c. evitarea subestimării riscului; d. respectarea concentrației maxime de lucru).
2. Urmarea practicilor sigure și utilizarea procedurilor standard de operare (SOP).
3. Cunoașterea procedurilor de urgență și localizarea echipamentelor de siguranță.

Strategiile de evaluare a siguranței și securității în laborator sunt prevăzute în manualele de siguranță și implică gestionarea și controlul diferitor sisteme de laborator folosind liste de verificare a siguranței în laborator:

- Echipament de protecție personală (PPE), echipament de laborator (hote de laborator, instrumente, sistem de ventilație, protecția apei, temperatură etc.) și siguranță tehnică;
- Siguranța administrativă (SOP-uri, controale procedurale, acces în laboratoare, proiectarea și construcția laboratoarelor, ratele de ventilație, inspecția zonei și securitatea în laborator);
- Siguranța biologică (niveluri de siguranță biologică, culturi de țesuturi și linii celulare, fișe tehnice de siguranță pentru substanțe infecțioase, decontaminare, siguranța încăperilor (gel, întuneric, radioizotop și rece), transportarea materialelor biologice);
- Siguranța chimică (proceduri chimice generale și monitorizarea expunerii, scurgeri chimice și substanțe chimice foarte toxice, linii directoare privind depozitarea substanțelor chimice);
- Siguranța criogenică, electrică, mecanică, radiație, laser și nanomaterială;
- Siguranța camerei de decontaminare, gestionarea deșeurilor și procedurile de urgență.

Standardele și liniile directoare oferă principii etice verificate la nivel internațional și comentarii detaliate cu privire la modul în care principiile etice universale ar trebui aplicate, concentrându-se în primul rând pe reguli și principii pentru o protecție sigură. Multe din organizații profesionale de laborator au adoptat un cod de etică bazat pe principii comune, definite de Federația Internațională a Științei Biomedicale de Laborator (IFBLS) și aplicate Oamenilor de Știință în domeniul Biomedical de Laborator (BLS) în întreaga lume. BLS au responsabilitatea de a contribui, din domeniul lor de competență profesională, la bunăstarea generală a comunității:

1. Să păstreze confidențialitatea strictă a informațiilor despre pacienți și rezultatele testelor;
2. Să protejeze demnitatea și intimitatea pacienților;
3. Să fie responsabili de calitatea și integritatea serviciilor clinice de laborator;
4. Să-și asume responsabilitatea personală;

5. Să demonstreze respect, grijă și atenție față de pacienți și colegi;
6. Să-și îndeplinească sarcinile într-un mod corect, exact, la timp și responsabil;
7. Să asigure protecția informațiilor despre pacienți ca fiind confidențiale, în limitele legii;
8. Să folosească cu prudență resursele de laborator;
9. Să susțină furnizarea de servicii de laborator de calitate într-un mod rentabil;
10. Să ofere servicii și îngrijiri de calitate, indiferent de vârstă, sexul, rasa, religia, originea națională, dezabilitatea, starea civilă, orientarea sexuală, statutul politic, social, starea de sănătate sau financiară a pacienților.

Referințe

1. Code of ethics for Biomedical Laboratory Scientists, IAMLT,1992; revised by IFBLS, 2010
2. Julio R. Tuma. Ethics on the laboratory floor. 2014,
3. The Code of Ethics of the American Society for Clinical Laboratory Science
4. The Code of Ethics of American Society of Clinical Pathology (ASCP)
5. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3rd ed.
6. Ralph Stuart. A System for Dealing with Ethical Dilemmas in the Research Lab.2018

CAPITOLUL 5. REFERINȚE

5.1 Standardele de laborator

Inițial este necesar să examinăm unele aspecte și să stabilim câteva definiții: în cazul laboratoarelor este vorba despre rezultat, obținerea și fiabilitatea acestuia.

În documentație, aceste aspecte se numesc rezultate, procese și incertitudini.

- Rezultatul poate fi cantitativ și poate afișa o valoare. În acest caz, laboratorul trebuie să ia în considerare și, prin urmare, să determine incertitudinea legată de rezultat. Incertitudinea este determinată la nivel intern conform standardelor (ISO8655, GUM etc.)
- Rezultatul poate fi calitativ reflectând doar o stare a eșantionului (consumabil, neconsumabil etc.). În acest caz, statutul trebuie obținut prin compararea cifrelor (ex: numărul de colonii de bacterii pe gram etc.). Această comparație rămâne în competența expertului analitic.
- Procesul numit și proces sau protocol descrie etapele pentru obținerea rezultatului. Acest proces trebuie să fie selectiv, repetabil, reproductibil, corect, etc. Acesta este un criteriu diferit care va fi definit și validat de laborator. Această validare va fi internă și externă.

Laboratoarele pot fi „clasificate” în funcție de tipul rezultatelor necesare și astfel putem determina ce tipuri de documentație se referă la acestea:

- *Laboratoare de cercetare de bază*: în acest tip de laborator sunt elaborate protocoalele. Cercetătorii le elaborează în toate modurile. Cel mai utilizat standard în acest tip de laborator este standardul ISO 9001, care stabilește recunoașterea organizațională. Procesele analitice sunt foarte puțin „validate”, deoarece sunt complet noi (prin urmare, nu sunt utilizate de alte laboratoare). Unele organisme publice aleg să-și creeze propriul depozit. „Regulile artei” profesiei de specialist de laborator sunt, de asemenea, o bază bună;
- *Laboratoare de cercetare aplicată*: în acest caz, aspectul vizat ține de dezvoltarea metodelor de detectare/cuantificare sau a studiilor preclinice. Standardele utilizate sunt bunele practici (GLP, GCP etc.), standardele ISO 9001, precum și anumite repere dezvoltate de companii sau instituții. Însă aceste documente rămân documente de organizare, protecție, diseminare a lucrărilor etc. Validarea internă se efectuează conform standardelor în vigoare (ISO 8655);
- *Laboratoare de analize*: în acest caz, rezultatul emis este de mare importanță, deoarece are un impact direct asupra produsului analizat (produse agroalimentare, produse fabricate etc.) sau asupra pacientului (medicină umană, medicină veterinară). O eroare este sau poate fi

catastrofală în ceea ce privește impactul asupra sănătății (boală nedescoperită, tratament inutil sau inadecvat etc.) sau stării financiare (distrugerea produsului, pierderea reputației, a clientului etc.). Prin urmare, aceste laboratoare au un sistem complet de management al calității, precum și o recunoaștere națională și internațională a tehnicilor sale obținute prin acreditare. ISO 17025 este cel mai utilizat standard în acest caz.

Protocoloalele sunt validate folosind standarde precum ISO 8655 și menținerea competenței tehnice a laboratorului este asigurată în timpul participării la testele inter-laboratoare.

5.2 Recunoașterea națională și internațională (acreditări, GLP, GMP etc.)

Buna practică de laborator (GLP) este un set de măsuri, cerințe și metode menite să asigure cea mai înaltă calitate a cercetării de laborator. Principiile bunei practici de laborator (GLP) sunt elaborate pentru a îmbunătăți calitatea și fiabilitatea rezultatelor testelor. Respectarea principiilor generale ale BPL în desfășurarea cercetărilor va facilita procesul de schimb de informații, va promova protecția sănătății umane, a animalelor și a mediului.

Buna practică de fabricație (GMP) face parte dintr-un sistem de asigurare a calității care asigură controlul și conformitatea laboratorului cu standardele aplicabile. Regulile GMP sunt concepute pentru a reduce riscul activităților de laborator.

Sistemul de management al calității este un ansamblu de procese de bază în organizarea activităților (manageriale, executive, de raportare, control), care vizează obținerea coerenței acțiunii pentru atingerea obiectivelor.

Sistemul de management al calității în laborator necesită, obligatoriu, cooperare și eforturi comune pentru o muncă adecvată, confirmarea și îndeplinirea cerințelor actuale ale reglementărilor. Implementarea unui sistem de management al calității permite laboratorului să funcționeze eficient și să utilizeze pe deplin posibilitățile ISO 17025, ținând cont de cerințele standardelor internaționale ISO.

Principiile de bază ale sistemului de management al calității (conform ISO 9001: 2000 Sisteme de management al calității - Cerințe):

1. **Orientarea către client.** Laboratorul depinde de clienții săi și, prin urmare, trebuie să înțeleagă nevoile actuale și viitoare, să îndeplinească cerințele acestora și să depună eforturi pentru a le depăși așteptările.

2. **Leadership.** Este managerul care stabilește unitatea scopului și direcțiile de dezvoltare; creează și menține condiții pentru acțiuni de lucru pentru a asigura îndeplinirea sarcinilor; îi pasă constant de instruirea personalului, asigură resursele necesare. Feedbackul periodic cu privire la eficacitatea și eficiența sistemului de management al calității este un lucru important în implementarea principiului de leadership; dezvoltarea acțiunilor corective și preventive.

3. **Implicarea personalului.** Personalul competent, stăpîn pe situație și implicat este esențial pentru îmbunătățirea capacității laboratorului de a oferi rezultate eficiente. Sistemul de calitate și mecanismele acestuia trebuie să încurajeze angajații să îmbunătățească calitatea activității laboratorului, să-și asume responsabilitatea pentru rezolvarea problemelor legate de calitate, să-și aprofundeze activ cunoștințele și să le transmită colegilor.

4. **Abordarea pe bază de proces și a managementului ca sistem.** Rezultatele concertate și previzibile sunt obținute mai eficient dacă oamenii înțeleg activitatea și o gestionează ca procese intercorelate (sistem integral). Sistemul de calitate constă din procese intercorelate. Compania trebuie să aibă procese de schimb intern de informații și un sistem de răspuns la solicitările și dorințele consumatorilor. Abordarea sistemului implică îmbunătățirea continuă a sistemului prin analiză și evaluare, adoptarea de acțiuni corective și preventive.

5. **Îmbunătățirea continuă.** Este necesar să îmbunătățim eficiența activității, dar nu să ne așteptăm la apariția unei probleme.

6. **Luarea deciziilor pe baza faptelor.** Soluțiile eficiente se bazează pe analiza datelor și informațiilor fiabile și exacte. Acest principiu se aplică nu numai pentru gestionarea funcționării și funcționării tehnice a operațiunii, ci și pentru gestionarea testării în sine prin metodele care alcătuiesc zona de acreditare a laboratorului.

7. **Managementul relațiilor.** Laboratorul își gestionează relațiile cu părțile interesate relevante, cum ar fi furnizorii, pentru un succes continuu. Implementarea acestui principiu necesită identificarea furnizorilor majori, organizarea unor relații clare și deschise, schimbul de informații, cooperarea cu înțelegerea clară a nevoilor consumatorilor.

Elemente ale sistemului de control al calității în laborator

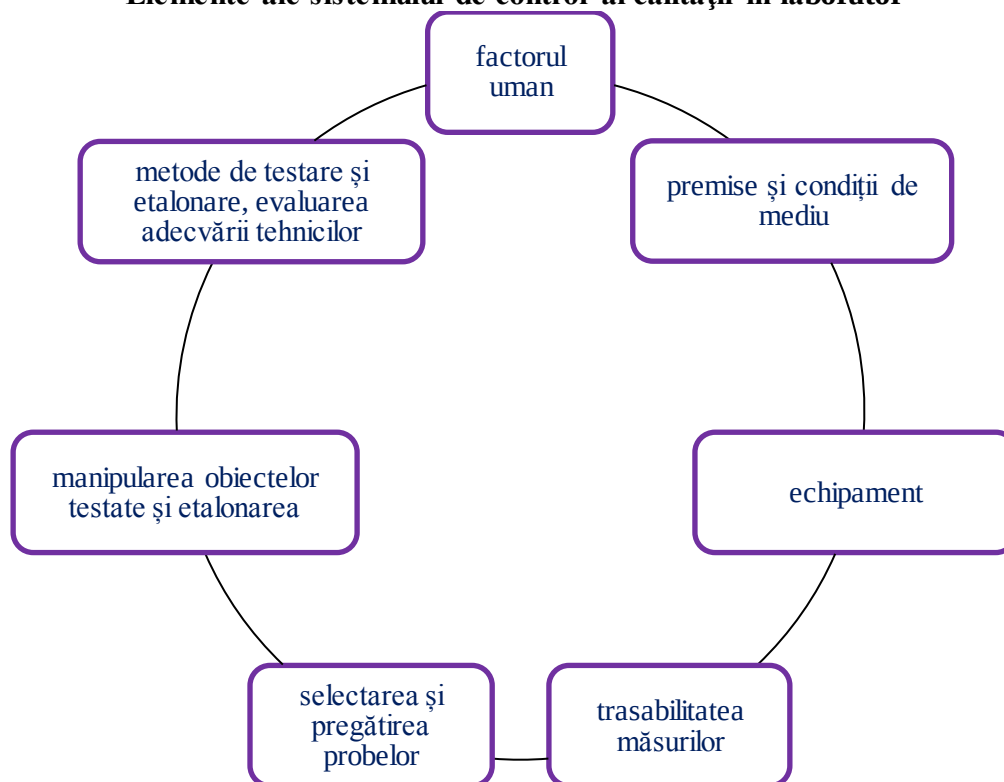


Fig. 1.1 - Factori care definesc obiectivitatea și fiabilitatea cercetărilor de laborator

Organizarea rațională a activității de laborator trebuie să cuprindă următoarele acțiuni:

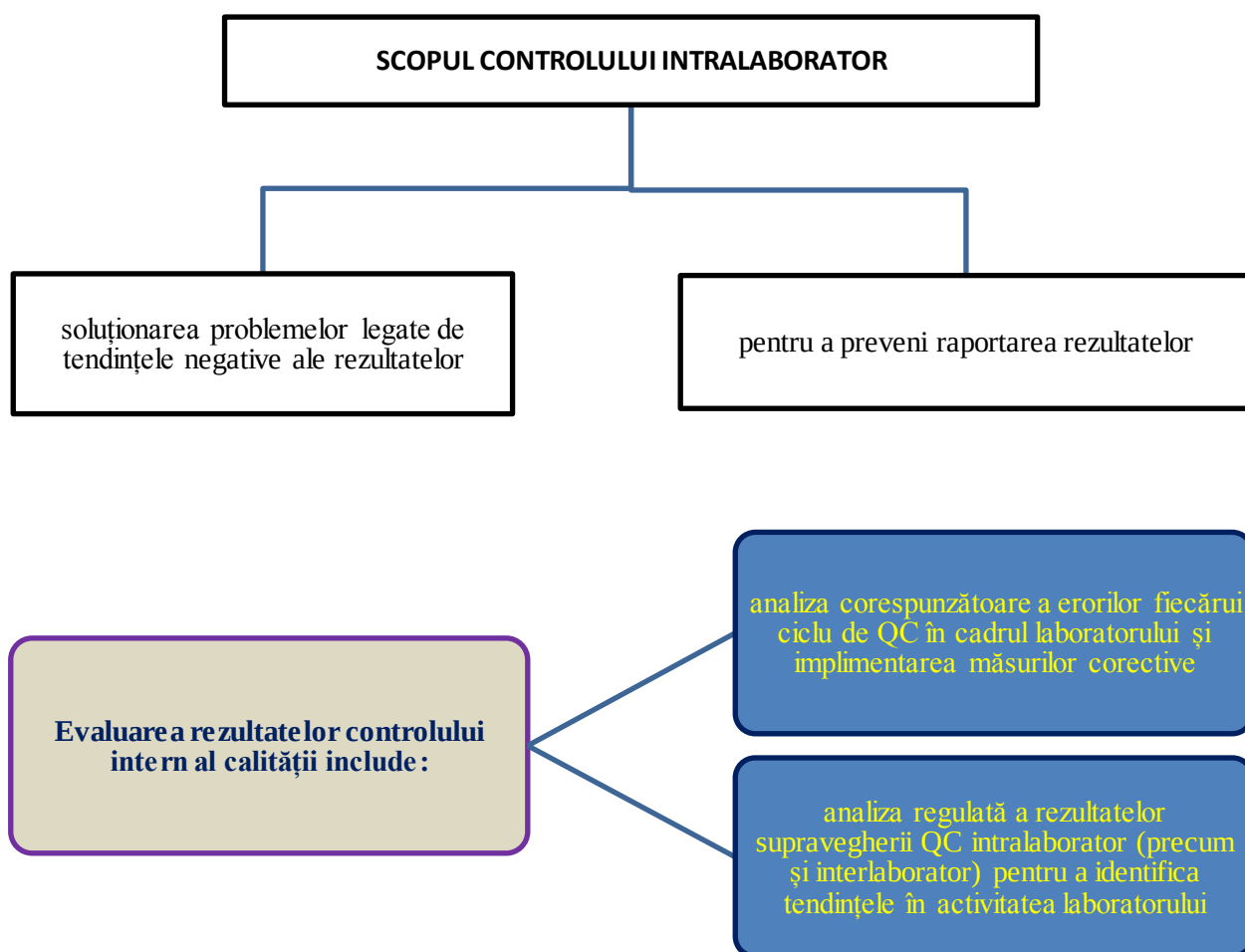
- planificarea clară a activităților;
- disponibilitatea echipamentului adecvat, a încăperilor, instrumentelor;
- suportul metrologic în strictă conformitate cu regulile și normele;
- organizarea convenabilă a locurilor de muncă (certificarea locurilor de muncă);
- disponibilitatea instrucțiunilor, metodelor de desfășurare a cercetărilor la locul de muncă;
- cunoașterea și respectarea regulilor de siguranță și securitatea muncii;
- organizarea rațională a procesului de cercetare de laborator;
- furnizarea de reactivi și materiale de control necesare;
- respectarea corespunzătoare de către fiecare membru al laboratorului a responsabilităților sale;
- competență teoretică și practică și instruirea continuă a personalului de laborator;
- respectarea regulilor de securitate biologică în conformitate cu cerințele reglementărilor.

Controlul extern și intern al calității

În laborator urmează să fie implementate două abordări de bază pentru controlul calității (QC - Controlul calității):

- QC intralaborator, care constă în monitorizarea zilnică a caracteristicilor rezultatelor cercetării și/sau efectuat în modul stabilit pentru eșantionare în timpul seriei de studii;
- QC extern, care se bazează pe participarea laboratorului la programe de testare profesională.

Controlul intralaborator este o activitate sistematică planificată, obligatorie pentru orice laborator. Este necesar a se planifica testarea intralaborator prin duplicarea periodică a testelor de către un alt operator, de exemplu.



Unul dintre principalele criterii pentru evaluarea competenței tehnice a laboratoarelor în timpul acreditării conform ISO/IEC 17025 este rezultatul participării acestora la testele de comparare interlaboratoare (ICT).

Testele comparative interlaboratoare constau în organizarea, efectuarea și evaluarea testelor pe probe de control identice sau similare de către două sau mai multe laboratoare în conformitate cu condițiile specificate (ISO/IEC 17043 *Evaluarea conformității - Cerințe generale*).

Documentul EAL-P7 „Testele de comparare interlaboratoare” stabilește principalele criterii pentru ICT și completează Ghidul ISO/IEC 43-1...2. În timpul ICT a laboratoarelor acreditate se utilizează ISO 33 „Utilizarea materialelor de referință certificate” și ISO 35 „Certificarea materialelor de referință. Principii generale și statistice”.

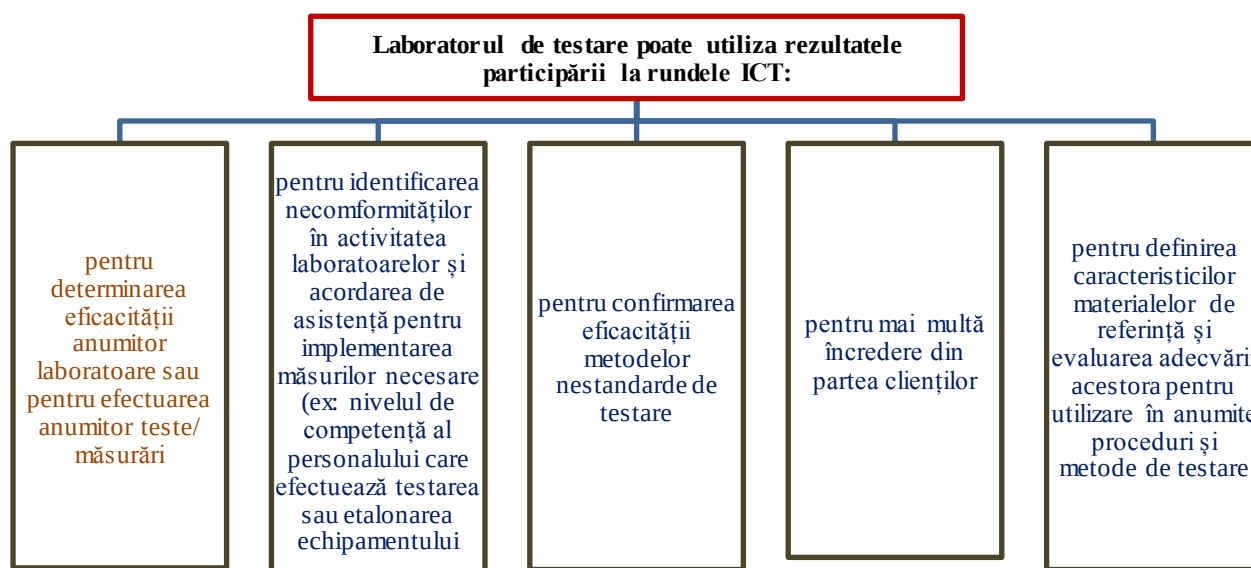
Sarcina principală soluționată prin intermediul ICT este verificarea experimentală a competenței tehnice a laboratoarelor pentru identificarea parametrilor conținutului și proprietăților substanțelor și materialelor din zona de acreditare declarată (aprobată), care se realizează atât la etapa acreditării, cât și la următorul control de inspecție. O analiză a experienței diferitor organizații arată că, dacă există un grup de mai multe laboratoare care efectuează testele aceluiași substanțe și materiale, ICT este cea mai rațională metodă de verificare a competenței tehnice. Participarea la ICT sporește încrederea în rezultatele laboratorului de testare în timpul acreditării și inspecției. De regulă, un experiment interlaborator planificat în mod corespunzător permite nu numai estimarea validității testelor fiecărui laborator, ci și rezolvarea unui set de alte sarcini legate de asigurarea metrologică a testelor.

În special, ICT se desfășoară pentru:

- a determina caracteristicile metrologice ale metodelor de testare, măsurare, control (TMC);
- a verifica unitatea și fiabilitatea măsurărilor pentru un anumit TMC la un grup de laboratoare;
- a evalua nivelul de achiziție a mai multor laboratoare ale unui anumit TMC;
- a verifica controlul statistic al TMC la un grup de laboratoare;
- a perfecționa termenii stabiliți ai caracteristicilor părtinirii metodelor;
- a atesta conținutul și proprietățile probelor standard, precum și a probelor de control.

Participarea laboratorului de testare la rundele ICT este una dintre metodele principale pentru determinarea eficacității metodei de testare împreună cu calibrarea (etalonarea) utilizând probele standard, compararea rezultatelor obținute cu alte metode, evaluarea sistematică a factorilor care influențează rezultatul, evaluarea incertitudinii rezultatelor pe baza înțelegerii științifice a principiilor teoretice și a experienței practice.

În funcție de coordonatorii ICT, acestea se împart în teste de comparare naționale și internaționale. Coordonatorii rundelor internaționale sunt organizații sau centre recunoscute la nivel internațional și autorizate să efectueze activitatea corespunzătoare. Rundele efectuate de coordonatorii naționali din Ucraina sunt, de asemenea, definite ca teste profesionale.



<https://www.iso.org/standards.html>

<http://www.eptis.org/>

<http://www.demarcheiso17025.com/>

<http://www.european-accreditation.org>

5.3 Documentele și gestionarea acestora

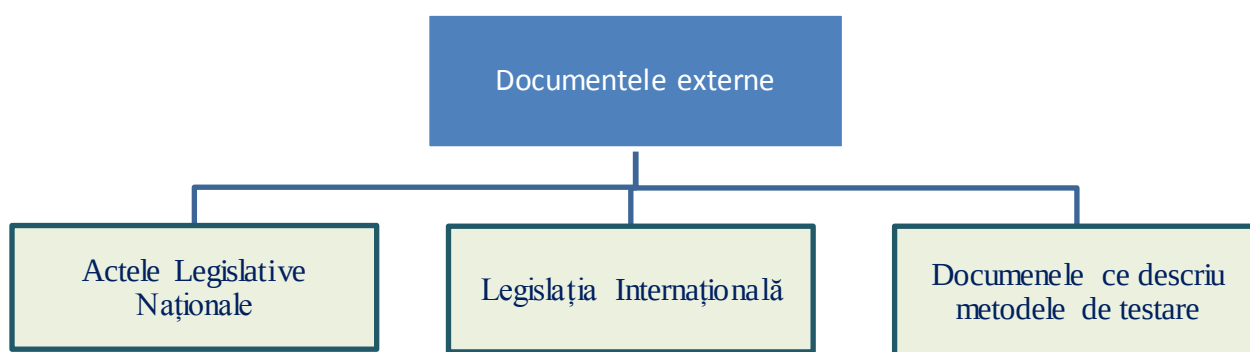
Fiecare laborator elaborează proceduri standard de operare (SOP) pentru gestionarea documentelor în scopul asigurării conformității cu cerințele standardului de gestionare a documentelor ISO/IEC 17025, în timpul elaborării, identificării, aprobării, publicării, modificării și desaminării acestora în departamentele (secțiile) laboratorului, precum și în timpul depozitării și arhivării.

Principala sarcină a documentării sistemului de control (management) al calității este descrierea suficientă a tuturor proceselor necesare de control și analiză a laboratorului și raportarea informațiilor către personal, simplificarea înregistrării datelor și monitorizarea activității de control și analiză a laboratorului. Documentele sistemului de management al calității ar trebui să răspundă nevoilor interne ale executivului și managerilor de laborator în activitățile lor zilnice, precum și să furnizeze dovezi în timpul verificărilor respectării și punerii în practică a cerințelor relevante ale reglementărilor externe.

Managementul documentelor este procesul de elaborare a documentației, identificarea, aprobarea, publicarea, modificarea și desaminarea acestora în departamente (laboratoare), precum și stocarea și arhivarea.

Documentul este prezentarea informațiilor solicitate pe hârtie sau pe orice alt suport (electronic, fotografic, analog și digital).

Documentele externe afectează documentele interne ale sistemului de management al calității.



Documentele interne ale laboratorului trebuie să includă:

- Instrucțiuni de calitate
- Procedurile standard de operare (SOP);
- Instrucțiuni operaționale;
- Fișa postului;
- Proceduri de testare;
- Documente privind datele de funcționare a sistemului de management al calității și datele tehnice (jurnale, fișe, formulare, protocoale, etc.).

Manualul calității este documentul de bază care descrie elementele sistemului de management al calității pentru a asigura calitatea rezultatelor cercetării obținute de laborator. Manualul calității trebuie să descrie politica privind calitatea, programul, sistemul, procedura și instrucțiunile necesare pentru descrierea proceselor de laborator și confirmarea conformității acestor procese cu cerințele actului de reglementare extern.

Procedurile standard de operare (SOP) sunt manuale scrise pentru gestionarea/desfășurarea activităților în toate domeniile de producție sau de control a calității produselor aprobate de manageri.

Obiectivul POS este de a oferi personalului instrucțiuni cu privire la ce să facă și când să facă.

SOP-urile trebuie să descrie toate procesele de bază enumerate în secțiunile din Manualul calității și să cuprindă o gamă mai restrânsă de activități: marcarea internă, carantină și depozitare a materialelor; instalarea, reglarea instrumentelor și echipamentelor; instalarea și validarea echipamentelor; materiale de cercetare, descrierea metodelor și echipamentelor utilizate în acest proces; prelevarea de probe; exploatarea, curățarea spațiilor, măsuri sanitare, siguranță tehnică; etalonarea instrumentelor de analiză; controlul indicatorilor de mediu; cerințe de calificare, instruire, igiena personalului; pregătirea și controlul eșantioanelor standard, etc. SOP-urile sunt instrucțiuni ”pas cu pas”, au un anumit scop, domeniul de aplicare, descriu responsabilități, proceduri de execuție și legăturile necesare. SOP-urile oferă o performanță durabilă, identică, corectă și reproductibilă a muncii.

Avantajele SOP-urilor:

1. Capacitatea de a asigura uniformitatea, conformitatea și controlul procesului și de a asigura că procedura se desfășoară exact în același mod de fiecare dată, indiferent de operator.
2. Se creează o bază generală și standard pentru instruirea personalului; adaptarea noilor angajați la locul de muncă devine mai rapidă și mai eficientă.
3. Impactul negativ al factorului „personal” este minimizat (experiența, cunoștințele, capacitățile și abilitățile unui anumit angajat nu sunt cele mai importante); probabilitatea acțiunilor și comportamentului fals este, de asemenea, minimizată.
4. Se menține neschimbat și stabil nivelul serviciilor furnizate.
5. Se crează condiții pentru implementarea sistemelor de management al calității în laborator.

Elaborarea SOP-urilor este atribuită celui mai competent angajat din cadrul laboratorului, care este direct implicat în desfășurarea procedurilor descrise, utilizând reglementări, suport metodologic, monografii, publicații științifice.

Lista recomandată a SOP-urilor în laboratorul de testare:

- Proceduri pentru gestionarea documentelor în laborator;
- Procedura de elaborare a SOP-urilor;
- Documentarea (înregistrarea) activităților de laborator;
- Operațiuni de siguranță la locul de muncă;
- Eliminarea deșeurilor biologice;
- Monitorizarea mediului;
- Curățarea spațiilor laboratorului;
- Controlul echipamentelor de laborator;
- Întreținerea echipamentelor;
- Comandarea, primirea, identificarea, marcarea, prelucrarea și depozitarea reactivilor, echipamentelor și dispozitivelor;
- Efectuarea auditului intern al activității de laborator;
- Păstrarea confidențialității rezultatelor;
- Măsurile întreprinse în caz de neconformitate;
- Acțiunile personalului, inclusiv instruirea suplimentară, îmbrăcăminte și igiena;
- Operarea sistemului informațional din cadrul laboratorului (dacă există);
- Validarea/verificarea echipamentelor și a metodelor de cercetare;
- SOP pentru o anumită metodă de studiu.

Documentele actuale ale laboratorului pot fi modificate sau completate din următoarele motive:

- în baza rezultatelor auditului intern;
- în baza rezultatelor auditului;
- în baza rezultatelor analizei efectuate de conducere;
- reclamația clientului;
- la inițiativa angajatului de a dezvolta în continuare sistemul de management al calității.

Sistemul informațional de management al laboratoarelor (LIMS) este un software profesional pentru gestionarea activității și a documentelor laboratorului, care oferă informații fiabile despre rezultatele testelor și optimizarea gestionării (introducere, trasabilitate, documentare) acestor informații pentru adoptarea de decizii prompte de gestionare.

Sistemele informaționale de management a laboratoarelor trebuie să aibă capacități funcționale pentru a îndeplini cerințele Bunei practici de laborator (GLP), Bunei practici automatizate de laborator (GALP), Bunei practici de fabricație (GMP), ISO 17025, ISO 2859, standarde ISO 3951 și altor acte de reglementare.

Software-ul tipic include un set de caracteristici:

1. Date de laborator (metode, proceduri, personal, procese de lucru, SOP-uri).
2. Eșantioane (înregistrare, testare, procesare, autentificare, arhivare, standarde, referință).
3. Instrumente (întreținere, calibrare, deservire, sarcină de lucru, planificare).
4. Resurse (lucrul cu echipamentul și sarcina personalului, timp, costuri de analiză).
5. Calitate (specificații, limitări, audit, verificare etc.).
6. Comunicare (infrastructură, furnizori).
7. Securitate (sisteme de siguranță - utilizatori, parole, grupuri, autorizare, login-uri).
8. Validarea (integritatea și succesiunea datelor, conformitatea cu reglementările, validarea).

BENEFICIILE UTILIZĂRII LIMS

Automatizarea proceselor de laborator

Conectarea și controlul dispozitivelor, generarea automată de rapoarte

Îmbunătățirea calității documentelor

Eliminarea erorilor de transcriere, acces la informațiile perioadelor anterioare de activitate ale laboratorului (arhivarea datelor), securitate, conformitate

QMS

Documentație, bază de certificare, corespondență

Eficiență și productivitate îmbunătățite

Procesarea volumelor mari de date, luarea mai rapidă a deciziilor și oferirea rezultatelor, reducerea lucrului cu documentele pe hârtie

<https://www.iso.org/standards.html>
<http://www.eptis.org/>
<http://www.demarcheiso17025.com/>
<http://www.european-accreditation.org>

5.4 Metrologie la laborator

5.4.1 Structura serviciului de metrologie, obiectivele și principiile de bază ale prestării serviciilor

Organul executiv central (denumit în continuare OEC), care asigură formarea politicii de stat în domeniul metrologiei și activității metrologice, efectuează administrația de stat pentru asigurarea unității măsurătorilor.

Atribuțiile OEC sunt:

- asigurarea normelor legale și de reglementare în domeniul metrologiei și activității metrologice;
- organizarea cercetării de bază în domeniul metrologiei;
- asigurarea funcționării și îmbunătățirii bazei naționale de referință;
- dezvoltarea sau participarea la dezvoltarea programelor științifice și tehnice naționale legate de asigurarea uniformității măsurătorilor;
- reprezentarea și participarea în organizațiile internaționale, Europene și în alte organizații regionale de metrologie;
- exercitarea altor competențe, definite de legi și atribuite acestuia prin acte ale Cabinetului de Miniștri al Ucrainei.

b. OEC care implementează politica de stat în domeniul metrologiei și activității metrologice, ale cărui atribuții includ:

- coordonarea activităților pentru asigurarea funcționării sistemului metrologic al Ucrainei;
- organizarea funcționării și pregătirea propunerilor de îmbunătățire a bazei naționale de referință;
- autorizarea de a efectua verificarea echipamentelor de măsurare în utilizare reglementate legal;
- exercitarea altor competențe, definite de legi și atribuite acestuia prin acte ale Cabinetului de Miniștri al Ucrainei.

c. OEC care implementează politica de stat în domeniul supravegherii metrologice;

d. Centrele metrologice științifice sunt stabilite de Cabinetul de Miniștri al Ucrainei din rândul întreprinderilor de stat, instituțiilor și organizațiilor care implementează politica de stat în domeniul metrologiei și activității metrologice și creează, îmbunătățesc, păstrează și aplică standarde naționale.

Reglementările privind centrele de metrologie științifică sunt aprobate de OEC, fapt ce pune în aplicare politica de stat în domeniul metrologiei și activității metrologice. Centrele metrologice științifice definite de regulamente și legislația privind acestea:

1. efectuează cercetări științifice de bază în domeniul metrologiei, precum și desfășoară lucrări în direcția dezvoltării și implementării programelor de stat în metrologie și a conceptului de dezvoltare a sistemului metrologic al Ucrainei;
2. efectuează cercetări științifice aplicate și efectuează lucrări de cercetare legate de crearea, îmbunătățirea, depozitarea, verificarea, aplicarea standardelor naționale, crearea sistemelor de transfer de dimensiunea unităților de măsură;
3. participă la elaborarea reglementărilor tehnice, a altor acte juridice, precum și a documentelor normative în domeniul metrologiei și activității metrologice;
4. realizează coordonarea și sprijinul științific și metodologic al lucrărilor pentru asigurarea uniformității măsurătorilor în domeniile relevante de activitate;
5. efectuează controlul de conformitate a echipamentelor de măsurare;
6. efectuează calibrarea și verificarea echipamentelor de măsurare;
7. efectuează măsurători în domeniul metrologiei reglementate prin lege;
8. păstrează fondul de informații despre direcțiile lor de activitate;
9. mențin cooperări internaționale pe problemele ce corespund competențelor lor.

Centrele de metrologie științifică în cadrul contractelor cu persoane juridice și fizice pot efectua alte lucrări (furniza alte servicii) legate de asigurarea uniformității măsurătorilor.

e. întreprinderile de stat care aparțin sferei de conducere a organului executiv central de implementare a politicii de stat în domeniul metrologiei și activității metrologice și desfășoară activități metrologice în regiuni și Kiev (denumite în continuare centre metrologice);

f. Serviciul de timp unic și frecvență de referință realizează coordonarea și executarea transsectorială a lucrărilor menite să asigure unitatea măsurătorilor de timp și frecvență, să determine parametrii de rotație a Pământului, să furnizeze informații timp-frecvență consumatorilor din sfera economiei, științei și apărării, precum și entităților juridice și individuale, inclusiv furnizarea de informații pentru a asigura utilizarea unui singure perioade contabile.

Serviciile privind Standardele de referință a compoziției și proprietăților substanțelor și materialelor efectuează coordonare transsectorială și efectuează lucrări legate de elaborarea și implementarea standardelor de compoziția și proprietățile substanțelor și materialelor.

Datele standard de referință privind constanta fizică și proprietățile substanțelor și materialelor efectuează coordonarea transsectorială și oferă lucrări legate de dezvoltarea și implementarea datelor standard de referință privind constanta fizică și proprietățile substanțelor și materialelor.

Obiectivele și principiile de bază ale prestării serviciilor menționate mai sus sunt determinate de dispozițiile Cabinetului de Miniștri din Ucraina.

g. serviciile metrologice ale organelor executive centrale, ale altor organe de stat, întreprinderi și organizații pot crea servicii metrologice pentru efectuarea lucrărilor (furnizarea de servicii) pentru asigurarea uniformității măsurărilor în anumite zone de activitate. Structura, funcțiile, drepturile și responsabilitățile acestor servicii sunt guvernate de dispozițiile pentru aceste servicii, care sunt aprobate de șefii acestor entități, întreprinderi și organizații. Prevederea-cadru este aprobată de OEC, care asigură formarea politicii de stat în domeniul metrologiei și activității metrologice. Întreprinderile și organizațiile care lucrează în domeniul metrologiei de reglementare trebuie să creeze servicii metrologice sau să numească persoane responsabile pentru asigurarea uniformității măsurărilor.

h. Entitățile de evaluare a conformității instrumentelor de măsurare și a laboratoarelor de calibrare.

i. suportul metrologic al activității în sfera apărării Ucrainei se realizează cu respectarea particularităților stabilite de Cabinetul de Miniștri al Ucrainei.

5.4.2 Asigurarea competenței laboratoarelor metrologice ale întreprinderilor în condițiile actuale

În Legea Ucrainei „Cu privire la metrologie” nu există cerințe pentru certificarea laboratoarelor de măsurare și calibrare, așa cum erau prevăzute anterior de Legea Ucrainei „Cu privire la metrologie și activitate metrologică” din 11.02.1998 № 113/98-BP. Procedura de atestare a acestor laboratoare a fost reglementată de „Procedura de atestare a organizațiilor principale și de bază ale serviciilor metrologice ale organelor executive centrale” (în continuare - „Procedură”). Toate problemele legate de verificarea competenței laboratoarelor, forma și conținutul documentelor solicitate au fost identificate în această „Procedură”. Laboratoarele ucrainene de măsurare au folosit în mod activ o procedură de certificare care le-a ajutat să asigure calitatea măsurărilor și a confirmat competența laboratorului. În principal recunoscut ca un mijloc de confirmare a competenței laboratoarelor care desfășoară activitate metrologică (în continuare - laboratoare de metrologie) la nivel internațional și național în conformitatea cu cerințele DSTU ISO / IEC17025: 2017. Activitatea metrologică se referă la activitățile legate de asigurarea uniformității măsurărilor (articolul 1 din Legea privind metrologia). Prin urmare, conform cerințelor moderne, laboratoarele de metrologie includ laboratoare de referință, calibrare și măsurare. Pot avea denumiri specifice la întreprindere, dar principalul lucru pe care îl desfășoară este activitatea metrologică.

Conform Legii „Cu privire la metrologie”, laboratorul de referință este o întreprindere sau o organizație, sau o subdiviziune separată a acestora, care efectuează verificarea echipamentelor de măsurare; laboratorul de calibrare este o întreprindere / organizație sau unitate separată a acestora, care efectuează calibrarea echipamentelor de măsurare. Laboratorul de măsurare este o întreprindere / organizație, cu diviziunile sale separate și antreprenorii individuali care efectuează măsurători specifice ce nu au legătură cu măsurarea conformității produselor, proceselor și serviciilor.

Competența laboratoarelor de metrologie este capacitatea confirmată oficial a unui laborator de a efectua activități metrologice într-un domeniu specific în conformitate cu cerințele procedurilor de măsurare și în baza resurselor corespunzătoare. Indiferent de denumirea laboratorului, competența acestuia este întotdeauna determinată de criterii adecvate și este asigurată cu următoarele resurse în dependență de domeniul de activitate al laboratorului:

- personal competent;
- sediu și condiții de mediu;
- echipament tehnic;
- metode de lucru;
- sistem de management al calității.

Cerințele specifice pentru criteriile de competență sunt stabilite în documentele care specifică direct cerințele pentru competența laboratoarelor sau pentru munca prestată, și pentru care este evaluată competența. Cerințele de bază pentru competența laboratoarelor sunt reglementate de DSTU ISO / IEC17025: 2017. Confirmarea sau recunoașterea competenței poate fi exercitată de prima, a doua și terța parte. Prima parte este întreprinderea care asigură calitatea performanței laboratorului de testare sau

calibrarea echipamentelor de măsurare pe baza furnizării resurselor necesare și a efectuării unui audit intern al activităților sale (audit intern). A doua parte este clientul produselor, care poate stabili cerințe pentru efectuarea controlului metrologic al echipamentelor de măsurare, precum și cerințe pentru verificarea competenței laboratorului. Partea terță este o organizație independentă care verifică și confirmă competența unui laborator de a testa sau calibra echipamentele de măsurare.

Indiferent de partea care inspectează laboratorul, criteriile rămân cele menționate mai sus. Și acestea ar trebui să îndeplinească întotdeauna cerințele tehnicilor de testare / calibrare utilizate pentru controlul metrologic al echipamentelor de măsurare specifice. În primul rând, trebuie să existe personal calificat a cărui competență este confirmată prin instruire, capacitate de muncă și abilități. Personalul însărcinat cu testarea produsului și calibrarea echipamentului trebuie să aibă experiență, să cunoască și să respecte cerințele de testare/calibrare, să poată efectua și prelucra rezultatele testelor/calibrării. Este important de a efectua instruirii ale personalului la fiecare 5 ani, precum și un audit intern periodic al calității muncii efectuate. De asemenea, cerințele pentru sedii și condițiile de mediu din laboratoare trebuie să corespundă cerințelor tehnicilor de testare/calibrare. La fel, sediile trebuie să îndeplinească cerințele de securitate antiincendiară, sanitare și de protecție a muncii. În primul rând, condițiile de mediu includ cerințele privind temperatura ambiantă. Abaterea temperaturii peste limitele stabilite în timpul măsurării nu este permisă, deoarece poate duce la rezultate incorecte la determinarea adecvantei echipamentului, grație apariției unor componente suplimentare de incertitudine și poate afecta calitatea rezultatelor. Se aplică tuturor factorilor influenți identificați în metode.

Un aspect al măsurării/testării de asigurare a calității este participarea la runde de teste comparative interlaboratorii (denumite în continuare TCI). TCI sunt utilizate pe scară largă pentru o varietate de sarcini și sunt utilizate în întreaga lume. Sarcinile tipice ale TCI sunt:

- evaluarea caracteristicilor laboratoarelor pentru efectuarea testelor sau măsurătorilor specifice și monitorizarea constantă a acestora;
- identificarea problemelor din laboratoare, legate de utilizarea unor proceduri incorecte de măsurare/testare, eficacitate insuficientă a instruirii și gestionării personalului și eliminarea acestora;
- stabilirea eficienței și comparabilității metodelor de testare/măsurare;
- asigurarea încrederii maxime a clienților;
- identificarea diferențelor dintre laboratoare;
- instruirea laboratoarelor de metrologie care participă la runde de TCI pe baza rezultatelor controalelor de reconciliere;
- confirmarea incertitudinii declarate;
- evaluarea caracteristicilor metodei;
- atribuirea valorilor probelor standard și evaluarea adecvării acestora pentru utilizare în proceduri specifice de măsurare/testare;
- suport pentru echivalența stabilită a măsurătorilor efectuate de institutele naționale de metrologie prin controale cheie de reconciliere și controale suplimentare de reconciliere, efectuate în numele Biroului internațional al greutăților și măsurilor (BIPM) și de către organizațiile regionale de metrologie care cooperează cu acestea.

Testele de laborator se efectuează sub următoarea formă:

- teste care sunt operațiuni tehnice destinate să determine sau să controleze una sau mai multe dintre caracteristicile sau parametrii unui obiect de testare, care sunt efectuate în conformitate cu procedura stabilită de testare interlaboratorie;

Testele interlaboratorii se efectuează sub forma:

- comparării interlaboratorii a rezultatelor măsurătorilor;
- experimente reciproce interlaboratorii pentru stabilirea valorilor de referință;
- controale de reconciliere interlaboratorii
- teste comparative interlaboratorii.

Participarea la testarea interlaboratorie promovează îmbunătățirea nivelului tehnic al laboratorului și a competenței personalului său.

În practica internațională, în timpul măsurătorilor și testelor se acordă o atenție considerabilă asigurării uniformității acestora și a unor componente precum trasabilitatea măsurătorilor, calibrarea echipamentelor de măsurare, estimarea acurateții măsurătorilor, validarea și verificarea metodelor de măsurare.

Criteriile generale de competență pentru laboratoarele de calibrare sunt aceleași ca și pentru alte laboratoare.

Echipamentele tehnice utilizate pentru testare/măsurare sunt probe standard, materiale standard de referință și de control al calității, standarde de calibrare și echipamente auxiliare, și trebuie să fie în formatul de testare/calibrare. Calibrarea echipamentului este descrisă în articolul 6.4 din DSTU ISO\ IEC 17025: 2017 Cerințe generale pentru competența laboratoarelor de testare și calibrare. De asemenea, în Ucraina, în documente precum DSTU OIML D23: 2008 Metrologie. Principiile controlului metrologic al echipamentelor de calibrare (OIML D23: 1993, IDT) și DSTU OIML D8: 2008 Metrologie. Standarde. Selectarea, recunoașterea, aplicarea, stocarea și documentarea (OIML D8: 2004, IDT), privind standardele de lucru, sunt armonizate cu cele internaționale în vigoare. Standardele de lucru nu sunt legate de obiectele metrologiei reglementate de lege, astfel încât întreprinderea / laboratorul determină calibrarea standardelor și, întrucât se recomandă intervalul de intercalibrare pentru standardele de lucru, întreprinderea/laboratorul determină în mod independent acest interval, de exemplu în baza standardelor Organizației Internaționale de Metrologie Juridică, implementate în Ucraina ca standarde naționale DSTU OIML D23: 2008 Metrologie. Principiile controlului metrologic al echipamentelor de calibrare (OIML D23: 1993, IDT) și DSTU ILAC-G 24 / OIML D 10: 2013 Metrologie. Orientări pentru determinarea intervalelor de intercalibrare ale echipamentelor de măsurare (ILAC-G 24 / OIML D 10: 200, IDT). O întreprindere / laborator decide să verifice sau să calibreze standardele ținând cont de următoarele:

- în timpul verificării se stabilește conformitatea caracteristicilor metrologice ale standardului de lucru cu documentele sale operaționale. Puteți utiliza scheme de calibrare de stare pentru a stabili încetarea acțiunii unui standard de lucru pentru selectarea acestuia prin metoda de calibrare. Refuzul centrului de metrologie de a calibra standardul nu este justificat, deoarece întreprinderea / laboratorul trebuie să îndeplinească cerințele clientului, o dată ce acestea sunt stabilite. Eliberarea unui certificat de calibrare a standardului ca echipament de măsurare funcțional, de asemenea, nu este un obstacol în aplicarea standardului, dar în acest caz ar trebui să fie comandat un proces verbal de verificare pentru a stabili trasabilitatea standardului de lucru la standardul primar;

- calibrarea setează abaterea standardului de lucru al întreprinderii de la valorile realizate de standardul utilizat în timpul calibrării, ca abatere și incertitudine a măsurării acestor abateri. Întreprinderea trebuie să stabilească în mod direct (cu precizie) adecvanța standardului de calibrare pentru verificarea echipamentului de măsurare.

Dacă o întreprindere intenționează să calibreze echipamentele de măsurare, ar trebui să decidă dacă prima, a doua sau terța parte ar trebuie să efectueze acreditare sau evaluare competenței laboratorului de calibrare. În acest caz, este obligatorie introducerea acreditării în laboratorul de calibrare DSTU pentru acreditare și solicitarea acestei proceduri de la Agenția Națională de Acreditare din Ucraina.

În cazul în care nu este prevăzută acreditarea, este obligatoriu să existe o trasabilitate documentată a standardelor sale la standardele naționale. Aceasta înseamnă că standardele de lucru trebuie calibrate în laboratoare de calibrare acreditate cu un domeniu de activitate relevant.

Astfel, laboratoarele de metrologie ar trebui să depună toate eforturile pentru a-și asigura competența. Cerințele moderne pentru asigurarea calității activității metrologice implică faptul că există diferite abordări pentru stabilirea competenței laboratoarelor, ceea ce oferă întreprinderilor libertatea de a rezolva această problemă, la discreția lor și / sau la cererea clienților de produse.

5.4.3 Sistem de management al calității laboratorului, documente

Scopul implementării sistemului de management al calității (SGC) în organizație este de a confirma activitățile în conformitate cu cerințele documentației de reglementare (standarde, norme etc.), care oferă încredere clienților în obținerea unor servicii de testare adecvate de calitate.

În opinia noastră, cele mai eficiente cerințe pentru crearea și implementarea SMC în orice organizație sunt stabilite în standardele ISO 9000 „Sisteme de management al calității”, a căror aplicare permite obținerea următoarelor avantaje:

- o înțelegere mai bună și consistență a activităților de asigurării calității într-o organizație;
- garanții de utilizare continuă a sistemului de management al calității în general;
- îmbunătățirea sistemului de documentare;
- creșterea nivelului de înțelegere a aspectelor de calitate de către personal;
- creșterea productivității muncii, reducerea costurilor;
- crearea unei baze pentru îmbunătățirea continuă a activității.

Cu toate acestea, conformitatea laboratorului de metrologie (măsurare, calibrare, analitică) cu cerințele ISO 9001 „Sisteme de management al calității - Cerințe” nu îi garantează încă obținerea unor rezultate fiabile. Un laborator este un sistem complex care include multe elemente: personal, infrastructură, tehnici de măsurare, procese, echipamente, metode de lucru, documentare. Complexitatea sistemului necesită

ca toate elementele să funcționeze corect și într-un mod coordonat. Obiectivul principal al sistemului de calitate al laboratorului este de a garanta acuratețea, fiabilitatea și actualitatea prezentării rezultatelor testelor, a analizei. Astăzi există multe progrese în domeniul managementului calității în laborator. Principalul standard internațional este ISO/IEC 17025 „Cerințe generale pentru competența laboratoarelor de testare și calibrare”, care stabilește cerințe atât pentru sistemul de management, cât și pentru competența sa tehnică. Cerințele pentru sistemul de calitate din cele două standarde menționate mai sus sunt similare, dar formulările lor din ISO/IEC 17025 sunt mai specifice în ceea ce privește activitatea laboratorului și, prin urmare, diferă de ISO 9001.

Conformitatea laboratorului cu cerințele ISO / IEC 17025 înseamnă că laboratorul respectă atât cerințele competenței tehnice, cât și ale sistemului de management și garantează astfel clienților respectarea condițiilor de obținere a rezultatelor fiabile ale testelor.

Pe lângă documentele normative internaționale menționate mai sus ale sistemului de management al calității în laborator, cele mai cunoscute sunt:

- ISO / IEC 17043 "Evaluarea conformității - cerințe generale pentru testarea competenței";
- ISO 13528 "Metode statistice pentru verificarea calificării prin metoda comparării interlaboratoare"

- Ghid ISO 34 "Cerință generală pentru competența producătorilor de materiale de referință"
- ISO 10013 "Linii directoare privind documentația în sistemul de management al calității".

Aceste documente sunt acceptate ca standarde naționale ale Ucrainei:

- DSTU ISO 9001 "Sisteme de management al calității. Cerințe";
- DSTU ISO/IEC 17025, "Cerințele generale referitoare la competența laboratoarelor de testare și calibrare"

- DSTU ENISO / IEC 17043 "Evaluarea conformității. Cerințe generale pentru verificarea nivelului profesional";

- DSTU ISO 13528 "Metode statistice pentru verificarea nivelului profesional prin comparații interlaboratorii";

- DSTU N ISO / IEC Guide 34 "Cerințe generale pentru dezvoltatorii de modele standard";

- DSTU ISO / TR 10013 "Linii directoare pentru dezvoltarea unui sistem de management al calității".

Dacă un laborator dezvoltă și implementează SMC în conformitate cu domeniul său de interes, acesta poate fi acreditat într-un sistem internațional sau național. Criteriile elaborate pentru majoritatea sistemelor de acreditare includ cerințele sistemului de calitate și sunt în conformitate cu standardele internaționale.

Cu toate acestea, acreditarea nu ar trebui să fie scopul final al unui laborator, chiar și în ceea ce privește concurența pe piața serviciilor de laborator. SMC-ul laboratorului ar trebui să fie în permanență întreținut și actualizat pentru a garanta calitatea serviciilor și pentru a confirma

5.4.4 Documentația de laborator

Principalul „produs” al activității laboratorului este informațiile prezentate sub formă de date și documente care sunt un element al SMC. Pentru a asigura disponibilitatea, fiabilitatea, actualitatea documentației de laborator, aceasta trebuie monitorizată constant de către sistemul de management al documentelor, fie electronic, fie în formă scrisă, sau o combinație a acestora. Managementul documentației reprezintă aplicarea sistematică a regulilor stabilite atât unui singur document, cât și unui grup de documente.

Documentația care reglementează activitatea laboratorului constă din diverse tipuri de documente: organizaționale, administrative, corespondențe, juridice, de personal, contabilitate, forme de înregistrare a datelor. Cele mai multe dintre acestea sunt documente de reglementare și tehnice, care pot fi externe (legi, reglementări tehnice, cerințe tehnice, standarde de cerințe tehnice pentru produsul care urmează să fie testat și metodele de testare și măsurare ale acestuia, pașapoarte pentru echipamente etc.) și interne (instrucțiuni, reguli, SOP, metode, proceduri de testare) care sunt dezvoltate în laborator.

Documentele aparținând aceluiași tip au, în majoritatea cazurilor, aceeași schemă de gestionare.

Pașii principali în gestionarea documentației laboratorului:

- Dezvoltare: Înainte de elaborarea unui document, trebuie să definiți scopul, cerințele de conținut, persoanele implicate.

- Identificare. Fiecare document trebuie să fie legat de un loc și de o oră. Regulile de identificare vă permit să identificați cu siguranță documentul și să urmăriți mișcarea acestuia.

- Analiză. Înainte ca un document să intre în funcțiune, acesta trebuie analizat pentru a respecta obiectivele creației, acoperirea completă a problemei.

- Coordonare. Necesară pentru a verifica justificarea informațiilor prezentate în document.
- Distribuire. Este necesar să vă asigurați că documentul este livrat părților interesate.
- Accesibilitate. Înseamnă că personalul poate folosi documentul la momentul și locul potrivit pentru a-și îndeplini atribuțiile.
- Depozitare (electronic sau pe hârtie). Este important să vă asigurați că documentul este securizat și poate fi restaurat.
- Recenzii. Se efectuează pentru a menține documentația actualizată la intervale specificate.

Conform nivelului ierarhiei, structura documentelor repetă nivelurile de management al laboratorului: strategic, tactic, operațional. Nivelul ierarhiei determină statutul documentelor, sfera activităților lor și permite împărțirea responsabilității pentru acțiuni cu documentul.

Documentația de laborator este un element SMC cu ajutorul căruia comunicarea care are loc în interiorul și în afara laboratorului trebuie să fie întotdeauna relevantă, suficientă și accesibilă pentru personal.

5.5 Auditul și organele de acreditare

Auditul intern. Obiectivele auditului

Independent de standardele aplicate de laborator/întreprindere, auditul intern corespunde următoarelor obiective:

1. Să verifice conformitatea cu cerințele aplicate de laborator/întreprindere (norme, texte de reglementare, termeni de referință, specificații, clienți...).
2. Să verifice dacă dispozițiile organizaționale (procese) și dispozițiile operaționale (proceduri, instrucțiuni...) sunt stabilite, cunoscute, înțelese și aplicate.
3. Să verifice eficiența zonei auditate, înseamnă capacitatea acesteia de a atinge obiectivele.
4. Să identifice modalitățile de îmbunătățire și recomandările pentru îndrumarea laboratorului / întreprinderii către progres.
5. Să îmbunătățească bunele practici observate pentru a încuraja echipa și pentru a-și valorifica practicile la laborator / întreprindere.

Perimetrul auditului.

Auditul intern se referă la toate activitățile desfășurate la laborator/întreprindere (organizație, finanțe, resurse umane, produse...).

În plus față de cele cinci obiective menționate mai sus, unele obiective de verificare a eficienței costurilor, bunelor practici sociale, respectarea mediului, respectarea legilor legate de igiena și securitatea muncii pot fi adăugate auditului intern la cerința administrației generale.

Metodă

Pentru a atinge aceste obiective, în timpul auditului ar trebui respectate următoarele reguli de bază:

- Adoptarea unei atitudini obiective fără extrapolare personală.
- Evitarea afectării de propriile tale origini tehnice.
- A rămâne natural și atent.
- A pune întrebări exhaustiv.
- A distinge faptele excepționale și ordinare.
- A observa funcționarea unității auditate.
- A gândi la rezultate, nu la mijloace.

- A asculta interlocutorul, fără a-l întrerupe.
- A observa bine interlocutorul (voce, emoție, gesturi).
- A distinge opiniile.

În cele din urmă, auditul este o practică bazată pe abordarea riscului. Este convenabil să identificați riscurile potențiale sau dovedite care pot fi condiționate de situație sau de performanța acesteia. Aceasta va permite să acordați prioritate îmbunătățirilor.

Auditorii trebuie să fie instruiți în ce privește tehnicile de audit, normele aplicate de laborator/întreprindere, editarea raportului de audit și abaterile constatate.

Auditul intern trebuie să fie planificat periodic (minim o dată pe an) și să acopere toate standardele. Deci, este întotdeauna de preferat să împărțiți auditul în mai multe părți.

Certificare

Aceasta este furnizarea de către o organizație independentă a unei asigurări scrise (certificat) că produsul, serviciul sau sistemul îndeplinește anumite cerințe specifice.

Certificarea este confirmarea faptului că un client (numit și titular de certificat) funcționează în conformitate cu un set de cerințe, care sunt definite de un standard. **Organizațiile de evaluare a conformității (OEC)**, denumite și în mod obișnuit **Organizații de certificare (OC)**, desfășoară aceste activități de certificare. Pentru a efectua certificarea, **OC** trebuie să fie acreditat de o organizație de acreditare.

Certificarea se poate face în conformitate cu următoarele standarde și norme, cum ar fi: ISO 9001, ISO 22 000, ISO 14 000, BRC, IFS.

Acreditare este recunoașterea formală de către o organizație independentă, cunoscută în general sub numele de **organizație de acreditare**, că o organizație de certificare funcționează conform standardelor internaționale.

Dar, de asemenea, unele standarde pot fi acreditate: **de exemplu standardul de laborator ISO 17025.**

Există, de obicei, doar o **organizație de acreditare** pentru fiecare țară (de exemplu, UKAS pentru Marea Britanie, PCA pentru Polonia etc.), în timp ce există mai multe organizații de certificare care funcționează în fiecare țară - variind de la mici organizații de certificare locale până la mari corporații multinaționale precum SGS, BSI, DNV, BV , Dekra, TUV etc.

Acreditarea este evaluarea de către o terță parte și demonstrarea competenței.

Este evaluarea independenței, obiectivității și competenței pentru desfășurarea activităților definite.

Acreditarea înseamnă încredere sporită în respectarea nivelului cerut de calitate a serviciilor furnizate.

Acreditarea este o activitate a autorității publice. Este ultimul nivel de control al autorității publice.

Este concepută pentru a garanta că organizațiile de evaluare a conformității (de exemplu, laboratoare, organizații de inspecție sau de certificare) au capacitatea tehnică de a-și îndeplini atribuțiile.

Acreditarea poate fi utilizată în sectoare reglementate și zone voluntare. Acreditarea crește încrederea în evaluarea conformității. De asemenea, consolidează recunoașterea reciprocă a produselor, serviciilor, sistemelor și organismelor de certificare din întreaga UE.

Acreditare în UE:

- Regulamentul (CE) nr. 765/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din iulie 2008, stabilește cerințele de acreditare și de supraveghere a pieței în ceea ce privește comercializarea produselor și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 339/93
- **EN ISO / IEC 17011: 2006** standard *Evaluarea conformității - Cerințe generale pentru organizațiile de acreditare care acreditează organizațiile de evaluare a conformității*, precum și

cerințele care rezultă din acordurile multilaterale semnate, cum ar fi: Forumul internațional de acreditare, Comunitatea internațională de acreditare a laboratoarelor, Comunitatea europeană pentru acreditare

Cerințele pentru acreditare sunt stabilite în Regulamentul 765/2008.

Principiile principale ale acreditării sunt:

- O organizație de acreditare pentru fiecare țară UE (este posibil totuși să utilizați organizația națională de acreditare a altei țări)
- Acreditarea este o activitate din sectorul public și o activitate non-profit
- Nu există concurență între organizațiile naționale de acreditare
- Părțile interesate sunt reprezentate
- Acreditarea este mijlocul preferat de a demonstra capacitatea tehnică a organizațiilor notificate din zona reglementată.

Este obligatoriu ca organizațiile naționale de acreditare să fie supuse periodic evaluării reciproce de către EA - Comunitatea europeană pentru acreditare (conform cerințelor articolului 64 din Regulamentul UE nr. 600/2012 al Comisiei) și, prin urmare, statele membre acceptă certificatele de acreditare ale verficatorilor acreditați de aceste organizații naționale de acreditare, de exemplu:

FRANȚA: Comité français d'accréditation (COFRAC)

GERMANIA: Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH (DAkkS)

POLONIA: Polskie Centrum Akredytacji - Centrul Polonez de Acreditare (PCA)

UCRAINA: Agenția Națională de Acreditare din Ucraina (NAAU)

Acreditarea laboratorului

Laboratoarele pot fi acreditate în următoarele domenii, în conformitate cu norme speciale:

- Testare -EN ISO / IEC 17025
- Examinări medicale -EN ISO 15189
- Calibrare -EN ISO / IEC 17025

Acreditare de laborator este recunoașterea formală a competenței unei organizații de a efectua anumite teste specifice, examinări sau calibrări ale instrumentelor.

Pentru a fi acreditați, trebuie să existe programe de control al calității și de asigurare a calității pentru toate aspectele operațiunilor de laborator.

Toate instalațiile și echipamentele trebuie să asigure adecvarea pentru aplicațiile prevăzute.

De asemenea, laboratorul trebuie să participe la un program de testare analitică a competenței.

Fără acreditare, nu este clar ce standarde și sisteme de calitate sunt utilizate de fapt de laborator.

Pentru a menține această recunoaștere, laboratoarele sunt reevaluate periodic de către organizația de acreditare întru asigurarea conformității lor continue cu cerințele, și pentru a verifica dacă standardul lor de activitate este menținut.

Clienții verifică pentru ce teste sau măsurători specifice sunt acreditate laboratoarele.

Aceste informații sunt de obicei specificate în domeniul de acreditare al laboratorului, emis de organizația de acreditare.

Descrierea în domeniul acreditării permite, de asemenea, clienților să găsească laboratorul potrivit sau serviciul de testare.

Organizațiile de acreditare a laboratoarelor publică domeniul de acreditare pentru laboratoarele lor acreditate fie în registre de tipar, fie pe internet.

O evaluare periodică de către o organizație de acreditare verifică toate aspectele operațiunilor laboratorului.

Domeniile de îmbunătățire sunt identificate și discutate, fiind furnizat un raport detaliat la sfârșitul fiecărei vizite.

Acolo unde este necesar, acțiunile corective sunt monitorizate de către organizația de acreditare, astfel încât entitatea este încrezătoare că a luat măsurile corespunzătoare.

Acreditarea este un instrument eficient de marketing pentru organizațiile de testare, calibrare și măsurare.

Prin intermediul unui sistem de acorduri internaționale, laboratoarele acreditate primesc o formă de recunoaștere internațională, care permite ca datele lor să fie mai ușor acceptate pe piețele de peste mări.

Această recunoaștere ajută la reducerea costurilor pentru producătorii și exportatorii care au produsele sau materialele testate în laboratoare acreditate, prin reducerea sau eliminarea nevoii de re-testare în altă țară.

5.6 Organizațiile internaționale din domeniul practicii de laborator: Asociația Chimicilor Analisti Oficiali, Microbiologi, ISO, Norme Europene

AOAC INTERNATIONAL reunește guvernul, industria și mediul academic pentru a stabili metode standard de analiză, care să asigure siguranța și integritatea alimentelor și a altor produse care au un impact asupra sănătății publice din întreaga lume.

În calitate de lider al excelenței analitice, AOAC INTERNATIONAL promovează siguranța alimentară, integritatea alimentară și sănătatea publică, reunind membri, organizații și experți dedicați dezvoltării și validării standardelor, metodelor și tehnologiilor de interes global.

AOAC International a fost înființată în 1884 ca Asociația Chimicilor Agricoli Oficiali. Mai târziu, numele Asociației Chimicilor Analisti Oficiali a fost adoptat pentru a reflecta mai bine domeniile de interes suplimentare pentru siguranță. Astăzi, denumirea legală a organizației este AOAC INTERNATIONAL, într-un efort de a reflecta natura globală a impactului.

Programul Metode oficiale de analize (OMA) este programul principal de metode al AOAC INTERNATIONAL. Acest program de metode este distinct de publicația anuală, Metode oficiale de analiză a AOAC INTERNATIONAL. Metodele aprobate sunt supuse unui control științific riguros, sistematic, pentru a avea siguranța că sunt extrem de credibile și justificate - și pot fi utilizate cu încredere de către industrie, agenții de reglementare, organizații de cercetare, laboratoare de testare și instituții academice.

Metode oficiale de analizăSM (OMA) este cea mai cuprinzătoare și mai fiabilă colecție de metode chimice și microbiologice și de standarde de consens disponibile. Multe metode oficiale au fost adoptate ca metode internaționale armonizate de referință de către Organizația Internațională pentru Standardizare (ISO), Federația Internațională a Produselor Lactate (IDF), Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată (IUPAC) și Comisia Codex Alimentarius.

ISO (Organizația Internațională de Standardizare)

ISO este cel mai mare dezvoltator și editor din lume de standarde internaționale, iar standardele ISO sunt aplicabile multor tipuri de organizații, inclusiv laboratoarelor clinice și de sănătate publică.

ISO este o rețea a institutelor naționale de standardizare din 157 de țări, câte un membru per țară, cu un secretariat central la Geneva, Elveția, care coordonează sistemul. Este o organizație nonguvernamentală și formează o punte de legătură între sectoarele public și privat. Pe de o parte, multe dintre institutele sale membre sunt parte a structurii guvernamentale a țărilor lor sau au fost mandatate de guvern. Cu toate acestea, mulți membri au rădăcini unice în sectorul privat, fiind înființate de parteneriate naționale ale asociațiilor industriale. Prin urmare, ISO permite să se ajungă la un consens cu privire la soluțiile care îndeplinesc atât cerințele afacerilor, cât și nevoile mai largi ale societății.

Activitatea de pregătire a standardelor este condusă de comitetele tehnice ISO. Fiecare organizație membru are dreptul de a fi reprezentat în comitete. Organizațiile internaționale, atât guvernamentale, cât și nonguvernamentale, participă, de asemenea, la activitățile comitetului. Proiect de standarde internaționale adoptat de ghidul tehnic 1 ISO / IEC 2: 1996 (EN 45020: 1998) Standardizare și activități înrudite - vocabular general. Geneva, Organizația Internațională pentru Standardizare, 1996.

126 comitete ale Sistemului de Management al Calității Laboratorului sunt distribuite organelor membre pentru votare. Publicarea ca standard internațional necesită aprobarea a cel puțin 75% din organizațiile membre participante la vot.

CLSI (Institutul de standarde clinice și de laborator)

CLSI este o organizație globală, non-profit, care dezvoltă standarde, promovează dezvoltarea și utilizarea standardelor voluntare de consens și a liniilor directe în cadrul comunității de îngrijire a sănătății. Documentele CLSI sunt elaborate de experți care lucrează în subcomitete sau grupuri de lucru sub conducerea și supravegherea unui comitet de zonă. Dezvoltarea standardelor CLSI este un proces dinamic. Fiecare comitet de zonă CLSI se angajează să producă documente de consens legate de o anumită disciplină, așa cum este descris în declarația sa de misiune.

CEN (Comitetul European de Standardizare)

CEN a fost fondat în 1961 de către organizațiile naționale de standardizare din Comunitatea Economică Europeană și din țările asociate. Termenii generali includ deschidere, transparență, consens și integrare. Adoptarea formală a standardelor europene se decide cu un vot majoritar ponderat al membrilor naționali CEN și este obligatorie pentru toți. Responsabilitățile sunt împărțite între 30 de membri naționali din fiecare țară, 7 membri asociați și 2 consilieri, precum și Centrul de Management CEN din Bruxelles.

WHO (Organizația mondială a sănătății)

WHO a elaborat mai multe standarde pentru laboratoarele de diagnostic specifice bolilor. Un exemplu este poliomielitea, unde este necesară acreditarea pentru ca un laborator să participe la Rețeaua de poliomielite pentru eradicarea poliomielitei. Au fost selectate șapte criterii, inclusiv o activitate minimă de 150 de probe anual, participarea cu succes la testarea competenței și precizia și actualitatea rapoartelor de cazuri către rețea.

EPTIS baza de date este o publicație comună a unui consorțiu mondial de organizații. Membrii acestui consorțiu sunt toți implicați în PT într-un fel sau altul și joacă un rol proeminent în infrastructurile de calitate naționale sau internaționale. Există membri coordonatori, care joacă un rol mai activ în EPTIS, și sprijină membrii care oferă un backup mai intangibil. Coordonatorul general al EPTIS este Institutul Federal pentru Cercetarea și Testarea Materialelor (BAM) din Germania.

Sistemul European de Informații PT, sau EPTIS, a fost denumirea unui proiect al UE care avea ca scop realizarea unui inventar al schemelor de PT operate în mod regulat în țările participante. Partenerii proiectului au fost laboratoare și institute naționale importante.

EPTIS este o bază de date înființată în 2000 în Europa, care inițial reunea furnizori de teste de competență din 16 țări din regiune și are în prezent un registru de peste 800 de programe. De atunci, coordonatorii EPTIS s-au străduit să-și lărgescă domeniul de acțiune pentru a include alte țări și regiuni. Această inițiativă are sprijinul unor instituții internaționale importante care reprezintă laboratoarele de testare și calibrare, precum și Comunitatea Internațională de Acreditare a Laboratoarelor (ILAC) și alte comunități de acreditare.

Prin intermediul unui proiect IAAC, finanțat cu resurse ale Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) și sub conducerea subcomitetului IAAC Laboratories, furnizorii de teste de competență din Canada, Mexic, Caraibe, America Centrală și America de Sud vor fi integrați în EPTIS, ajutând astfel laboratoarele să aibă acces la informații cu privire la programele disponibile în regiune.

Capitolul 6. Analiza genetică

6.1 Reacția de polimerizare în lanț (PCR) ca metodă de analiză genetic-moleculară

PCR este o metodă experimentală bazată pe principiul creșterii exponențiale a numărului de copii dintr-o secvență de matricei ADN ascendențe, prin intermediul enzimelor *in vitro*. Prin aceasta, singura secvență limitată de primeri este copiată, se întâmplă numai în cazul în care este prezentă în proba analizată de material biologic. Metoda PCR a fost elaborată de Carry Mullis în 1983; zece ani mai târziu el a primit premiul Nobel în domeniul chimiei pentru această descoperire [Glazko V.I., 2001; 2003].

Reacția de polimerizare în lanț trece trei etape cu parametri de temperatură și timp corespunzători care sunt înălțuiți automat în termostatul-amplificatorul programat.

Prima etapă este denaturarea termică: distrugerea moleculei de ADN dublucatenară la temperatura 93-95° C crearea ADN-ului din două catene unice. Pentru denaturarea completă a ADN-ului cu scopul de a crește rezultatul produsului PCR, denaturarea primară se face la temperatura de 95°C timp de 2-5 minute.

A doua etapă este hibridizarea: îmbinarea primerilor cu succesiunea complementară a ADN-ului de pe catena opusă a ADN-ului în limitele secvenței specifice. Hibridizarea primerilor are loc conform regulilor complementarității ale lui Chargaff, unde se indică faptul că în molecula de ADN dublu catenară, adeninei (A) i se opune întotdeauna timină (T), și guaninei (G) i se opune întotdeauna citosina (C). Unul dintre cei mai importanți parametri ai PCR este temperatura hibridizării primerilor (T_A), care, de regulă, depinde de structura primerilor și este în medie de 55-65° C, cu 3-5° C mai mică decât temperatura de topire a lor.

A treia etapă este elongarea - sisteza catenei de ADN complementare de către *Taq*-polimeraza la temperatura de 72° C. Ciclul de temperatură al amplificării se repetă de multe ori și în decursul a 25 - 40 de cicluri amestecul acumulează fragmente de ADN sintetizate scurte specifice - ampliconi, într-o cantitate suficientă pentru vizualizarea lor [Mullis K, 1986].

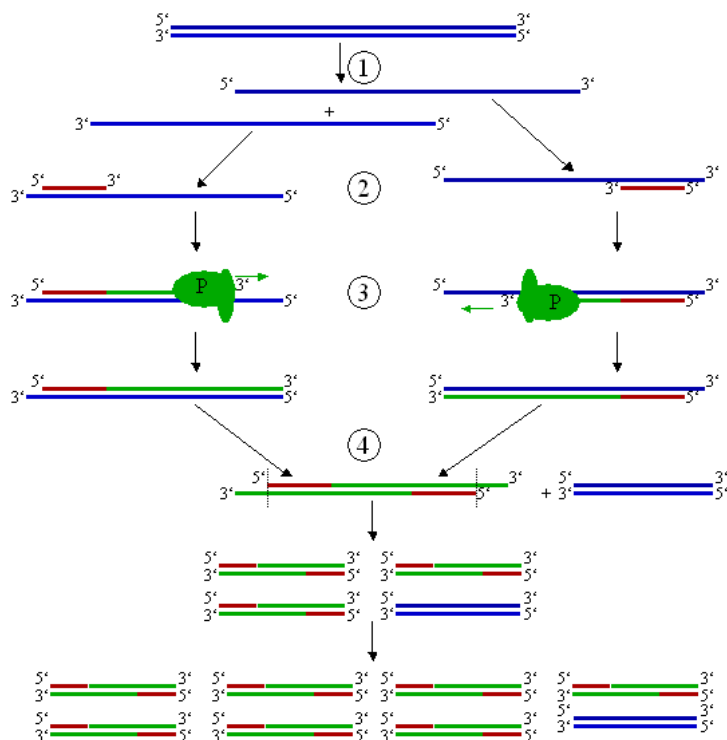


Figura 6.1 Schema ciclului PCR

(1) denaturare la 94-96°C; (2) hibridizare la 56-65°C; (3) elongarea la 72°C; (4) sfârșitul primului ciclu. Două lanțuri de ADN obținute sunt matricea pentru următorul ciclu, de aceea cantitatea de ADN matricial se dublează în timpul fiecărui ciclu.

Fragmente specifice limitate de primeri la capetele lor, apar pentru prima dată la sfârșitul celui de-al doilea ciclu, se acumulează în progresia geometrică și foarte curând încep să domine printre alte produse de amplificare [Глазко, 2006].

Creșterea produsului necesar în progresie geometrică (exponențial) este limitată de cantitatea reactivilor, prezența inhibitorilor, formarea produșilor auxiliari. Acumularea de produse specifice PCR-ului în amestec este prezentată prin următoarea formulă:

$$A = M (2^n - N - 1) \sim 2^n,$$

unde A este o cantitate de produse specifice (limitate de primeri) de reacție a ampliconilor; M este un număr inițial de ADN-țintă; n este un număr de cicluri de amplificare; $\sim$ este un semn al echivalenței matematice a unui proces (în cazul nostru este un proces de amplificare).

În ultimele cicluri de reacție, formarea încetinește, se numește „efect de platou”. Termenul „efect de platou” este utilizat pentru descrierea procesului de acumulare a produselor PCR în ultimele cicluri de amplificare când numărul ampliconilor atinge 0,3-1 picomoli.

În funcție de condiții și de numărul ciclurilor ale reacției de amplificare, momentul obținerii „efectului de platou” este afectat de: utilizarea substraturilor (primeri și dNTP); stabilitatea reactivilor (enzima și dNTP); numărul inhibitorilor, inclusiv pirofosfați și duplexuri-ADN; produse nespecifice sau primer-dimeri care concurează pentru primeri, dNTP și polimeraza; concentrația produsului specific și denaturare incompletă la concentrație mare de produse de amplificare. Cu cât este mai mică concentrația inițială a ADN-ului țintă, cu atât este mai mare riscul de randament de reacție pe platou. Acest moment se poate întâmpla înainte ca cantitatea de produse specifice amplificării să devină suficientă pentru a fi analizată. Poate fi evitat prin optimizarea condițiilor reacției de polimerizare în lanț care are loc, și anume compoziția și concentrația componentelor amestecului de reacție, și modul de amplificare [McPherson MJ, 2000].

Componentele standard ale amestecului PCR sunt:

- matria ADN;
- amestec de primeri oligonucleotidici direcți și inverși complementari pe capetele fragmentului țintă;
- ADN-polimerază termostabilă - enzimă care catalizează reacția de polimerizare a ADN-ului. Polimeraza utilizată în PCR ar trebui să-și mențină activitatea la o temperatură ridicată, pe o perioadă lungă de timp, de aceea enzimele extrase din bacteriile termofile *Thermus aquaticus* (Taq-polymeraze), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-polymeraze), *Pyrococcus woesei* (Pwo-polymeraze) și altele se folosesc [Arezi B, 2003].
- Deoxinucleotidtrifosfați (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- Ioni Mg^{2+} , necesari pentru funcțiunea polimerazei;
- Soluție tampon care oferă condițiile necesare pentru reacție - pH, forța ionică a soluției. Conține săruri și albumină serică bovină.

Interpretarea rezultatelor analizei PCR și evaluarea eficienței PCR poate fi realizată prin separarea produselor de amplificare în gel de agar prin metoda de electroforeză orizontală, prin metoda de electroforeză capilară sau pe monitorul computerului cu aplicarea fluorescenței (PCR - în timp real) sonde [Rebrykov DV, 2009].

6.2 Cerințe privind instrumentele și echipamentele

6.2.1 Descrierea instrumentelor și a echipamentelor cu caracteristicile și destinația lor pentru lucrările de laborator

Un set special de echipamente de laborator necesare este definit în funcție de destinația funcțională a laboratorului. Trebuie luate în considerare metodele molecular-biologice și sistemele de testare care vor fi utilizate pentru cercetări, precum și volumele de lucrări care vor fi realizate.

Pentru analize sunt utilizate un număr de dispozitive și consumabile, acestea includ, de asemenea, eprubete și adaptoare, excluzând posibilitatea contaminării încrucișate (poluare) a rezultatelor, a acizilor nucleici extrași (ADN / ARN) și a produșilor reacției de polimerizare în lanț (PCR).

În aceste scopuri este necesar să se utilizeze:

- Termostate cu bloc solid;
- Eprubete de plastic de unică folosință, fără ADN-uri și ARN-uri;
- Vârfuri (adaptoare) cu filet pentru micro-pipete fără ADN-uri și ARN-uri;
- Containere speciale pentru aruncarea vârfurilor și eprubetelor uzate.

Pipetele, suprafața de lucru și suprafața exterioară a dispozitivelor trebuie să fie rezistente la detergenți, dezinfectanți și la radiațiile ultraviolete.

La aplicarea metodei PCR cu hibridizare și detectare fluorescentă “conform punctului final” se folosește un detector special de “Dzhyn” sau “Ala1 / 4”. Este util să îl instalați în camera de amplificare, conectat la computer cu un sistem operațional special, conform echipamentului instalat [MY 1.3.2569-09.M., 2009].

Analizatorul genetic utilizat pentru secvențierea și analiza fragmentelor este instalat într-o cameră separată pentru detectarea și interpretarea rezultatelor.

Lista minimă a principalelor echipamente pentru laboratorul de analize genetice

Pentru tratarea materialelor și extracția ADN / ARN

Conform nivelului de automatizare a extracției acizilor nucleici, sunt definite următoarele metode: metode manuale, semi-automate și complet automate.

Pentru metoda manuală de extracție a acizilor nucleici avem nevoie de:

1. **Cutie de securitate biologică de clasa II și superioară;**
2. **Centrifuga-Wortex;**
3. **Microcentrifugă pentru 12 - 16 mii rpm pentru eprubete cu volum de 1,5 ml.**
4. **Termostat solid cu o gamă de temperaturi de lucru de la 25 la 100° C;**
5. Aspirator de vid cu colbă de captare;
6. Spectrofotometru
7. Set de pipete automate cu volum modificabil (5 mm³, 200 mm³ și 1000 mm³).
8. Frigider pentru 2 - 8 ° C cu compartiment de îngheț pentru - 20 ° C;

Cutie de securitate biologică. A fost elaborată pentru protecția personalului de laborator, a mediului și a materialelor de lucru împotriva impactului aerosolilor infecțioși și împotriva pătrunderii particulelor care pot apărea la locul de muncă în materiale care conțin componente infracționale. În funcție de clasificare sunt propuse diferite niveluri de protecție împotriva contaminării (poluării).

		
Figura 6.2 Cutie de securitate biologică (BSB) asigură protecția personalului și a mediului, dar nu protejează produsele (probele ...) împotriva contaminării.	Figura 6.3 Cutie de securitate biologică (BSB) din clasa II oferă protecție personalului, mediului și protecție împotriva contaminării probelor datorită recirculării aerului prin filtrul HEPA în flux vertical laminar din interiorul cutiei.	Figura 6.4 Cutie de securitate biologică (BSB) din clasa III oferă un nivel absolut de protecție care nu poate fi atins în cutiile din clasa I și II. Cutia este ermetică și menține o presiune joasă, oferind o garanție suplimentară de lucru în condiții de siguranță.

Centrifuga Wortex;

Centrifuga - wortex oferă reproducerea tehnologiei „Spin - Mix - spin”, destinată „să scadă” micro-volumele de reactivi pe fundul eprubetei (prima centrifugare - rotire), amestecare suplimentară (mix) și a doua colecție de reactivi (a doua rotire) de pe pereții și capacele de micro-eprubetelor de testare. Viteza maximă de centrifugare cu centrifugă - wortex este de 6 000 de rotații pe minut. Este destinată să lucreze simultan cu 12 eprubete, care permite economisirea timpului pentru prepararea probelor și este un instrument necesar pentru analiza PCR.



Figura 6.5 Centrifugă - wortex „Multispin” „MSK-6000”, Biosan

Microcentrifugă

Microcentrifuga este un dispozitiv de laborator pentru sedimentarea cu viteză mare a particulelor. Aceasta permite menținerea unor astfel de metode de tratare a micro-volumelor probelor, cum ar fi, de

exemplu, extracția acizilor nucleici și a albuminelor. Oferă valori maxime ridicate ale forței centrifuge relative, în funcție de model, până la 13 000 de rotații pe minut, 17 000 de rotații pe minut sau 21 000 de rotații pe minut și permite lucrul cu metode complexe și simple. Este destinată să lucreze cu eprubete al căror volum este de la 1,5 la 2,0 ml. Aceste centrifugi sunt echipate cu capace ermetice, care presurizează constant probele biologice în interiorul rotorului. Există modele moderne cu rotoare cu volum variabil, de ex. 24 x 2 ml, există și rotoare pentru benzi PCR de 8 x 8 centrifugalizare, permițând tratarea unui număr mare de probe pe parcursul unui ciclu. Materialele solide din construcții și accesoriile sunt rezistente la impactul unor substanțe chimice agresive, permit efectuarea curățării scrupuloase a dispozitivelor și autoclavarea echipamentelor pe parcursul mai multor ani, garantând exploatarea lor sigură și robustă.



Figura 6.6 Micto-Centrifuga “MicroCL 17”, Thermo fisher

Termostat solid

Termostatele solide sau blocurile de uscare, cu termoblocuri realizate din diferite metale, sunt utilizate pentru menținerea temperaturii programate a probelor în eprubete, care sunt introduse în găurile termoblocului. Termostatele diferă în funcție de diapasonul temperaturilor menținute, în funcție de tipul de blocuri pentru diferite volume ale eprubetelor și în funcție de acuratețea menținerii temperaturii programelor. Precizia de $\pm 0,1^\circ \text{C}$ de la temperatura programată de utilizator este considerată ca fiind una ridicată. În funcție de model și producător, termostatele au diapason de temperaturi de la $+5$ la $+130^\circ \text{C}$. Termostatele moderne conțin termoblocuri pentru eprubete cu diferite combinații de volume tolerabile, de exemplu, un termobloc poate conține găuri pentru micro-eprubete de 1,5 ml și 0,5 ml sau combinația de microeprubete de 1,5 ml, 0,5 ml și 0,2 ml.

Termostatele solide conțin ventilator integrat care permite răcirea termoblocului într-un timp scurt. Ecranul cu cristale lichide facilitează lucrul cu dispozitivul, permite stabilirea cu precizie și supravegherea tuturor parametrilor de lucru ai termostatului. Dispozitivul permite aplicarea de metode care necesită temperaturi diferite de incubare în diferite etape ale unui proces și, de asemenea, atunci când este încălzit la temperaturi ridicate.

Termoblocul digital este utilizat în mare măsură în laboratoarele științifice și medicale pentru pregătirea probelor, stocarea enzimelor, reacții enzimaticе, amplificarea ADN-ului, coagularea serică, distrugerea gelului pentru electroforeză pe gel etc.

De fapt, diferite companii de top, precum Biosan, DNA-technologies, Thermo Scientific, Eppendorf și altele propun termostate solide cu caracteristici tehnice diferite.

		
Figura 6.7 Termostat digital solid “TDB-120”, <i>Biosan</i> Spectrul temperaturilor de lucru +25 - +120 ° C, precizie $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, cu bloc de aluminiu A-103 pentru micro-eprubete de testare de 1,5 ml (32 locuri), 0,5 ml (21 locuri) și 0,2 ml (50 locuri)	Figura 6.8 Termostat digital “Compact Dry Bath S”, <i>Thermo Fisher</i> Spectrul temperaturilor de lucru +2 - +100 ° C, precizie $\leq \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, diferite combinații pentru blocuri schimbabile pentru eprubete cu volume diferite de la 0,2 ml la 50 ml.	Figura 6.9 Termostat solid “Gnom”, <i>DNA-Technology</i> Spectrul temperaturilor de lucru - de la temperatura ambiantă la 99°C, precizie $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, formatul blocului: pentru eprubete de 1,5 ml (40 locuri), 5 ml (28 locuri). Echipat cu capac de prindere termoizolant pentru încălzirea uniformă și prevenirea deschiderii eprubetelor.

Aspirator de vid cu colbă de captare

Aspiratorul de vid cu colbă de captare este destinat aspirării (eliminării) urmelor de alcool (sau tampon) de pe pereții eprubetelor Eppendorf la purificarea ADN / ARN sau pentru alte tehnologii de redepunere a macromoleculelor.

Dispozitivul poate fi, de asemenea, utilizat pentru operații de rutină de spălare a celulelor din mediu nutritiv și resuspendare în tampon. Principiul de lucru al aspiratorului constă în crearea unei presiuni negative în colba de captare cu microcompresor, integrat în corp. Colba de captare este conectată printr-un tub de plastic la duză. Lichidul este îndepărtat din eprubete în colba de captare la contactul duzei cu suprafața soluției. Pentru comoditate, un mini-trepied organizatoric conceput pentru două eprubete necesare pentru spălarea și depozitarea vârfului pentru re folosirea acestuia poate fi amplasat pe partea dreaptă a dispozitivului.

Aspiratorul conține un filtru microbiologic care previne riscul ieșirii bacteriilor, virusilor și particulelor infecțioase din colba de captare. Filtrul microbiologic de aspirație - hidrofob: reține particule mai mari de 0,027 μm , care sunt mai mici decât virusii hepatitei A, B și C cu eficiența până la 99,9%.

Specificațiile aspiratoarelor de la diferiți producători diferă în funcție de volumul captare al colbei, presiunea de vid, dimensiunea, accesoriile suplimentare disponibile etc. (**Figura 6.10, Figura 6.10**).

	
Figura 6.10 Aspirator cu colbă de captare "FTA-1", Biosan Aspirare maximă - 0,05 Mpag, volumul colbă de captare - 1000 ml, dimensiuni compacte 160 x 210 x 340 mm	Figura 6.11 Aspirator electric de vid "7A-23", Biomed Vid maxim - 0,09 Mpag (685 MmHg), volumul balonului de prindere - 2500 ml × 2 volume, dimensiuni 350 × 305 × 795 mm

Spectrofotometru

Spectrofotometrul este un dispozitiv de laborator care oferă date despre caracteristicile spectrale ale componentelor analizate și este proiectat pentru:

- măsurarea concentrației circulare a acizilor nucleici: ADN dublu catenar, ADN monocatenar, ARN, oligonucleotide la 260 nm;
- determinarea concentrației proteice a absorbției la o lungime de undă de 280 nm;
- determinarea purității probei prin rație 260/280 nm;
- identificarea substanțelor și analiza microparticulelor;
- determinarea densității culturilor celulare;
- analiza cantitativă a proteinelor, conjugărilor, metaloproteinelor;
- calculul coloranților fluorescenți care etichetează intensitatea.

Măsurarea concentrației de acizi nucleici este o practică de rutină a laboratoarelor biochimice, moleculare și genetice, farmacologice, imunologice, microbiologice și altele.

Determinarea concentrației și calității preparării acizilor nucleici este una dintre etapele inițiale cheie din experimente, care utilizează PCR, PCR calitativă, analiza fragmentelor și secvențierea noii generații. Este necesar să rețineți că evaluarea materialului sursă înainte de experimentarea cu reactivi scumpi este crucială.

Analiza spectrofotometrică folosind cuvete. Dispozitivele spectrofotometrice și caracteristicile lor pot varia foarte mult în funcție de producător și de sarcinile pentru care este proiectat dispozitivul. Dar principalele elemente de construcție sunt similare la toate dispozitivele. Acestea sunt sursă de lumină, monocromator, compartiment cu cuvete cu detector de probă și de înregistrare.

Monocromatorul este un dispozitiv pentru izolarea părții înguste separate (1-2 nm) de spectrul radiativ total.

Spectrofotometrul are două surse de lumină: pentru vizibilitatea unei părți a spectrului (VIS) și a sursei ultraviolete (UV) de la 100 la 390 nm. De asemenea, seturile de filtre de lumină pot fi utilizate suplimentar la unele dispozitive.

Există un compartiment de cuvetă cu spectrofotometru care conține cuvete cu probă analizată, care poate fi echipat suplimentar cu mecanisme de reglare termică, amestecare și adăugare a substanțelor direct în timpul măsurării.

Schema dispozitivului poate fi reprezentată în felul următor (Figura 6.12).

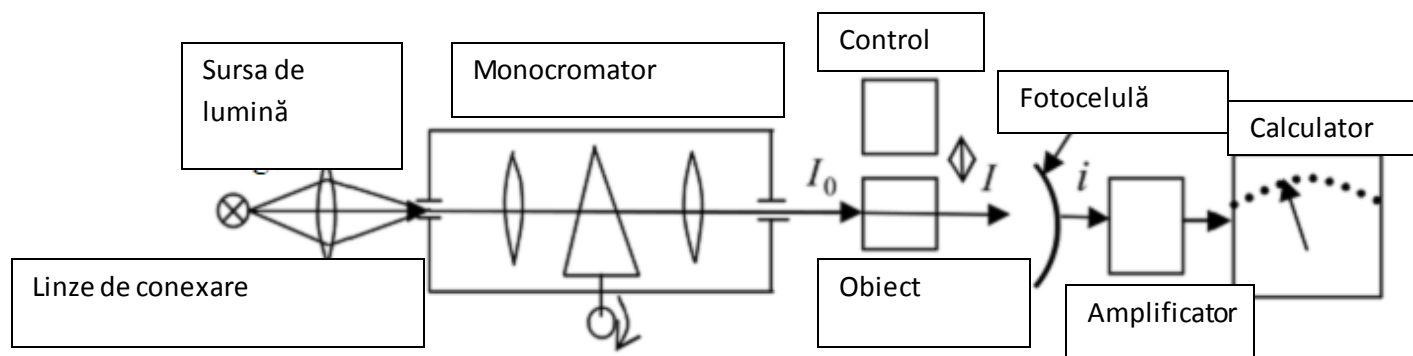


Figura 6.12 Schema structurii spectrofotometrului

Această schemă de spectrofotometru poartă denumirea de semn-undă. Pentru a măsura absorbția, aceeași rază de lumină monocromatică ar trebui să treacă alternativ prin cuveta cu probă și prin cuveta cu solvent care servește drept control.

Modelele moderne de spectrofotometre sunt concepute în conformitate cu principiul drumului lung. În acest tip de spectrofotometre, raza monocromatică este direcționată periodic prin rotirea oglinzii pe două canale; cuva cu probă este plasată într-un canal, cuva cu solvent în plasat într-un alt canal. Razele trec proba și verifică în antifază, în același timp diferența de intensitate este înregistrată de sistemul fotometric cu interpretarea ulterioară a rezultatului.

Diferite funcții fotometrice, și anume analiza undelor multiple și unice, combinate cu metode cinetice, asigură scanarea pe o gamă largă de lungimi de undă de la 190 nm la 1100 nm.

Exemplul unui spectrofotometru cu cuvete este prezentat în Figura 6.13.



Figura 6.13 Spectrofotometru cu compartiment cu cuvete și ecran tactil “DS-C”, DeNovix

Analiza spectrofotometrică fără cuvete. Pentru analiza micro-volumelor de substanțe, se utilizează o tehnologie fără cuveta, în acest caz proba este ținută de forțele de tensiune superficială ale fluidului. Tehnologiile inovatoare permit efectuarea unei măsurători exacte a micro-volumelor de probă de la 0,3 mm³.

Pentru analiza spectrofotometrică, o picătură de probă este plasată pe modulul fix al dispozitivului. Modulul mobil al dispozitivului este coborât pe picătură, rezultând crearea unei coloane de lichid din proba examinată între modulele mobile și fixe. Înălțimea coloanei este reglată automat. Dispozitivul măsoară absorbția luminii în raze VIS / UV în coloana probei (Figura 6.14, Figura 6.15).

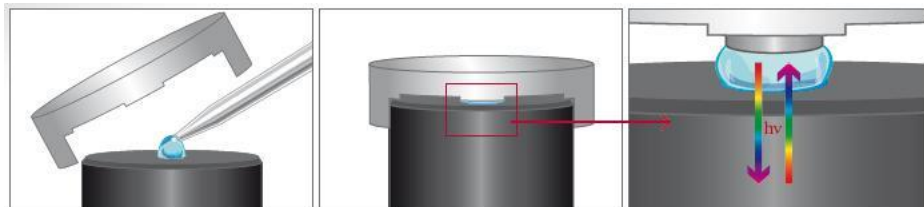


Figura 6.14 Schema analizei spectrofotometrice fără cuvete



Figura 6.15 Spectrofotometru pentru analiză fără cuvete “NanoDrop 2000 / 2000c”, Thermo Scientific

Pipete automate

Pipetele automate sunt dispozitive de tip piston. Pipetele trebuie să corespundă cerințelor ISO 9001: 2000 în ce privește precizia și reproductibilitatea măsurărilor.

Principiul de funcționare al pipetelor se bazează pe deplasarea aerului din lichid. Dozajul se datorează mișcării pistonului în cilindru de măsurare. În acest caz, pistonul fie reduce volumul din partea de jos, fie îl mărește. Dacă vârful pipetei este plasat în lichid, pe măsură ce volumul dintre lichid și piston crește, lichidul va tinde să umple spațiul eliberat sub piston. Deci, volumul de lichid echivalent cu volumul eliberat sub piston la deplasarea acestuia, va intra în vârful pipetei. Atunci când este necesar să scoateți lichidul retras din pipetă, pistonul se deplasează în direcția vârfului și reduce volumul de aer dintre lichid și piston, astfel încât lichidul să fie complet împins din vârf de către aer.

Există pipete cu volum variabil sau fix, electronice și manuale, mecanice cu unul sau mai multe canale.

Pipetele de laborator cu volum fix sunt concepute pentru a prelua și a distribui un anumit volum de substanță. Pipetele cu volum variabil permit să ia o gamă largă de micro-volumuri fluide. Pipetele mecanice manuale asigură dozarea fluidului preluat prin rotirea unui singur cap de piston (Figura 6.16).



Figura 6.16 Pipete mecanice manuale cu unul și opt canale cu volum variabil, *Eppendorf*

La utilizarea pipetelor electronice, volumul de descărcare este setat și reglat prin controlul datelor de pe ecranul pipetei (**Figura 6.17**). Aceste pipete permit pre-programarea proceselor în mai mulți pași pentru a rezolva sarcini specifice și permit utilizatorilor să seteze volumul de dozare mult mai rapid decât pipetele mecanice manuale standard.



Figura 6.17 Pipete electronice cu volum variabil cu unu sau opt canale, Picus® DNA Picus® NxT

Pipetele automate sunt fabricate din materiale plastice moderne de înaltă calitate, rezistente la medii active chimic, ceea ce permite utilizatorului să lucreze cu diferite lichide, atât cu soluții cât și cu lichidele concentrate.

Automatizarea proceselor de izolare ADN / ARN

Eficiența izolării ADN / ARN va fi sporită semnificativ dacă se vor utiliza instrumente speciale în aceste scopuri. Reducerea numărului de operații manuale la etapa de izolare a acidului nucleic duce la creșterea productivității, la reducerea timpului, la riscul redus de contaminare încrucișată, la standardizarea procesului de izolare și la șansele reduse de erori ale operatorului.

Au fost dezvoltate dispozitive pentru automatizarea procesului de izolare a acidului nucleic, care au sporit rapiditatea și productivitatea izolației. Utilizarea sistemelor automate este deosebit de utilă pentru izolarea ARN-ului, care este rapid inactivată de diferite ribonucleaze. Astfel, în aceste scopuri, au fost dezvoltate următoarele dispozitive: QIASymphony SP / AS (Qiagen) (**Figura 6.18**), Neon-100 (Xiril) (**Figura 6.19**), MagMAX™ Express-96 (Applied Biosystems) (**Figura 6.20**) [I.B. Дзюблик, 2012].



Figura 6.18 Dispozitiv QIAasymphony SP / AS,
Qiagen

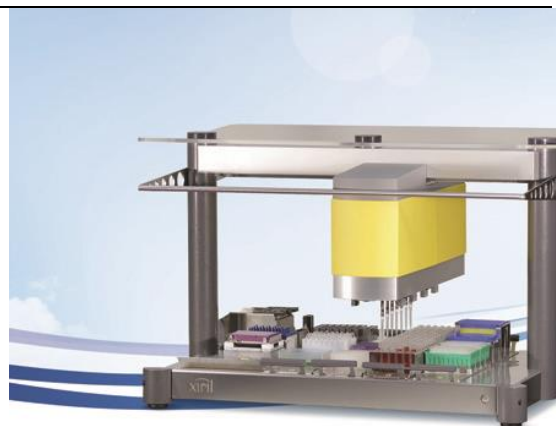


Figura 6.19 Neon-100, *Xiril*



Figura. 6.20 MagMAX™ Express-96, Applied Biosystems

Echipament necesar pentru pregătirea amplificării PCR:

1. Cutie PCR;
2. Ciclator termic sau amplificator pentru PCR în timp real;
3. Centrifuga Wortex;
4. Set de pipete automate cu volum variabil;
5. Frigider comun;
6. Camera de congelare

Cutie PCR;

Cutia PCR destinată lucrărilor sterile UVC / TM-AR este utilizată pentru lucrări curate cu probe de ADN. Oferă protecție împotriva contaminării. Toate modelele de cutii sunt desktop, realizate din cadru metalic, sticlă și au suprafață de lucru din oțel inoxidabil (Imagine).

Axele sunt echipate cu o lampă deschisă ultravioletă (UV) instalată în partea superioară a cutiei. Radiațiile UV dezinfectează suprafața de lucru, inactivând fragmente de ADN / ARN timp de 15-30 de minute. Cronometrul digital disponibil controlează durata iradierii ultraviolete directe. Lampa de zi din interiorul cutiei luminează locul de muncă.

În plus, cutiile sunt echipate cu un recirculator de aer (AR) cu bactericid curgător, care asigură dezinfectia permanentă în interiorul cutiei în timpul funcționării. Este recomandat pentru lucrul cu ampliconi ADN / ARN.



Figura 6.21 Cutie UV pentru PCR UVC / T, *Biosan*

Ciclator termic

Amplificatorul ADN, termociclator este un dispozitiv utilizat pentru PCR. Dispozitivul menține automat numărul necesar de cicluri de reacție, timp optimal și parametrii de temperatură pentru fiecare ciclu.

Există amplificatoare clasice și pentru PCR - în timp real.

Amplificatoarele clasice sunt destinate pentru PCR care se efectuează cu următoarea interpretare a rezultatelor: folosind metode și echipamente suplimentare pentru vizualizarea produselor PCR și interpretarea rezultatelor prin electroforeză orizontală, electroforeză capilară și alte metode. Câteva exemple de amplificatoare clasice sunt următoarele: VeritiWell (Applied Biosystem) (**Figura 6.22**), MiniAmp™ (Applied Biosystem) (**Figura 6.23**), Mastercycler (Eppendorf) (**Figura 6.24**) etc.



Figura 6.22 Amplificator VeritiWell, *Biosistem aplicat*



Figura 6.23 Amplificator MiniAmp™, *Biosistem aplicat*



Figura 6.24 Amplificator Mastercycler, *Eppendorf*

Amplificatoarele pentru PCR - în timp real sunt dispozitive multifuncționale care cuprind funcțiile de amplificator standard și detector fluorescent. Sistemul PCR este utilizat pentru realizarea reacției de polimeră

în lanț în timp real, care diferă de PCR clasic prin detectarea și calcularea cantității de ADN obținute [SA Bustin, 2004; Ball, 2003].

Sarcini care sunt rezolvate folosind amplificatoare în timp real:

- analiza PCR calitativă care oferă:
 - a) identificarea agenților patogeni ai unei game largi de boli infecțioase;
 - b) identificarea simultană a mai multor agenți patogeni în materialul de testare pentru genotiparea microorganismelor;
- analiza PCR cantitativă:
 - a) determinarea încărcăturii virale în infecții;
 - b) determinarea concentrației de ingrediente modificate genetic;
 - c) evaluarea nivelului de exprimare a genelor;
 - d) aplicarea tehnologiei alternative de amplificare pentru validarea rezultatelor și identificarea agenților patogeni viabili (analiza NASBA);
- detectarea fluorescenței punctului final;
- pentru topirea produselor PCR de înaltă rezoluție (HRM), analiza mutațiilor punctuale ADN / ARN, screening HLA, analiza metilării epigenetice.

Amplificatoarele în timp real se divizează în amplificatoare de tip placă și rotor cu un număr de canale pentru detectarea coloranților fluorescenți de la 4 la 6 canale. În ce privește caracteristicile lor funcționale și tehnice, dispozitivele sunt destul de similare, dar poate fi posibilă utilizarea diferitelor tehnologii cu flux de aer încălzit pentru a evita defecțele asociate cu apariția unui efect de limitare, la utilizarea amplificatorului de tip placă.

Amplificatorul de tip placă este un sistem multifuncțional PCR în timp real, care are o roșmă de placă cu bloc termic. Încălzirea până la temperaturile de funcționare și schimbarea gradientului de temperatură are loc prin furnizarea de aer încălzit prin capacul amplificatorului.

Amplificatorul de tip rotor este un amplificator cu construcție circulară (rotativă) a blocului de reacție (Figura 6.25). Tehnologia încălzirii amestecurilor de reacție din eprubete implică o distribuție uniformă a aerului fierbinte pe suprafața eprubetelor cu amestecul de reacție.

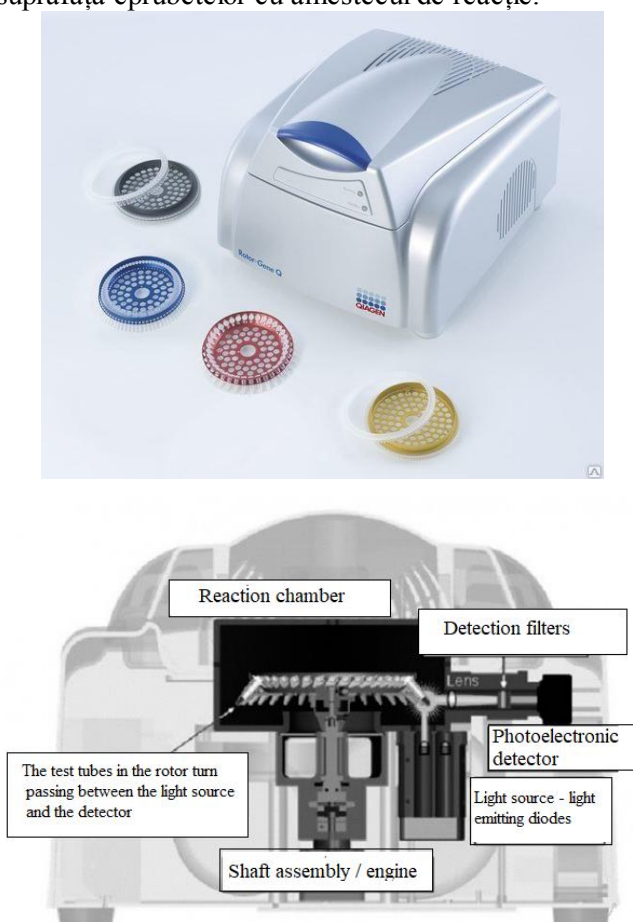


Figura 6.25 Amplificator tip rotor Rotor-Gene Q, Qiagene

Echipamentul necesar pentru detectarea PCR analizează rezultatele prin metoda de electroforeză orizontală:

1. Cameră de electroforeză cu sursă de alimentare (sursă de curent continuu), cuvetă pentru formarea gelului de agaroză, faguri pentru formarea puțurilor în gel;
2. Transluminator;
3. Stație de documentare a gelului;

Când se utilizează PCR în formatul clasic, detectarea ampliconilor se efectuează prin electroforeză în gel de agaroză. În plus, această metodă permite verificarea calității ADN-ului izolat pentru cercetări ulterioare.

Electroforeza este un fenomen electrocinetic al mișcării particulelor unei faze dispersate (soluții coloidale sau proteice) într-un mediu lichid sau gazos sub acțiunea unui câmp electric extern.

Electroforeza orizontală în gelul de agaroză este o metodă standard utilizată pentru separarea, identificarea și purificarea ADN-ului și ARN-ului.

Detectarea pe sisteme speciale de documentare a gelului permite vizualizarea rezultatelor cu ajutorul bromurii de etidiu colorant fluorescent și intercalant. Prin utilizarea bromurii de etidiu, aproximativ 0,1 μg de acizi nucleici pot fi detectați vizual în razele ultraviolete. Metoda nu prevede cuantificarea.

Camera pentru electroforeză orizontală

Camera pentru electroforeză orizontală este un dispozitiv din seria echipamentelor de laborator, și anume, de dispozitive pentru separarea moleculelor încărcate prin electroforeză în gel orizontal și este destinat analizei electroforetice a macromoleculelor biologice. Dispozitivul poate fi utilizat pentru analiza de laborator a proteinelor și a acizilor nucleici, inclusiv pentru detectarea produselor PCR.

În prezent, dispozitivele pentru electroforeză orizontală pe gel, de regulă, sunt versiuni ale dispozitivelor propuse de Schaeffner (1), Laurel (2) sau Vime (3), unde gelul de agaroză este plasat pe o placă separată de sticlă sau plastic sau în o ceașcă specială. Placa este așezată pe platforma dispozitivului astfel încât gelul să fie direct sub suprafața soluției tampon pentru electroforeză. Rezistența gelului diferă ușor de rezistența soluției tampon pentru electroforeză, astfel încât o parte semnificativă a curentului trece prin gel.

Camera conține un capac de protecție și cabluri pentru conectarea la sursa de alimentare care este o sursă de curent continuu (Figura 6.26).

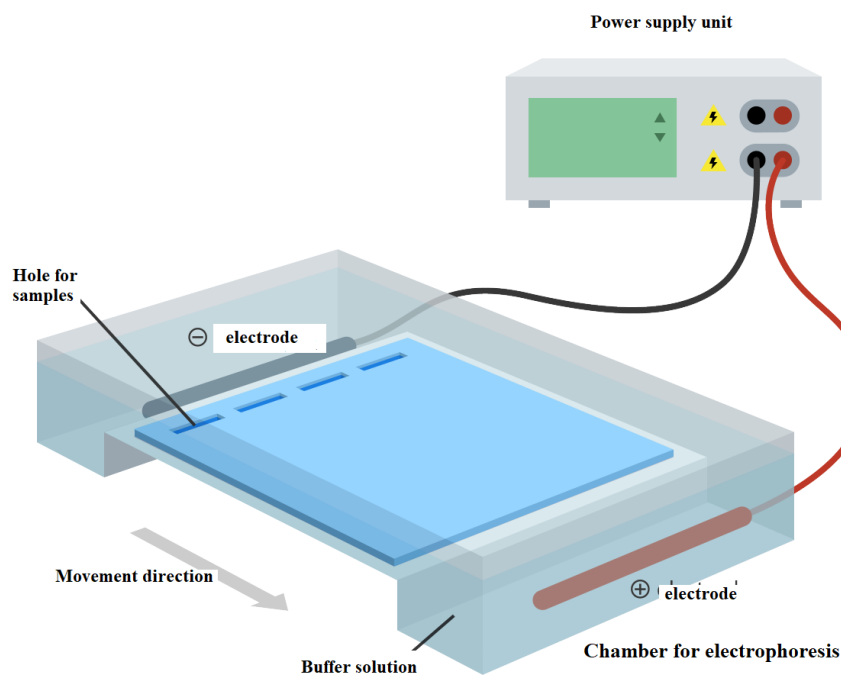


Figura 6.26 Camera pentru electroforeză orizontală în gel de agaroză

Transluminator și stație de documentare a gelului

În funcție de metoda de detectare a produselor de amplificare PCR, poate fi necesar să aveți echipamente de electroforeză cu un sistem de documentare, cum ar fi o stație de documentare a gelului sau transluminator, pentru a vizualiza separarea produselor PCR în raze UV.



Figura 6.27 Stație de documentare a gelului,
BioRad



Figura 6.28 Transluminator, *Coleparmer*

O soluție alternativă pentru aplicarea metodei PCR cu detectarea hibridizării-fluorescenței „punct final” este utilizarea unui detector special de tip „Djyn” (**Figura 6.29**) sau „Ala ¼” (**Figura 6.30**), care ar putea fi instalat în amplificare parte și conectat la computer cu un sistem de operare specific, în funcție de echipamentul utilizat.



Figura 6.29 Detector fluorescent „Djyn-4”,
tehnologie ADN



Figura 6.30 Detector fluorescent
„Ala ¼”, *Biosan*

Echipamente primordiale necesare pentru detectarea rezultatelor PCR prin electroforeză capilară:

- 1. Analizator genetic;**
- 2. Ciclator termic;**
- 3. Centrifuga- Wortex;**
- 4. Frigider comun;**

5. Camera de congelare

Analizator genetic:

Analizatorul genetic este un dispozitiv pentru analiza fragmentelor de ADN marcate fluorescent folosind metoda electroforezei capilare și poate fi utilizat pe scară largă pentru diferite tipuri de genotipare care sunt aplicate în diferite domenii:

- în știința criminalistică, în crearea de baze de date genomice pentru identificarea persoanei, în stabilirea afinității și în rezolvarea problemelor de paternitate;
- pentru analize ADN în agricultură pentru selectarea și pasportizarea raselor de animale valoroase, a soiurilor de plante etc;
- pentru diagnosticarea bolilor oncologice și infecțioase și pentru monitorizarea a progresiei bolilor;
- pentru diagnosticarea bolilor ereditare și predispoziția la acestea;
- pentru decodificarea genomului oamenilor, animalelor și plantelor;
- pentru căutarea și studiul noilor gene responsabile de procese fiziologice importante (cancer, îmbătrânire etc.).

Principiul de lucru al unui analizator genetic capilar prevede un sistem de excitație și detectare a radiației de la mai multe canale capilare situate pe o masă de scanare încrucișată. Capetele capilarelor plasate în tavele cu catod și anod sunt conectate la o sursă de tensiune înaltă. Sursa laser iradiază capilarele din zona de detectare, iar semnalul optic este transformat de un sistem optic care include un obiectiv care focalizează radiația laser și colectează un semnal fluorescent; o oglindă dicroică care reflectă radiația laser și o direcționează către obiectiv și permite, de asemenea un semnal fluorescent; două filtre de lumină, dintre care unul reduce radiația laser reflectată de capilar, iar celălalt este un filtru de lumină de interferență. După trecerea prin acest sistem optic, semnalul este înregistrat de un multiplicator fotoelectron (PEM). Într-una dintre versiunile de realizare a dispozitivului, semnalul fluorescent poate fi împărțit în patru fascicule echivalente, fiecare dintre ele fiind trecut printr-un filtru de interferență corespunzător și înregistrat de PEM. Semnalul de la PEM după amplificare este trimis la computer pentru procesarea corespunzătoare (brevetul SUA N 5274240, IPC 6 G 01 N 21/64, publicat în 1993).

În zilele noastre, analizatorii genetici (secvențiatori) de la societatea *Biosisteme aplicate (Tehnologii de viață)* reprezintă etalonul de aur al electroforezei capilare. Modelele au de la 4 la 8 capilare și oferă automatizarea completă a cercetărilor. Sunt utilizate pentru secvențierea *de novo* și pentru re-secvențiere, precum și pentru analiza fragmentelor: LOH, AFLP, studii de polimorfisme cu nucleotide unice (SNPs), analize de microsateliți, tipare HLA, studii MLPA și altele.



Figura 6.31 Analizator genetic (secvențiator) “ABP 3500”, *Biosisteme aplicate*

Cea mai eficientă tehnologie modernă este utilizarea microcipurilor pe baza polimorfismului cu un singur nucleotid (SNP). Această metodă permite analizei genetice să fie cât mai specializată posibil, să studieze diferențele de țesuturi aparținând unui organism. Dar astăzi această metodă este destul de costisitoare, astfel disponibilitatea sa este limitată.

Pe parcursul ultimului deceniu, cercetările în genetică moleculară au fost dedicate studiului substituțiilor unui singur nucleotid (SNP). Numărul mare al lor în genomul fiecărei specii de animale de fermă și cele mai noi tehnologii de genotipare în funcție de acest tip de indicatori au fost dezvoltate în cele mai dotate laboratoare științifice și au înlocuit alte tipuri de indicator din studiile diversității genetice a speciilor și raselor.

NextSeq 550 (Figura 6.32) este un sistem performant de secvențiere care oferă o calitate înaltă a datelor și o putere flexibilă necesară pentru a secvenția întregul genom, transcriptom și redistribuire spre țintă, precum și capacitatea de scanare a microcipurilor, inclusiv Infinium Methylation EPIC BeadChip și alte BeadChip selectate.

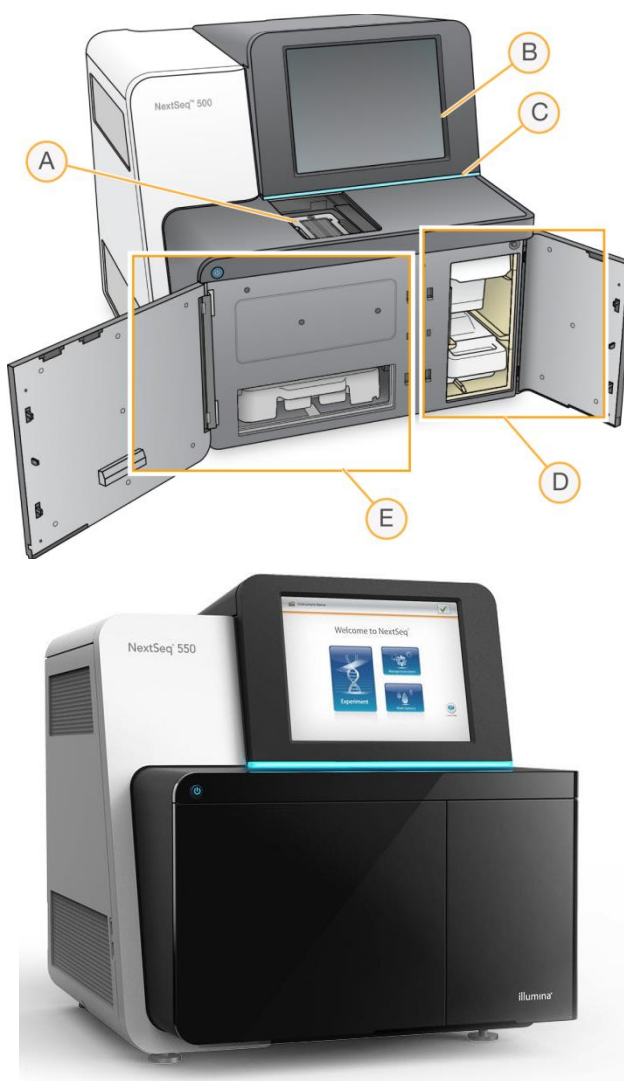


Figura 6.32 NextSeq 550 Scanner de microcip ADN/ARN, Illumina

A - compartiment pentru probe sau microcipuri, B - monitor, C - linia de indicare a stării echipamentului - indică starea echipamentului: funcționează (albastru), necesită mentenanță (portocaliu), gata pentru secvențiere (verde) sau oprire în următoarele 24 de ore (galben), D - compartiment pentru cartușe cu soluție tampon, E - compartiment pentru cartușe cu reactivi.

Pentru fiecare etapă a studiului trebuie prevăzute frigidere separate pentru depozitarea reactivilor și probelor.

În încăperea se va instala o cameră frigorifică plus $4 \pm 2^\circ\text{C}$ și un congelator cu minus $18 \pm 2^\circ\text{C}$ pentru recepție, înregistrare, analiză și prelucrare inițială a materialului. Camera de izolare a acidului nucleic este dotată cu o cameră frigorifică plus $4 \pm 2^\circ\text{C}$ pentru a stoca setul de reactivi și un congelator la minus $18 \pm 2^\circ\text{C}$, pentru a asigura o perioadă lungă de stocare (până la un an) a ADN / ARN. Pentru o perioadă mai lungă de stocare a ADN / ARN (un an și mai mult), ar trebui instalat un congelator cu minus 70°C .

O cameră de refrigerare plus $4 \pm 2^\circ\text{C}$ și un congelator minus $18 \pm 2^\circ\text{C}$ sunt instalate în încăperea pentru prepararea amestecurilor de reacție PCR, cu scopul stocării kiturilor de reactivi necesare pentru amestecurile PCR.

În încăperea de detecție a produselor de amplificare PCR este amplasată o cameră de refrigerare plus $4 \pm 2^\circ\text{C}$ pentru depozitarea reactivilor de detecție electroforetică [IV Dzublyk, 2012].

6.3 Principalele cerințe tehnice pentru laboratoare, organizare a zonelor de lucru, cerințe pentru spații

Amenajarea generală a spațiilor de laborator PCR, amplasarea zonelor de lucru și celor auxiliare trebuie realizată în conformitate cu lista tehnicilor biologice moleculare care vor fi utilizate în acel laborator.

Laboratorul PCR trebuie să aibă două zone curate și murdare și ar trebui să includă următorul set minim de spații de lucru:

- zona „curată”:
- spațiu pentru recepție, înregistrarea, analiza și prelucrarea inițială a materialului;
- spațiu pentru izolarea acidului nucleic;
- spațiu pentru prepararea amestecurilor de reacție și amplificare
- zona „murdară”:
- spațiu pentru detectarea produselor de amplificare (la aplicarea metodelor de electroforeză);
- spațiu pentru secvențiere.

Diagrama schematică a laboratorului PCR al organizației este prezentată în imagine.

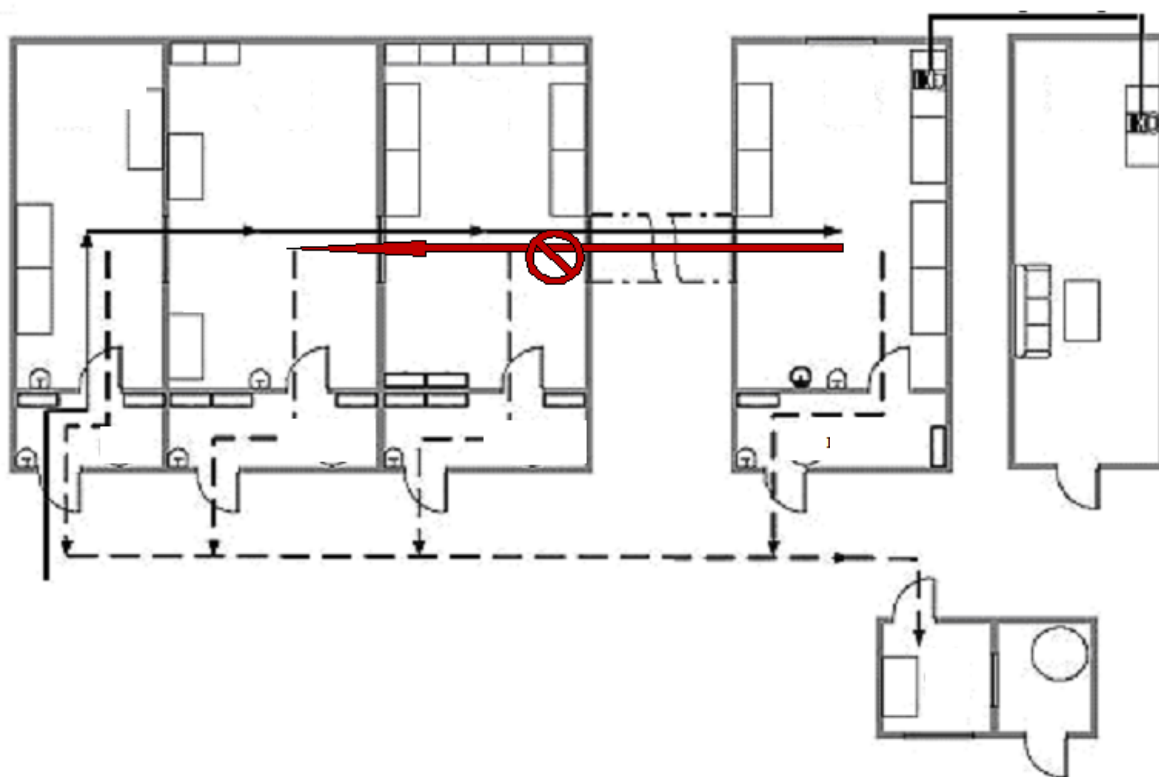


Figura 6.33 Diagrama schematică a organizării laboratorului PCR

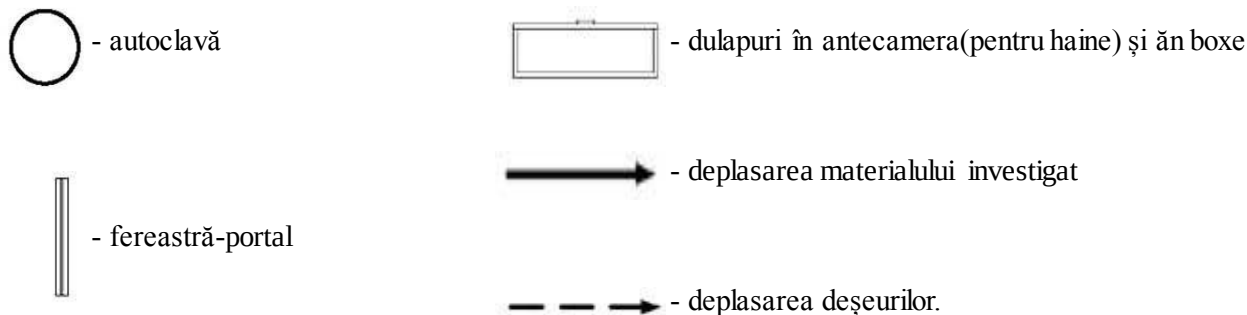
Legendă



- chiuvetă



- dispozitiv pentru drenarea apei după curățarea umedă a camerei



Spațiile de lucru ale laboratorului PCR trebuie să fie netrecătoare și proiectate în tipul de boxe cu antecamere. Suprafața fiecărui spațiu de lucru de laborator PCR nu trebuie să fie mai mică de 12 metri pătrați pe loc de muncă, inclusiv o anticameră de cel puțin 2 metri pătrați. La creșterea numărului de locuri de muncă, suprafața trebuie mărită cu 6 metri pătrați pentru fiecare loc de muncă, deci $S = 12 + 6 \times (n-1)$ metri pătrați, unde n este numărul de locuri de muncă.

Laboratorul PCR, care funcționează ca o structură independentă, trebuie să aibă în plus următoarele spații: încăperea pentru documente (camera personalului), biroul managerului laboratorului (poate fi combinat cu camera personalului); vestiare pentru personal; sufragerie; toaletă; dușuri pentru zonele „curate” și „murdare” ale laboratorului PCR separat, încăperi de utilități, spații pentru decontaminarea materialului și cameră cu autoclavă.

În spațiile de recepție, înregistrare, dezasamblare și tratare inițială a materialului au loc următoarele operații: pregătirea preliminară a probelor (sortare, etichetare, centrifugare etc.), depozitarea și inactivarea primară a reziduurilor de material biologic de către dezinfectanți. Aceste spații pot servi și pentru recepția și tratarea probelor pentru analize prin alte metode (bacteriologice, virologice, imunologice etc.) dacă este prevăzut un loc de muncă separat echipat pentru pregătirea probelor pentru analiza PCR.

Toate manipulările care sunt însoțite de riscul formării de aerosoli (agitare, centrifugare etc.), la tratarea materialului, sunt efectuate în boxe de siguranță de clasa II sau III (în funcție de grupul de patogenitate al microorganismului suspectat de a fi prezent în material în studiu).

Zona de izolare a acidului nucleic este plasat într-o cameră separată. Când se organizează un laborator PCR în interiorul unui laborator microbiologic activ, este permisă izolarea acidului nucleic în încăperile în care se efectuează studii serologice, iar în laboratoarele care lucrează cu agenți patogeni din grupele I-II această operație se poate face în încăperi destinate contaminării și autopsia animalelor. În aceste cazuri, o zonă de lucru este organizată în cameră pentru a izola acidul nucleic, în care este setată boxa de biosecuritate din clasa II sau III, în funcție de patogenitate. Numai echipamentele și obiectele necesare pentru izolarea acidului nucleic sunt amplasate în zona de lucru. Nu sunt permise alte lucrări în cutia de biosecuritate destinată izolării acidului nucleic.

Izolarea acidului nucleic din materialul clinic și probele prelevate din mediu se efectuează într-o boxă de siguranță diferită de cea a testelor alimentare pentru respectarea indicatorii de siguranță sau în cazul prezenței organismelor modificate genetic. În plus, este recomandabil să se diferențieze procesele de izolare a acidului nucleic de sânge/ser și alte tipuri de material clinice (în boxe de securitate separate sau la diferite ore, după pre-tratament).

Camera de amplificare trebuie să fie separată. Se utilizează pentru a prepara amestecul de reacție, pentru a introduce în eprubetă pentru ADN izolat PCR sau ADN complementar (în continuare - ADNc), pentru a efectua transcrierea inversă (în continuare - RT) a ARN și amplificarea ADN sau ADNc.

Pentru a prepara un amestec de reacție și pentru a introduce probe de acid nucleic în acesta, sunt setate boxe separate de PCR.

În laboratoarele PCR cu un număr mare al aceluiași tip de cercetări, o cameră separată este echipată pentru prepararea amestecurilor de reacție; este conectat funcțional printr-o poartă, cu camera pentru introducerea de probe izolate de acid nucleic și efectuarea amplificării.

Camera pentru detectarea produselor de amplificare este situat într-un spațiu separat, cât mai departe posibil de zona „curată” a laboratorului PCR. Sunt create toate condițiile pentru separarea personalului care lucrează în zona „curată” de personalul care lucrează în zona „murdară”. Pipetele și ustensilele destinate electroforezei nu trebuie utilizate pentru alte metode de cercetare.

Atunci când este utilizată în laboratorul PCR, metoda PCR cu detectarea fluorescenței, ca singură metodă, nu este setată o cameră separată pentru detectarea produselor de amplificare (Figura 6.34).

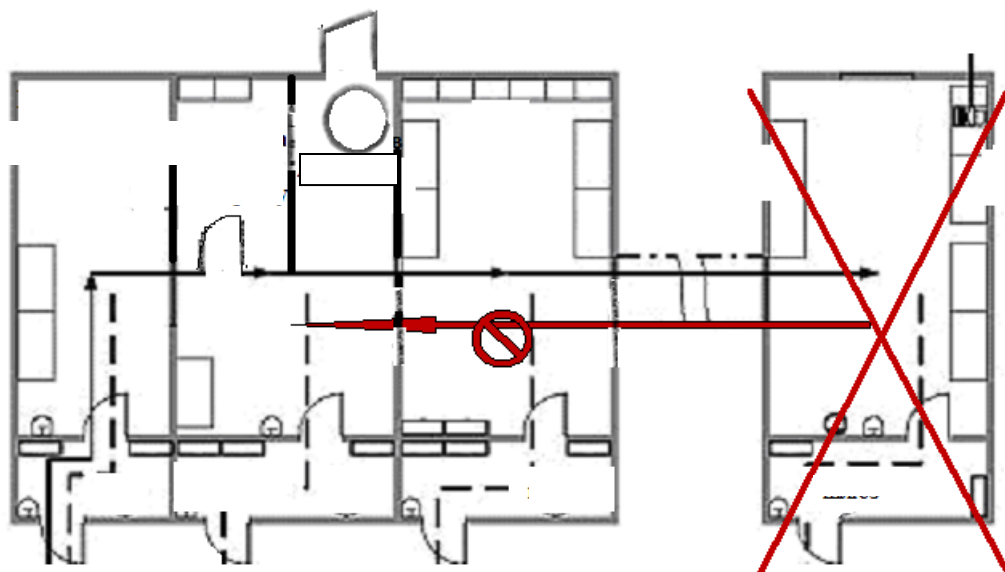


Figura 6.34 Diagrama schematică a unui laborator de PCR utilizând detectarea hibridizării-fluorescenței

Camera autoclavei poate fi comună cu laboratorul PCR și altă unități de laborator unde este amplasat laboratorul PCR și poate funcționa dacă sunt respectate cerințele de biosecuritate.

Pentru a studia secvența nucleotidelor din ADN (secvențierea), este necesar să se alocă o cameră separată - un secvențiator în zona „murdară” a laboratorului PCR, care ar trebui să fie amplasat în apropierea premisei de detectare a produselor de amplificare. Mărirea zonei de detecție a produselor de amplificare ar trebui prevăzută, deoarece aici trebuie amplasate următoarele echipamente suplimentare pentru secvențiere: centrifugă de masă cu rotoare de răcire și rotative, masă pentru curățarea și controlul calității produsului PCR obținut.

Spațiul secvențierului este aranjat în funcție de tipul boxei cu o anticameră, suprafața totală a acestuia nu trebuie să fie mai mică de 12 mp, inclusiv 10 mp dintr-o cameră de lucru. Anticamera este dotată cu alimentare cu apă și canalizare.

Pregătirea unei probe pentru încărcarea într-un secvențier constă în mai mulți pași de bază (și poate varia în funcție de tehnica utilizată):

- extracția acidului nucleic din materialul clinic se realizează în cameră pentru izolarea acidului nucleic ca și pentru PCR în format clasic;
- amplificarea secțiunii de acid nucleic, care acoperă zona de interes (dacă este ARN, este necesară etapa transcripției inverse pentru a obține ANDc.)Etapa ST pentru a obține ANDc), se efectuează în spațiul de amplificare;
- purificarea produsului amplificat obținut din reacția PCR (din primeri, deoxinucleotide reziduale, enzime, acid nucleic matricial, produse PCR nespecifice) se efectuează într-o cameră de foreză. Se utilizează următoarele metode de purificare: prin electroforeză în gel de agaroză; pe coloane; purificare enzimatică;
- evaluarea calității / cantității de ADN (urmată de diluare dacă este necesar) prin electroforeză cu agaroză sau prin spectrofotometrie se efectuează într-o cameră de foreză;
- analiza PCR cu utilizarea terminatorilor se efectuează într-un secvențier;
- purificarea suplimentară a produsului amplificat obținut după reacția cu terminatorii (din săruri, dideoxinucleotide excesive) se efectuează într-o cameră de foreză. Se utilizează următoarele metode de purificare: purificarea etanolului, purificarea izopropanolului, filtrarea pe gel, filtrarea pe membrană;
- resuspendarea probei (în formamidă sau apă) se efectuează într-o cameră de foreză;
- încărcarea probei în secvențier.

Deciziile de planificare și amplasarea echipamentelor ar trebui să asigure fluxul de material studiat prin procesul tehnologic. Schimbul de aer între zonele murdare și alte instalații PCR ar trebui să fie complet exclus.

Mișcarea materialului în direcția opusă este strict interzisă.

Laboratorul PCR trebuie să fie dotat cu apă, canalizare, electricitate și încălzire în conformitate cu legislația în vigoare. Toate instalațiile de laborator trebuie să fie prevăzute cu iluminare naturală și artificială adecvată. Fiecare cameră de lucru trebuie să aibă o chiuvetă manuală în anticameră.

Atunci când se construiesc laboratoare noi sau se recondiționează laboratoarele PCR existente, spațiile trebuie să fie echipate cu sisteme de evacuare a gazelor sau cu ventilație de evacuare. Diferența de presiune a aerului în spațiile de laborator PCR se realizează prin rate diferite de schimb de aer în acestea.

Rata schimbului de aer în incinta laboratorului PCR trebuie să respecte valorile prezentate în **tabelul**

6.1.

Tabelul 6.1 Rata schimbului de aer (m³/h) în incintele laboratoarelor PCR

Numele premisei	Debit: rata schimbului de aer, m ³ /h	Eșapament: rata schimbului de aer m ³ /h
Zona de recepție, înregistrare, revizuire și prelucrare inițială a biomaterialului	5	6
Zona izolării acizilor nucleici	5	6
Zona de pregătire a amestecurilor de reacție și efectuarea PCR	5	5
Zona pentru detectarea produselor de amplificare prin electroforeză	5	7

Ventilația de aprovizionare și de evacuare trebuie să fie echipată realizată separate pentru zonele „curate” și „murdare” (zone de foreză și ELIZA) din laboratorul PCR.

În absența unui sistem de ventilație, reducerea riscului de contaminare a probelor se realizează prin limitarea schimbului de aer între spațiile laboratorului PCR (separarea teritorială).

Dacă este necesar, în laboratorul PCR pot fi instalate aparate de aer condiționat, cu condiția să fie utilizate în timpul pauzelor tehnologice. Condiționerile trebuie oprite atunci când se lucrează cu materialele de testat.

Decorarea interioară a spațiilor este realizată în funcție de scopul funcțional al acestora. Suprafețele pereților, podelelor și tavanelor din încăperile de laborator ar trebui să fie netede, fără crăpături, ușor de manevrat și rezistente la detergenți și dezinfectanți. Podeaua nu trebuie să fie alunecoasă.

Ferestrele trebuie să fie închise bine. Pentru protecția locurilor de muncă de razele solare, se recomandă utilizarea filmelor de protecție împotriva luminii, care sunt rezistente la dezinfectanți, este interzisă utilizarea jaluzelelor în incintă.

Mobilierul de laborator trebuie să aibă acoperire rezistentă la detergenți și dezinfectanți. Suprafața meselor ar trebui să fie lipsită de fisuri și cusături.

Spațiile pentru toate etapele analizei PCR trebuie să fie echipate cu lămpi bactericide, care trebuie instalate la o rată de 2,5 W/m³. Se recomandă utilizarea suplimentară a unui radiator-recirculator bactericid UV mobil.

Laboratorul PCR ar trebui să fie echipat cu telefon, computer și echipamente de birou conectate la rețeaua electronică locală.

Laboratorul PCR este echipat cu mijloace de stingere a incendiilor.

6.4 Recomandări ICAR referitoare la laboratoarele acreditate. Cerințe mondiale pentru laboratoare, reguli de acreditare. Principiile de lucru ale laboratoarelor de referință

Studiile în biologia moleculară, în special în genomică, oferă informații noi despre animalele industriale. Pe de o parte, utilizarea informațiilor moleculare poate promova încrederea consumatorilor față de responsabilitatea monitorizării și controlului producției animale în etapele sale. Pe de altă parte, informațiile moleculare vor avea un impact pozitiv asupra realizării îmbunătățirii genetice a trăsăturilor animalelor prin utilizarea selecției genomice, a markerilor, a introgresiei genice, prevederea heterozisului, a verificării/aprovizionării genealogice și a stării genetice a purtătorului. În majoritatea cazurilor, beneficiile utilizării informațiilor moleculare prin evaluarea genomică se datorează preciziei crescute a valorii de reproducere a animalelor, reducerii intervalelor dintre generații și intensității crescute a reproducerii. Chiar și cu aceste progrese, este încă nevoie de cercetare și dezvoltare pentru a găsi o asociere între markerii genetici și trăsăturile utile. În plus, chiar și cu această includere a informațiilor genomice în schemele de selecție, înțelegerea acțiunii genelor, a interacțiunii genelor și a expresiei diferențiate a genelor este necesară pentru a

evita un efect colateral negativ. Cooperarea dintre industria zootehnică și știință este necesară pentru cercetarea cu succes a informațiilor genetice în populațiile de animale comerciale [ICAR Guidelines].

6.4.1 Markeri genetici

Markerii genetici sunt principalele instrumente moleculare ale geneticii. Din anii 1960, studiile grupelor de sânge au fost utilizate ca primii markeri ADN în creșterea animalelor, ulterior a fost lansat studiul microsateliților (SM), iar din anii 1990 până în prezent se folosește studiul polimorfismului cu un singur nucleotid (SNP). SNP și MS sunt părți polimorfe ale ADN-ului (alele) pentru un locus specific al unui anumit cromozom.

Microsateliții sunt secțiuni ale ADN-ului care conțin repetări de nucleotide tandem, de obicei dinucleotide sau trinucleotide. Aceste segmente sunt răspândite în întregul genom și sunt regiuni necodificatoare care nu sunt supuse unei presiuni selective. Microsateliții sunt utilizați în mod obișnuit pentru a stabili nivelul de afinitate genetică, pentru a determina polimorfisme inter- și intraspecifice, pentru a stabili originea diferitelor specii și populații în ansamblu.

Polimorfismul cu un singur nucleotid (SNP) este cel mai comun tip de variabilitate genetică: fiecare SNP reprezintă variabilitate într-un singur nucleotid. Există multe SNP-uri situate în genomul fiecărei specii de animale. Pentru genomics, SNP-urile cele mai informative sunt situate în mod tradițional fie în (a) o regiune de codificare în care diferite alele schimbă structura sau funcția proteinei codificate; sau (b) în regiunile necodificatoare implicate în funcția de reglare a genei. Pentru valorile de selecție genomică, SNP-urile situate în alte părți ale genomului sunt, de asemenea, informative, deoarece pot fi într-o relație dezechilibrată cu alele care provoacă modificări fenotipice.

Unul dintre avantaje constă în amplasarea complexelor cu procesare de date paralelă robustă pe SNP-uri, care pot testa mii sau sute de mii de SNP-uri, care este o metodă rentabilă și eficientă de verificare a unui număr mare de animale. În prezent, în cadrul acestei scheme, cele mai mari laboratoare de genotipare a animalelor pot trata mai mult de 100.000 de animale pe an. Astfel, prezența unor tablouri mari SNP facilitează căutarea mutațiilor care stau la baza variației genetice a trăsăturilor simple și complexe. De asemenea, accelerează detectarea trăsăturilor legate de gene sau părți ale genelor și viteza strategiilor de selecție genomică.

Termeni și definiții

Tabelul 6.2 Prezentare generală a termenilor folosiți în genetică moleculară, genomics și analize de origine.

Termen	Definiție
Confirmarea identificării animalelor	Este un proces în care markerii genomici pot fi utilizați pentru a dovedi identitatea unei anumite probe de țesut pentru un anumit animal.
genomics	Spectru de tehnologii care determină compoziția genetică a unui animal la nivel de genă și secvența ADN a genomului animalului.
Haplotip	Un grup de alele de markeri genetici care sunt moșteniți împreună de la un părinte. Markerii genetici sunt pe același cromozom și conțin de obicei o anumită lungime a segmentului pe acest cromozom.
Accreditare ICAR	Recunoașterea ICAR că organizația a furnizat suficiente dovezi că îndeplinește toate cerințele ICAR.
Imputare:	Proces de completare a genotipurilor lipsă a animalului bazat pe genealogii și alți markeri genetici. De obicei, acestea sunt utilizate pe baza imputării SNP și / sau a microsateliților din SNP.
MAF	Frecvența alelelor minore
Proгноza strămoșilor de pe	Proces prin care haplotipurile moștenite de la o femelă sunt folosite pentru

linia maternă	a prezice un mascul fezabil.
Microsateliți	Segmentele de ADN care conțin repetări de nucleotide tandem, de obicei cu o structură de dinucleotidică sau trinucleotidică. De asemenea, acestea sunt numite STR: repetări tandem scurte (short-tandem-repeats)
Analiza paternității	Analiza generală a genotipurilor legate de origine poate include screening-ul paternității, detectarea paternității și predicția descendenței materne.
Test de paternitate	Proces care permite examinarea potențialilor părinți, de obicei bărbați și uneori femei, pe baza potrivirii genotipului, are ca rezultat identificarea celui mai fezabil tată și/sau mamă
Verificarea paternității	Proces care permite examinarea genotipurilor părinților înregistrați (bărbați și/sau femei) pentru genotipul animalului pentru a determina dacă unul sau amândoi sunt părinți.
QTL (locus trăsături cantitative)	Locusul trăsăturilor cantitative. O parte a genomului care influențează trăsăturile cantitative (rata de creștere, greutate, lungime). Această zonă poate avea un efect mic <0,01% sau mare > 5% asupra fenotipului. Trăsătura cantitativă va avea o prevalență QTL semnificativă la nivelul genomului.
Verificarea paternității bărbatului	Similar testului de paternitate, dar bazat doar pe un studiu efectuat doar asupra unui bărbat înregistrat. Similar testului de paternitate, dar bazată pe un studiu realizat doar pe masculii înregistrați.
SNP	Polimorfism cu un singur nucleotid: alterarea unei singure baze azotate în secvența ADN.

6.4.2. Aplicarea tehnologiilor ADN

Definiția paternității și numirea părinților

Înainte de genotiparea prin markeri SNP, scopul comercial principal al utilizării markerilor genetici a fost determinarea paternității. În mod tradițional, testarea paternității se baza pe excluderea relației (și anume, bărbat sau femeie) atunci când genotipul animalului nu se potrivea cu genotipul prezis în pereche. Probabilitatea de a fi atribuit perechii potrivite de animale va depinde de un număr de markeri utilizați, de numărul de alele din locus, de frecvența nesemnificativă a alelelor din populație, de numărul de părinți și de numărul de copulații posibile. Societatea Internațională pentru Genetica Animalelor (www.isag.us) recomandă tablouri microsatelite specifice speciilor și markeri SNP, care pot fi accesate prin linkul dat în anexa 1. Pentru bovine, ICAR a dezvoltat kitul SNP Origin, ICAR554, care include tabloul ISAG recomandat și alte SNP-uri extrem de informative. Acest tablou permite testarea și detectarea precisă a paternității fără ipoteze de densitate mare. Astfel, tabloul ICAR554 poate fi distribuit țărilor și concurenților pentru analiza paternității, fără frica că alții îl pot utiliza pentru prezicerea valorilor de selecție genomică. ICAR și Centrul Interbull colaborează pentru a promova un serviciu internațional de partajare de genotipului numit GenoEx, care este descris mai târziu în capitolul 5, în special pentru schimbul de genotipuri SNP în scopul principal al analizei paternității.

Trasabilitatea și autentificarea produselor de origine animală oferite consumatorilor

Crizele multiple, inclusiv focarele de encefalopatie spongiformă bovină, au crescut cererea pentru aceste studii.

Markerii genetici sunt utilizați pentru autentificarea produselor de origine animală pentru etichetarea calității legate de locația geografică, rasele specifice sau încrucișările acestora. Acest lucru necesită stabilirea

standardelor moleculare sau a frecvențelor alelelor pentru fiecare rasă dintr-o specie. Multe informații provin din studii dedicate diversității genetice printre rase. Genele care pot fi selectate intens în fiecare populație sunt deosebit de interesante. Cu un set suficient de mare de SNP-uri și animale de referință de rasă pură genotipate, se poate prezice, de asemenea, cea mai probabilă compoziție de rasă a indivizilor.

Informații moleculare și genetice pentru schemele de markeri în reproducere

Trăsăturile cantitative sunt de obicei controlate de un număr mare de gene. Cu toate acestea, unele gene afectează uneori un număr mare de trăsături variabile. De exemplu, mușchiul dublu la bovine este legat de gena miostatina, componentele laptei la vacile de lapte, fertilitatea rasei Burul și fenomenul de poliovulație sunt legate de gena DGAT1. Deoarece genotipul animalului nu se schimbă de-a lungul vieții, utilizarea informațiilor ADN-ului prin identificarea markerilor legați de QTL cu influență asupra trăsăturilor productive sau identificarea genei în sine împreună cu varianta cauzală este de mare interes. Cu toate acestea, cu trăsături complexe, există o nevoie crescândă de un set suficient de mare de markeri pentru a include informații moleculare pentru deciziile de selecție. Includerea informațiilor genomice este un criteriu important de selecție pentru trăsăturile a căror măsurare este dificilă și costisitoare și / sau consumatoare de timp. Până în 2018, au fost identificate > 116.000 de bovine, > 10.000 de pui, > 28.000 de porci și > 2000 de oi, ale căror locusuri cantitative sunt legate de trăsături importante din punct de vedere economic precum sănătatea, carcasa corpului, productivitatea laptei, fertilitatea și exteriorul. Baza de date AnimalQTLdb, găzduită de Programul Național de Cercetare a Genomului Animalului, conține informații actualizate despre date QTL pentru bovine, pui, cai, porci, păștrăvi și ovine.

Pentru trăsături complexe și importante din punct de vedere economic, markerii genetici și selecția genomică oferă oportunități semnificative de selecție. În general, markerii genetici și genomica joacă un rol major în reproducere. Genomica ne poate permite, de asemenea, să creștem intensitatea selecției, deoarece putem prezice valoarea selecției genomice pentru un număr mare de animale și astfel putem avea mai mulți candidați pentru selecție.

Rezistența la boli și defecte genetice

Un alt grup de caracteristici cu potențial ridicat pentru utilizarea datelor genomice și moleculare sunt cele asociate cu rezistența la boli. Există o serie de boli multifactoriale sau complexe care rezultă din interacțiunea genomului animalelor cu componentele mediului. Simptomele rezistenței la boli sunt unele dintre cele mai dificil de inclus în programele de îmbunătățire genetică, deoarece necesită o evaluare calitativă a stării bolii animalului și un control sistematic al conținutului lui sau a anturajului, pentru a identifica efectele mediului asupra sănătății animalului. Prin urmare, dacă genele sau markerii genetici asociați cu rezistența sunt selectați corect, animalele rezistente vor putea fi selectate pe baza informațiilor lor genomice. Pentru multe boli, identificarea genelor asociate rezistenței necesită condiții experimentale. În prezent, analiza genetică este utilizată pentru a identifica purtătorii heterozigoți ai bolilor genetice cauzate de gene recesive unice. Exemple de bovine de lapte includ: curbura complexă a coloanei vertebrale (CVM), brachyspina (BY), deficiența de colesterol (CD) și genele sau haplotipurile care cauzează pierderea embrionilor sau nașterea unui pui mort la diferite rase de lapte. În 2018, OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals) a enumerat mai mult de 770 de semne sau defecte genetice la animale. Includerea acestor alele cauzale sau haplotipuri înrudite în programul de reproducere va permite producătorilor să-și minimizeze riscul de defecte genetice, maximizând progresul genetic cu trăsături benefice.

6.4.3 Aspecte tehnice

Se recomandă efectuarea de probe sistematice de ADN la mai multe populații de animale. ADN-ul poate fi izolat de orice celulă nucleară din corp. Acum sunt disponibile protocoale de extracție a ADN-ului din sânge (globule albe), material seminal, salivă (celule epiteliale), foliculi de păr, mușchi, piele, viscere (cum ar fi ficatul, splina etc.). Eritrocitele pot fi folosite și în creșterea păsărilor, deoarece păsările păstrează nuclearitatea celulelor, dar la fel ca pentru majoritatea celorlalte specii de animale nu pot fi folosite. O cantitate mică de țesut este necesară pentru analiza de rutină a ADN-ului. Cu toate acestea, dacă este necesară utilizarea repetată a ADN-ului individului (secvențierea completă a genomului, trasabilitatea (verificarea), verificarea validărilor alelelor...), costurile stocării, extracției, calității și cantității ADN, obținute prin diferite protocoale, ar trebui să fie atent analizat și optimizat. Metodele de prelevare acceptate în mod obișnuit sunt cele care includ foliculii de păr, probe de țesut (adesea obținute cu un perforator din ureche) într-un recipient sigilat, pete de sânge pe hârtie de filtru și spălare nazală.

Este posibil să se organizeze o bază de date centralizată legată de utilizarea principală a informațiilor genetice:

- Verificarea, numirea și/sau detectarea paternității;
- Trasabilitatea produselor din carne;
- Identificarea rasei sau diversitatea rasei;
- Trăsături calitative și cantitative.

Tabelele bazei de date pot conține:

- Identificarea animalului cu legături către toate informațiile despre animal și rudele acestuia;
- Numărul de markeri genetici (n);
- Numele standard al fiecărui marker i (unde $i = 1, n$);
- Numărul markerului potrivit, cum ar fi dbSNP ID;
- Alele pentru markerul i ;
- Localizarea genomică a markerului i ;
- Impactul alelei fără referință asupra proteinelor
- Manifestarea fenotipică a alelei
- Asocierea cu alte semne.

Una dintre cele mai importante părți ale unei baze de date genomice mari este asigurarea că genotipul asociat unui animal individual aparține cu adevărat acelui animal. Majoritatea bazelor de date mari ale genomului animalelor se ocupă de date SNP, astfel încât această secțiune se va concentra asupra controlului calității genomice. Sunt necesare atât controlul calității probelor, cât și sistemul de control al calității al SNP, deci este recomandabil să se dezvolte un sistem pentru acestea din timp.

Pentru standardizarea legată de nomenclatura genelor sau loci, informațiile sunt furnizate pe link-ul: [https://www.genenames.org/about/guidelines/#!/#nume de gene](https://www.genenames.org/about/guidelines/#!/#nume%20de%20gene) și <http://varnomen.hgvs.org/>

Servicii ICAR legate de tehnologiile ADN

Începând din 2018, ICAR oferă trei servicii legate de ADN, fiecare dintre acestea este legat de analiza paternității într-o formă sau alta, așa cum este prezentat mai jos.

Acreditarea ICAR pentru laboratoarele de genotipare:

- Testarea calității serviciilor de genotipare a ADN utilizând testul circular ISAG (Societatea Internațională pentru Genetica Animalelor);
 - determinarea paternității pe bază de microsateliți;
 - acreditare pentru centre de interpretare a ADN-ului;
 - determinarea originii și/sau a paternității;
 - cooperare cu Centrul Interbull;
 - schimbul de markeri SNP pentru verificare și/sau determinarea originii.
 - acreditarea centrelor de identificare a ADN-ului.

6.4.4 Acreditarea laboratoarelor care furnizează servicii de genotipare a ADN-ului

Având în vedere necesitatea unor standarde de calitate ridicată în toate cazurile de utilizare a datelor moleculare, ICAR a oferit de câțiva ani un serviciu de acreditare bazat pe anumite cerințe minime pentru laboratoarele care furnizează servicii de genotipare a ADN-ului. Principalele cerințe ale acestei acreditări includ confirmarea standardelor interne minime de management al asigurării calității și participarea la testul circular internațional, dezvoltat și propus de Societatea Internațională de Genetică Animală (ISAG).

În plus, astfel de laboratoare au analizat în general genotipurile obținute pentru a furniza analize de microsateliți și/sau SNP pentru definirea paternității, inclusiv verificarea originii sau confirmarea identificării animalelor. Serviciul de acreditare ICAR a recunoscut anterior laboratoarele de genotipare ca organizații acreditate care furnizează analize de paternitate fără teste suplimentare pentru precizia tehnică. Din 2018, lansarea Serviciului de acreditare la centrele ADN pentru interpretarea datelor ADN utilizând analiza paternității SNP a înlocuit acreditarea anterioară pentru verificarea bazată pe SNP. Sunt planificate proceduri similare pentru introducerea acreditării analizei de paternitate pe bază de microsateliți în ICAR, dar procesul actual de acreditare pentru laboratoarele de genotipare va fi încă în vigoare.

Următoarele linii directoare de acreditare sunt prevăzute pentru genotiparea microsateliților și SNP a bovinelor. Cerințele minime pentru alte specii și alte analize ADN pot fi determinate în viitor.

Domeniu de aplicare

Aceste linii directoare se referă la acreditarea ICAR a laboratoarelor de genotipare care analizează probe biologice de bovine folosind microsateliți și/sau genotipare SNP, care pot fi apoi utilizate în continuare pentru a analiza paternitatea, imputarea genotipului, valorile de selecție genomică și alte activități legate de strategiile de selecție genomică. Acest proces de acreditare include, de asemenea, testarea paternității cu microsateliți. Pentru acreditarea ICAR legată de verificarea paternității cu SNP, laboratoarele de genotipare trebuie să depună cererea lor la ICAR și la centrele de interpretare ADN pentru acreditarea paralelă, așa cum este descris mai jos.

Norme ICAR și recomandări pentru acreditarea laboratoarelor de genotipare

Procesul de acreditare include următorii pași:

- Cerere de acreditare
- Plata taxelor corespunzătoare
- Revizuirea declarației
- Atribuirea acreditării

Acreditarea laboratorului

În prezent, acreditarea ISO17025 sau ISO9001 este necesară pentru acreditarea cercetărilor pe baza datelor de analiză a microsateliților (STR). Standardul ICAR, care acționează din 2020, necesită acreditarea laboratoarelor de genotipare conform ISO17025 sau normă echivalentă, pentru a asigura calitatea sistemelor de management intern, care este o cerință obligatorie pentru acreditarea bazată pe SNP. În plus, certificarea ISO9001 va fi valabilă începând cu 2020 și numai ISO17025 sau o normă echivalentă va fi un nivel adecvat de acreditare pentru a asigura calitatea sistemelor de management intern pentru acreditarea cu microsatelit (STR).

Participarea și prezentarea testului circular

ISAG organizează un test circular internațional (comparativ) de laboratoare atât pentru genotiparea cu microsateliți, cât și cu SNP. Participarea la ISAG și prezentarea acestor teste circulare trebuie să fie deschise și certificate. Solicitanții trebuie, de asemenea, să semneze un acord care să permită ISAG să dezvăluie rezultatele testelor lor circulare pentru ICAR. Participarea la cel puțin două teste circulare ISAG este o cerință minimă. Pentru testul circular microsatelit ISAG, laboratoarele de genotipare trebuie să furnizeze informații despre 12 seturi de microsateliți ISAG. Comitetul de experți va stabili limitele pentru fiecare test circular, ținând seama în mod corespunzător de structura testului și de performanța medie a laboratoarelor la testul circular pe an. Numai acele laboratoare care ating gradul 1 în testul circular anual ISAG primesc automat acreditarea ICAR ca laboratoare de genotipare, iar acreditarea laboratoarelor de nivel inferior rămâne la discreția comitetului de experți.

Markeri de microsateliți. Trebuie indicate numele tuturor microsateliților prelevați de la toate animalele (setul de markeri I) și cei fără origine (setul de markeri II) și de la toate animalele genotipate în ultimii doi ani. Cerința minimă pentru schimbul internațional este un set complet de 12 markeri oficiali de microsateliți ISAG. Pentru a asigura o experiență suficientă de laborator, analiza a 500 de animale pe an este stabilită de cerința minimă de certificare pentru controlul microsateliților.

Probabilitatea excluderii (2 părinți sau 1 părinte) a fiecărui marker și a seturilor complete de markeri ar trebui să fie calculate și furnizate în cerere. Tipul populației și numărul de animale (minimum 150) utilizate pentru calcule trebuie descrise. ICAR recomandă utilizarea rasei Holstein ca grup de referință. Dar Comitetul de experți ICAR va lua o decizie privind acreditarea pe baza analizei populației.

Markeri SNP. Este necesar să se indice toate genotipurile SNP la animalele din ambele grupuri de markeri și la toate animalele genotipate în cel puțin ultimii doi ani. Cerința minimă este de a utiliza cel puțin 95 de SNP-uri din kitul recomandat de ISAG pentru toate genotipurile animalelor.

Nomenclatura markerilor

Nomenclatura markerilor trebuie descrisă. Nomenclatura ISAG este necesară pentru seturile oficiale de 12 markere, precum și pentru seturile de markeri SNP.

Acreditarea organizațiilor care efectuează analize de paternitate bazate pe SNP

Odată cu apariția genotipării SNP, funcția genotipării ADN ca activitate de laborator poate fi separată de funcțiile de verificare și determinare a paternității. Prin urmare, ICAR a stabilit acreditarea separată pentru aplicarea rezultatelor de genotipare bazate pe SNP, care pot fi realizate de laboratoare, asociații de rase, centre de evaluare genetică și orice alte organizații implicate în verificarea paternității și / sau procesarea datelor genotipului SNP.

Furnizorii de servicii pot folosi diferite laboratoare pentru diferite rase sau specii. Având în vedere importanța identificării animalelor și a verificării paternității pentru înregistrarea animalelor, ICAR a decis să stabilească cerințe minime pentru utilizarea rezultatelor genotipării ADN și a altor informații pentru:

- Controlați verificarea paternității,
- Definiți părinții,
- Confirmați identificarea animalelor.

Scopul acestor recomandări este de a crea o bază pentru acreditarea proceselor utilizate de organizațiile care utilizează genotipuri SNP de bovine. Cerințele minime pentru alte specii și alte analize ADN pot fi determinate în viitor.

Domeniu de aplicare

Aceste orientări abordează acreditarea ICAR a organizațiilor care utilizează rezultatele testelor bazate pe SNP pentru a analiza paternitatea la bovine, inclusiv verificarea paternității, detectarea originii și/sau confirmarea identificării animalelor.

6.5. Metode de prelevare a probelor medii de material biologic

6.5.1 Tehnica de prelevare a probelor medii și metode de stocare pe termen scurt sau lung pentru determinarea indicilor de calitate

Procesul analitic complet poate fi împărțit în trei etape succesive: prelevarea, pregătirea probei pentru analiză și analiza probei, care sunt descrise în detaliu în literatura de specialitate [Senchenko BS, 2001; Ermolaev AP „, 1998; Zhitenko PV, 2001; Pronin VV, 2012].

Metoda de executare. O probă medie de lapte selectată metodic corect este una dintre cele mai importante condiții pentru determinarea corectă a indicatorilor săi de calitate. Poate fi prelevat direct la fermă, în camera de muls, la punctele de primire a laptelui etc. Înainte de a preleva probe medii de la animale sau turme individuale, trebuie să vă informați despre productivitatea acestora, regimul zilnic la fermă și să pregătiți un spațiu de depozitare pentru sticle (recipiente) în timpul prelevării [Senchenko BS].

Dacă în ziua prelevării, modul de hrănire sau regimul zilnic sunt perturbate, prelevarea nu se efectuează. În timpul determinării indicilor de calitate a laptelui de la fiecare vacă, acestea ar trebui mulse de aceeași mulgătoare. Pentru prelevarea probelor medii, nu contează de la ce muls se începe; principalul lucru este să obțineți porții de lapte din toate mulsurile. Desigur, dacă testele vor fi efectuate imediat (2-2,5 ore mai târziu) după prelevare, este mai convenabil să începeți cu mulsul de la jumătatea zilei (la muls de trei ori) sau

seara (la muls de două ori). Dacă turma este mare și nu poate fi prelevată dintr-o singură dată, aceasta este împărțită în mai multe grupuri și se întocmește un program pentru prelevarea probelor.

Conform cerințelor, un volum de probă de aproximativ $0,5 \text{ dm}^3$ (l) este luat pentru analiza completă. Dacă se determină doar aciditatea și conținutul de grăsime, un volum de probă de 50 cm^3 e suficient.

Probele trebuie introduse în sticle (recipiente) curate și uscate, cu etichete și dopuri de plută. Pentru testarea microbiologică, probele sunt prelevate în tuburi, sticle sau flacoane sterile și închise cu dopuri de bumbac.

Atunci când se prelevează probe medii pentru analiză, proporționalitatea trebuie menținută în funcție de randamentul laptelui sau de cantitatea de lapte din vas. Proporționalitatea este reglată prin setarea multiplicității (1, 2, 3), care este respectată în timpul prelevării de la toate vasele sau randamentele laptelui în timpul zilei de la fiecare animal sau prin calcularea cantității de cm^3 de lapte care trebuie prelevat din fiecare kilogram (litru) din vas.

Deoarece grăsimea din lapte crește la suprafață destul de repede, laptele trebuie amestecat bine înainte de prelevare. După deschiderea baloanelor sau compartimentelor rezervorului de lapte, grăsimea din lapte care s-a acumulat pe capace și pereți este îndepărtată cu o spatulă și transferată în aceleași baloane sau rezervoare și este atent cufundată de sus în jos de 8-10 ori, amestecată cu un tel. În rezervoarele mașinilor, laptele se agită timp de 3-4 minute.

Când se prelevează vase de aceeași formă (Figura 5) (contoare de lapte, găleți, baloane), sunt utilizate cel mai frecvent tuburi de colectare a probelor din metal sau plastic (samplere) cu un diametru interior de 9 mm. Tuburile metalice, cupele și telurile utilizate în acest scop trebuie acoperite cu un aliaj anticoroziv. Este interzisă utilizarea pentru prelevare a instrumentelor ruginite, contaminate și stricate [Ermolaev AP, 1998].

Înainte de prelevare, tubul de prelevare trebuie clătit preventiv cu laptele din care este prelevată proba. Pentru a face acest lucru, tubul este cufundat încet și îndepărtat din lapte fără a-și închide capătul superior, iar cupele sunt pur și simplu clătite în lapte. După amestecarea laptelui, tubul este cufundat încet la fundul vasului, astfel încât nivelul de lapte din tub și vas să fie același tot timpul. Tubul este umplut cu lapte la același nivel ca în vas (Figura 6.35). Deschiderea superioară este apoi închisă cu degetul mare și laptele este transferat în sticle (recipiente) uscate și curate, cu etichete care indică numele animalului sau numele fermei, echipa de lucru, numele mulgătorului și data prelevării. Sticlele sunt închise cu dopuri și depozitate în cutii speciale.

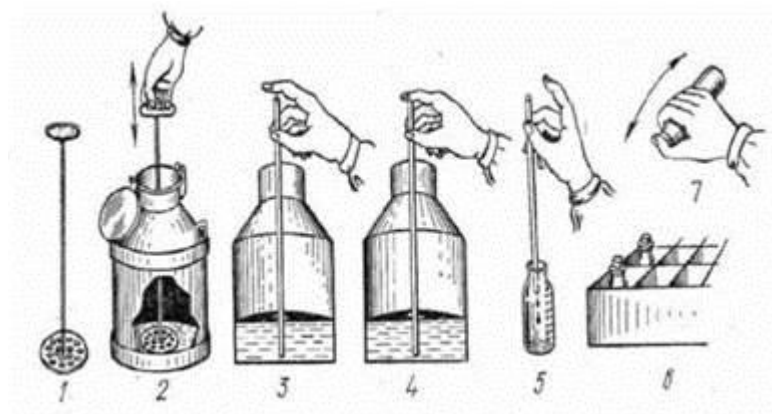


Figura 6.35 Ordinea prelevării probelor de lapte mediu

1- agitator de lapte; 2 - malaxor de lapte; 3 - conectarea tubului la lapte pentru prelevare; 4 - poziția degetului arătător înainte de transferul probei; 5 - turnarea laptelui în sticla de probă; 6 - cutie pentru depozitarea probelor de lapte; 7 - amestecarea probei medii de lapte înainte de efectuarea analizelor.

Dacă nu sunt tuburi sau laptele este în recipiente diferite, atunci proba medie este luată prin măsurare cu un cilindru de măsurare sau cupe (cană), după determinarea proporționalității prelevării prin calcul

preliminar. De exemplu, trei recipiente conțin 215, 350 și 520 sau 1085 kg de lapte. Pentru analiza completă este necesar să se preleveze 0,5 dm³ de lapte, sau din fiecare kilogram 500: 1085 = 0,46 cm³. Prin urmare, 99 cm³ trebuie prelevat din primul recipient, 161 cm³ din cel de-al doilea și 240 cm³ din al treilea. Valorile mici obținute prin calcule sunt rotunjite pentru comoditate. Când se prelevează lapte de la fiecare vacă în condiții de muls, este posibil să se utilizeze releul de verificare a tensiunii 1 sau 1A pe sala de muls sau în linia de lapte.

Sticlele cu probe sunt depozitate într-o cutie specială cu prize. Periodic, conținutul sticlelor este agitat pentru a nu împiedica crearea de cremă. Dacă probele urmează să fie transportate, sticlele trebuie umplute doar cu 3/4 din volumul lor. Sticlele nu trebuie umplute complet cu lapte, deoarece conținutul lor nu poate fi amestecat înainte de analiză.

În cazul prelevării simultane pentru studii microbiologice, fizico-chimice și organoleptice, se prelevează mai întâi probe pentru studii microbiologice, folosind echipamente și recipiente sterile.

Probele conservate depozitate mult timp trebuie, de asemenea, încălzite la 35-40°C, amestecate bine și răcite la 20 ± 2°C. În acest scop, probele sunt introduse mai întâi într-o baie cu apă la 46-50°C, și răcit în apă la 12-15°C [Zhitenko PV, 2001; Pronin VV].

6.5.2 Prelevarea de probe pentru testarea ADN-ului

Prelevarea biomaterialelor pentru testarea markerilor ADN este efectuată de medicii veterinari care lucrează în ferme sau invitați de proprietarii animalelor.

Probele de ADN pot fi obținute din orice celulă nucleară din corp. Acum sunt disponibile protocoale de extracție a ADN-ului pentru sânge (leucocite), material seminal, salivă (celule epiteliale), foliculi de păr, mușchi, piele, viscere (cum ar fi ficatul, splina etc.). Eritrocitele pot fi folosite și pentru păsări, deoarece rețin un corp nuclear, în timp ce la majoritatea celorlalte specii acesta este absent în celulele eritrocitelor. O cantitate mică de țesut este necesară pentru analiza de rutină a ADN-ului. Cu toate acestea, dacă există o utilizare multiplă a ADN-ului uman (secvențierea întregului genom, trasabilitatea, probabilitățile alelelor patogene), atunci costurile de stocare a ADN-ului, costurile de producție, calitatea și cantitatea obținute prin diferite protocoale ar trebui studiate cu atenție și optimizate. Metodele obișnuite de colectare includ foliculii de păr, specimene de țesut (adesea urechi) într-un recipient închis, pete de sânge pe hârtie de filtru și tampoane nazale.

Prelevarea de sânge

Se efectuează într-un anticoagulant sau pe un tampon de tifon. Dacă se utilizează un tampon de tifon, acesta este impregnat cu sânge prelevat și uscat la aer. Pentru analiza ADN, sunt suficienți 0,5 ml de sânge lichid sau pete de sânge pe un tampon de tifon de 5x5 mm.

Condiții de stocare a sângelui:

- lichid - 5-7 zile la 4°C sau câteva luni la -20°C;
- uscat - într-o pungă uscată închisă ermetic timp de până la 5 ani la temperatura camerei sau la frigider la 4°C.

Sângele uscat poate fi trimis prin poștă la firma de control genetic (laborator).

Prelevarea și depozitarea spermei

Se prelevează 0,5-2 ml de material seminal nativ. Sperma pentru izolarea ADN-ului este depozitată în condiții similare cu depozitarea sângelui lichid.

Prelevarea de probe de materiale pentru biopsie

Materialele pentru biopsie pot fi de origine diferită. Pentru analiza ADN-ului pot fi folosite știfturi pentru urechi care rămân la marcarea animalelor. Durata de păstrare a bucăților de 5x5 mm la 4°C este de 3-4 zile, în stare înghețată (-20°C și mai jos) este nelimitată.

În timpul prelevării, fiecare probă este etichetată cu un număr individual. Actul privind prelevarea este editat în formă gratuită; ar trebui să conțină numere complete ale animalelor și numerele corespunzătoare de probe.

6.5.3 Principii de bază pentru formarea băncilor de materiale biologice

Necesitatea conservării resurselor genetice ale animalelor de fermă

Rasele locale de animale domestice nu pot concura cu rasele clasice specializate în ceea ce privește calitățile productive de bază, dar sunt caracterizate de caracteristici extrem de valoroase (puterea de constituție, durata utilizării productive, rezistența la boli infecțioase, reproductibilitate ridicată, conținut ridicat de grăsimi și proteine în lapte, efect genetic ridicat la încrucișare etc.). Deci, ele rămân purtători de calități ereditare valoroase, fără de care este imposibilă îmbunătățirea genetică suplimentară a animalelor. Odată cu dispariția raselor, genofondul dispare, ceea ce restrânge varietatea trăsăturilor utile din punct de vedere economic și, astfel, restricționează reproducerea. Prin urmare, conservarea acestui patrimoniu național este o preocupare importantă a statului.

Salvarea rezervelor de gene ale populațiilor este o sarcină dificilă și legată de costurile economice. Prin urmare, este necesar să se determine ce rase ar trebui păstrate, să se elaboreze criterii de selecție a raselor, forme, metode și numere de gameți, embrioni care trebuie păstrați și modul de utilizare al lor pentru reproducerea viitoare.

Una dintre sarcinile importante de conservare și utilizare eficientă a genofondului raselor este realizarea inventarierii acestora și crearea bazei de date a diversității genetice și a caracteristicilor specifice ale raselor, determinarea printre ele a raselor genetice valoroase și identificarea utilizării eficiente a lor în programe de reproducere.

Evaluarea obiectivă a diversității genofondului și a stării genetice a raselor de animale domestice este prevăzută a fi făcută utilizând polimorfismului antigenelor eritrocitare, proteinelor serice din sânge, enzimelor tisulare, structurii proteinelor, analizei citogenetice.

Metode de conservare a genofondului raselor

Sunt prevăzute următoarele metode de conservare a genofondului raselor:

- reproducerea pură a colecțiilor de populații „pure” de animale de fermă, atât domestice, cât și străine, sub formă de genofonduri închise, ferme relict și rezerve de animale;
- stocarea pe termen lung a spermei congelate, ovocitelor, embrionilor în bănci genetice;
- conservarea germoplasmei și a ADN-ului ca purtător al codificării variațiilor genetice.

Forme de conservare a speciilor și raselor de animale de fermă locale și pe cale de dispariție

Subiecții conservării genofondului animalelor sunt turmele de genofond, fermele de genofond, rezervele, colecțiile, grădinile zoologice și criobăncile de resurse genetice.

O formă rațională de conservare a genofondului raselor este conservarea animalelor în turme de genofond (la cel puțin 2-3 ferme).

- turmă de genofond: un grup de animale de rasă pură alocate pentru conservarea genofondului unei anumite rase de animale.

- fermă de genofond: o fermă separată la o unitate economică în care sunt crescute animale de rasă de toate sexele și grupele de vârstă ale unei singure rase.

- fermă de genofond, rezervă: crește animale de una sau mai multe rase în diferite ferme de genofond pentru reproducerea lor de rasă pură.

- criobancă de resurse genetice.

Sarcina principală a criobăncii de resurse genetice a animalelor, spre deosebire de băncile existente la întreprinderile de reproducere, este crearea și stocarea pe termen lung a rezervelor necesare de material seminal, embrioni, ovocite ale animalelor cu valoare genetică specială din colecțiile locale, domestice pe cale de dispariție și colecții mici de rase străine specializate și utilizarea acestora la:

- rezolvarea celor mai importante sarcini de reproducere (reproducerea de rase noi, tipuri, încrucișări, linii, menținerea și îmbunătățirea structurii genealogice, consolidarea, îmbunătățirea radicală a celor existente);
- asigurarea creșterii de animale de rasă pură, menținerea diversității genetice în populațiile închise de turme de genofond, ferme, colecționari de rase aborigene pe cale de dispariție și locale și reproducători de rase specializate;
- pentru reproducerea și multiplicarea viitoare a animalelor de rasă pură care au dispărut, dacă este necesar, pe animalele de reproducere ale altei rase.

Criobanca de resurse genetice este o unitate de cercetare și producție și este creată la centrele de cercetare care efectuează evaluarea genofondului, determină nevoia, forma și amploarea conservării și utilizării sale pentru fiecare rasă. Cumpărarea materialului genetic se efectuează din bugetul statului.

6.6 Metode de cercetare de laborator la analiza citogenetică

6.6.1 Descrierea metodelor de lucru pentru pre parare a probelor și analiza acestora cu microscopul

Pentru a detecta anomalii genetice, compania de control genetic (laborator) asigură controlul citogenetic și testarea animalelor prin markeri ADN.

Controlul citogenetic este un control al stării aparatului cromozomial al animalului, integritatea acestuia, prezența tulburărilor structurale și cantitative ale cariotipului.

Scopul controlului citogenetic este de a determina absența sau prezența modificărilor și tulburărilor cantitative și calitative cromozomiale, cromatide, genomice.

Materialul pentru producerea de exemplare cromozomiale la bovine, ovine, caprine și cai este sângele extras din vena jugulară a animalului; la porci sângele din vena urechii este utilizat în acest scop.

Obținerea de probe citogenetice

Pentru prelevarea de sânge de la animale și la cultivarea celulelor se utilizează flacoane medicale cu un volum de 30 ml, cu capace cu șurub din plastic, flacoane cu penicilină, sigilii sterile.

Pregătirea flacoanelor se efectuează în următoarea succesiune:

1. flacoanele sunt spălate cu apă fierbinte folosind praf de spălat, fosfat trisodic sau un amestec de 1 parte de trilon B (hd), 2 părți de hidroxid de sodiu și 10 litri de apă distilată;
2. sunt clătite bine mai întâi cu apă fierbinte curgătoare, apoi cu apă distilată și lăsate la înmuiat în apă distilată peste noapte;
3. uscate la cuptor (110°C);
4. fierte timp de 2 ore;
5. uscate;
6. închise cu dopuri din bumbac-tifon;
7. învelite cu pergament;
8. menținute la o temperatură de 110°C timp de aproximativ 2 ore;
9. flacoanele tratate sunt închise cu capace de penicilină sterile, curate, apoi sunt acoperite cu capace de plastic cu o mică deschidere prin care componentele necesare sunt injectate cu un ac și seringă.

Configurarea și cultivarea culturii se fac într-o cutie sterilă. În absența cutiei, aceste operații se efectuează într-o cameră curată normală, care este iradiată cu lămpi de perete bactericide timp de 2 ore înainte de a începe lucrul.

Configurarea culturii limfocitelor din sângele periferic

0,5 ml de sânge și mediu nutritiv din următoarea compoziție sunt injectate în flacoane:

5 ml de mediu 199 (Earle, Eagle) sau RPMI 1640;

1 ml ser inactivat de sânge bovin sau uman din grupa IV (serul este inactivat într-o baie de apă la 56°C timp de 1 oră);

0,01 ml PHA "P" sau 0,1 ml PHA "M" sau concanavalin A;

antibiotice la o concentrație de 100 unități de penicilină și 100 μg de streptomycină sau 0,001 ml de gentamicină la 1 mediu.

Suspensia este amestecată, plasată într-un termostat la 37°C timp de 48 de ore.

Cu două ore înainte de îndepărtarea culturii, colchicina este introdusă în fiecare flacon la o concentrație finală de 0,05 μg / ml. Licoarea mamă de colchicină se prepară în apă distilată (10 mg de colchicină uscată la 100 ml de apă) și se păstrează la 4°C timp de 1-2 luni. Pentru a obține specimene îmbogățite cu celule în etapele timpurii ale meta- și prometafazei, cu 2 ore înainte de fixare (posibil simultan cu colchicina), se adaugă o soluție de bromură de etidiu la o concentrație finală de 5-10 μg / ml. Din această etapă, este permis lucrul în condiții nesterile.

Îndepărtarea culturii limfocitelor din sângele periferic și prepararea cromozomilor metafazici

La sfârșitul cultivării:

1. Conținutul flacoanelor este turnat în tuburi de centrifugare și centrifugat timp de 10-20 min la 1000 de rotații/minut (modul de centrifugare la toate tratamentele ulterioare este același);
2. Fluidul supernatant este aspirat sau drenat ușor;
3. Precipitatul este agitat, soluția hipotonică (0,5%) KCl încălzită la 37°C este adăugată în eprubetă;
4. Suspensia celulară se amestecă bine folosind o pipetă pasteur din cauciuc;
5. Se incubează 10 minute la 37°C;
6. Centrifugată;
7. Se elimină lichidul supernatant;

8. Suspensia celulară este fixată într-un fixator proaspăt preparat și răcit (alcool metilic, acid acetic glacial într-un raport de 3: 1);
9. Suspensia celulară fixată se lasă la frigider la 4°C pentru o perioadă de la 20 minute la 20 de ore;
10. Suspensia celulară este adusă prin 2-3 schimbări de fixator;
11. Suspensia celulară obținută este dizolvată într-o cantitate mică de fixator proaspăt până la densitatea dorită;
12. Se pun 3-4 picături de suspensie celulară pe sticlă degresată, specimenul este aprins sau uscat cu un curent fierbinte de aer.

Calitatea probei obținute este evaluată la microscop. Dispersia cromozomilor este monitorizată într-un câmp microscop întunecat. Dacă împrăștierea cromozomilor este insuficientă, suspensia este adusă printr-o altă schimbare a fixatorului, schimbând raportul componentelor la 2: 1 sau adăugând câteva picături de acid acetic în eprubetă.

Colorarea de rutină a specimenelor de cromozomi se realizează folosind coloranți de azur și eozină. Ambii coloranți sunt preparați în apă distilată sub formă de soluție 0,15% și sunt depozitați în recipiente din sticlă întunecată. Soluțiile sunt pregătite în avans, deoarece soluțiile „mature” sunt mai eficiente. Chiar înainte de colorare se realizează o soluție de lucru: 6 părți de soluție 0,15% („matură”) de eozină și 9 părți de apă distilată. Pentru colorarea se poate folosi un colorant Gimza gata preparat și un azur-eozină gata preparat conform metodei Romanovsky. Pentru obținerea a 0,5 ml de colorant original, sunt necesari 10 ml de apă distilată.

Colorarea specimenelor se efectuează în următoarea ordine: colorantul finit este pus pe o lamelă sau lamela este plasată într-un pahar cu un colorant și păstrată timp de câteva minute. Intensitatea culorii este determinată la microscop.

La analiza vizuală a celulelor sub microscop sunt relevate anomalii cromozomiale mari, acestea sunt: fuziuni centrice ale autozomilor, fuziuni în tandem, himerismul celulelor după cromozomii sexuali.

Pentru a stabili prezența fuziunii centrice, este suficientă o concluzie pozitivă pentru 5-10 plăci metafazice. Pentru a determina chimerismul celular prin cromozomi sexuali, este necesar să se găsească 2 cromozomi X în 10 plăci metafazice.

Pentru a determina numărul de cromozomi implicați în fuziunea centrică, se alege o analiză morfometrică pe amprente fotografice. Sunt alese plăcile metafazice cu helix cromozomial optim și fără suprapuneri. Imaginile cromozomilor sunt tăiate și lipite în perechi. Lungimea fiecărui cromozom este măsurată pe mai multe plăci metafazice și se determină lungimea sa relativă la lungimea totală a întregului set de cromozomi feminini haploizi (cromozomul X).

La diagnosticarea leucozei, prezența hemoculturilor de mitoză de scurtă durată la speciemenle citologice care sunt absente la bovinele sănătoase, este primul semn care arată probabilitatea acestei boli.

Analiza celulelor la microscop începe cu o mărire mică a microscopului de 100 de ori, localizarea metafazelor este determinată de coordonatele substadiilor. Apoi, acestea sunt analizate prin mărire prin mărirea amplificării microscopului de 1000 de ori și microfotografierea.

Înregistrarea distorsiunilor cromozomiale

Analiza specimenelor colorate este începută sub mărirea microscopului în 100-200 de ori, cu evaluarea lor generală (indicele mitotic și calitatea plăcilor metafazice). Metafazele sunt cel mai bine găsite și selectate la mărire redusă. La selectarea plăcilor metafazice pentru vizualizare, unele dintre ele sunt excluse deoarece nu sunt potrivite pentru analiză în următoarele condiții:

- cromozomii se suprapun unul pe celălalt, ceea ce le împiedică identificarea și identificarea numărului total;
- toți cromozomii nu se află în câmpul vizual al microscopului sub mărire de 900-1000 de ori;
- cromozomul este prea lung sau foarte scurt;
- în câmpul vizual se observă mai mulți cromozomi aleatori;
- cromozomii sunt colorați neomogen, calitatea plăcii metafazice este slabă etc.

6.7 Metode de analiză moleculară-genetică

6.7.1 Descrierea principalelor metode de izolare a ADN-ului și ARN-ului

Izolarea ADN-ului și a ARN-ului este o etapă importantă a probelor care se pregătesc pentru procesul de diagnosticare, fără acesta nu se poate efectua nici una dintre următoarele metode: amplificarea, detectarea produselor de amplificare, clonare, secvențiere, hibridizare etc.

Acizii nucleici (NA) fac parte integrantă din proteinele complexe - nucleoproteine, care sunt conținute în toate celulele vii ale animalelor, bacteriilor, virusurilor, plantelor. Acizii nucleici au proprietăți acide puternic exprimate și sunt încărcati negativ la valori fizice ale pH-ului. Acest lucru explică una dintre proprietățile importante ale acizilor nucleici - capacitatea de a interacționa după tipul de legătură ionică cu proteinele majore (histone), ionii de metal (în principal Mg^{2+}), precum și poliamine (spermină, spermidină) și putrescină.

Prin urmare, pentru izolarea acizilor nucleici din complexe care conțin proteine, legăturile puternice și electrostatice între moleculele de proteine încărcate pozitiv și moleculele de acid nucleic încărcate negativ trebuie rupte.

Dacă sursa de acizi nucleici este o probă de sânge, material seminal sau biotat, atunci este necesar să se găsească cele mai bune metode de izolare care să permită obținerea unei cantități maxime de produs cu puritate înaltă. Când se lucrează cu culturi celulare, este posibil să se utilizeze metode mai simple de izolare, deoarece randamentul NA crește proporțional cu volumul de cultură [IV Dzyublyk, 2012].

6.7.2 Tehnica purificării soluției prin metode de extracție organică (folosind fenol, cloroform) cu sedimentarea ulterioară a alcoolilor legați de ADN și dizolvarea în apă și soluția tampon TE. Metode de sorbție diferențiată de ADN pe purtător solid

Metodele de izolare a acizilor nucleici depind de tipul de material studiat, de natura, caracterul și proprietățile obiectului [OS Antonova, 2010; S. Herrington 1999].

Metodele moderne de izolare a NA constau în trei etape:

- distrugerea (liza) celulei
- inactivarea nucleazelor
- curățare.

Adesea, o procedură ideală de liză este un compromis al mai multor tehnici, trebuie să fie suficient de strictă pentru a distruge structura materialului sursă (de exemplu, țesuturi) și, în același timp, trebuie să fie delicată pentru a preveni distrugerea NA. Procedura de liză include:

- Distrugere mecanică (măcinare, liză hipotonică);
- Tratament chimic (de exemplu, liza cu detergenți, substanțe chaotrope sau recuperarea timolului);
- descompunerea enzimatică a proteinelor (de exemplu, prin proteinaza K).

Procesele de distrugere a membranelor celulare și de inactivare a nucleozei intracelulare pot fi combinate. Agenți de denaturare nespecifici (detergenți ionici, hidroxid de mercur, guanindiclorură, guanidinizotiocianat, fenol, cloroform etc.), precum și inhibitori specifici, cum ar fi inhibitorul de ARNază din placentă, sunt utilizați ca inhibitori de nuclează. După liza celulară și inactivarea nucleazelor, masa celulară este ușor îndepărtată prin filtrare sau precipitare.

Una dintre metodele populare de izolare a ADN-ului se bazează pe utilizarea lizei celulare de către un agent chaotropic puternic - guanidinizotiocianat (GuSCN) și absorbția ulterioară a ADN-ului pe un purtător. Guanidinizotiocianatul este un agent de denaturare foarte puternic utilizat pentru liza și denaturarea simultană a tuturor proteinelor celulare (inclusiv ARNse). După o serie de spălări, ADN-ul rămâne în probă, este sorbit pe purtător, din care este ușor îndepărtat de soluție tampon de eluare. Metoda este convenabilă, tehnologică și adecvată pentru prepararea unei probe de acid nucleic pentru amplificare. În același timp, pierderea ADN poate apărea ca rezultat al sorbției ireversibile asupra purtătorului, precum și în procesul de numeroase spălări. Acest fapt este deosebit de important atunci când se tratează cantități mici de ADN dintr-o probă. În plus, chiar și cantități mici de GuSCN pot inhiba reacția de amplificare.

În prezent, un număr mare de tehnici avansate diferite sunt prezente în biologia moleculară; se bazează pe liza celulară cu izotiocianat de guanidină sau clorură de guanidină urmată de sorbția acizilor nucleici pe absorbant - particule de dioxid de siliciu; sau utilizează următoarea extracție acid-fenol a ARN-ului și precipitarea acestuia cu izopropanol. Aceste tehnici sunt utilizate în diferite modificări ale izolării ADN-ului sau ARN-ului.

Metodele de izolare a acidului nucleic pot fi divizate după caracteristicile lor fizice și biochimice de bază în următoarele clase:

- Metode în fază lichidă
- Metode în fază solidă

- Metode în fază lichidă

Metode clasice de izolare. Metodele clasice de izolare a NA din probe complexe originale (sânge,

țesut) includ liza materialului biologic de către detergenți sau agenți chaotropici, uneori în prezența enzimelor care distrug proteinele. Această etapă este urmată de mai mulți pași în care sunt utilizați solvenți organici precum fenol, cloroform sau etanol. Separarea completă a proteinelor de NA poate fi realizată prin adăugarea de perclorat de sodiu. Pentru separarea ARN-ului de ADN, se utilizează incubarea selectivă cu clorură de litiu sau izolarea specifică non-nucleică cu clorură de guanidină sau tiocianat de guanidină combinat cu extracție fenolică sau precipitare cu etanol.

Metodele date cresc probabilitatea denaturării NA, a pierderii probei sau a contaminării încrucișate a probelor dacă mai multe probe sunt prelucrate simultan. Când ARN-ul este izolat, există un risc foarte mare de contaminare de la ADN-ul prezent în proba originală. Metoda standard de obținere a unui specimen pur se bazează pe faptul că ADN-ul este o moleculă polară și nu este solubil în solvenți organici. În mod tradițional, extracția fenol-cloroform este utilizată pentru a izola ADN-ul. Prin agitarea lizatului celular din fenol se formează două faze. ADN-ul se află în faza superioară (apoasă), iar proteinele denaturate se află în faza inferioară (organică). Principalul dezavantaj al acestei metode este lipsa automatizării datorită etapei de centrifugare a extracției lichidului.

Metode pentru izolarea simultană a ADN-ului și ARN-ului. Există metode care pot fi utilizate pentru a izola atât ADN cât și ARN de la un singur obiect testat (proba). Majoritatea metodelor cunoscute sunt modificări ale procedurii originale propuse de Chirgwin și colab. În acest caz, se utilizează agenți chaotropici puternici, cum ar fi tiocianatul de guanidină și trifluoroacetatul de cesiu, pentru distrugerea simultană a membranelor celulare și inactivarea ribonucleazelor intracelulare (ARNse). Factorii care limitează astfel de tehnici sunt ultracentrifugarea și timpul lung de analiză (16-44 ore). Metodele pentru izolarea simultană a ADN-ului și ARN-ului, fără operația de centrifugare, au, de asemenea, un avantaj datorat fenolului care acționează ca un agent eficient de deproteinizare care distruge celulele și denaturează proteinele. Pentru separarea eficientă a ADN-ului cu greutate moleculară mare de ARN, se realizează la început extracția fenolică și apoi se fac două extracții de fenol-cloroform pentru a elimina simultan proteinele și lipidele din soluția care conține NA. Pentru a crește randamentul NA, componentele soluției tampon de extracție sunt optimizate. De exemplu, un anumit pH a soluției tampon (pH 7,9) în prezența detergentului (0,2% dodecil sulfat de sodiu) și o concentrație relativ mică de sare (100 mM LiCl) fac posibilă separarea eficientă a NA în faza apoasă și disocierea proteinelor; EDTA 10 mM nu permite formarea de complexe proteice și formează complex chelat cu Mg^{2+} , inhibând astfel acțiunea nucleazelor dependente de magneziu.

- Metode în fază solidă

Principiile de bază ale metodelor în fază solidă. Următoarele procese și principii sunt utilizate în metodele de izolare a acidului nucleic în fază solidă:

- legături de hidrogen cu o matrice hidrofilă nemodificată (cuarț) în condiții chaotrope;
- schimb de ioni în soluție apoasă, de obicei cu utilizarea schimbătorilor de anioni;
- afinitate;
- mecanisme de excludere a mărimii.

Sistemele în fază solidă care adsorb acizii nucleici sunt particule pe bază de cuarț, fibre de sticlă, purtători de schimb de anioni folosiți în coloanele de separare cromatografice. De exemplu, pot fi menționate kituri gata preparate pentru izolarea NA cu membrană de siliciu fabricate de Macherey-Nagel (NucleoSpin), Qiagen (QiaAmp) și altele.

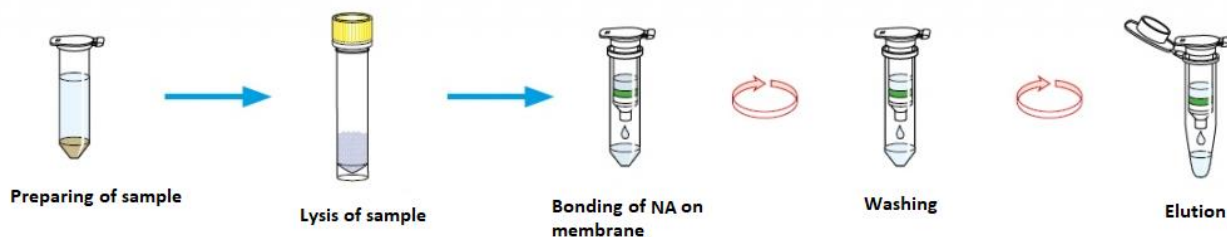


Figura 6.36. Schema de izolare a ADN-ului pe coloane de spin cu membrană de silice

Acești purtători sunt utilizați pentru a izola sau purifica acizii nucleici cu soluții foarte concentrate de săruri chaotropice (iodură de sodiu, perclorat de sodiu, tiocianat de guanidină). Este descrisă utilizarea pământului de diatomee ca sorbent, în acest caz legarea are loc și în prezența sării chaotropice. Alte metode se bazează pe detergența articulară cu materiale care leagă acidul nucleic sau pe utilizarea unui sorbent solid cu grupări funcționale care leagă acizii nucleici în combinație cu polietilenglicanii și săruri foarte concentrate.

Un grup bine cunoscut de metode universale de preparare a probelor se bazează pe utilizarea

schimbătorilor de ioni de afinitate Chlex (capacitate de absorbție scăzută), care, spre deosebire de sticlă, nu adsorb ADN-ul, ci absorb impuritățile care împiedică reacția. De regulă, această tehnologie constă din două etape: fierberea probei, determinând distrugerea pereților celulari sau liza de către detergenți care nu inhibă PCR; iar acizii nucleici apar în soluție și absorbția impurităților are loc în schimbătorii de ioni. Metoda este simplă și ușor de realizat. În același timp, există probe clinice cu impurități care nu pot fi îndepărtate de schimbătorii de ioni. În plus, pereții celulari ai unor microorganisme nu sunt sensibili la fierbere simplă. În aceste cazuri, este necesar să se aplice etape suplimentare de prelucrare a probei.

Metoda de izolare a acizilor nucleici propusă de Boom și colab. este extrem de convenabilă [Boom et al, 1990, Boom et al, 1999]. Această metodă include stadiul lizei celulare de către un agent chaotropic puternic care distruge membranele celulare și inactivează ARN-urile intracelulare prin guanidină-cianat (GuSCN), urmată de o absorbție suplimentară a NA pe purtător (margele de sticlă, pământ de diatomee, „lapte” de sticlă etc.) ușor de îndepărtat prin eluarea soluției tampon. De exemplu, kiturile pe bază de siliciu sunt propuse de AmpliSense, Synthol și alții.

Schema de izolare a ADN-ului folosind astfel de truse este prezentată în **imagine**.

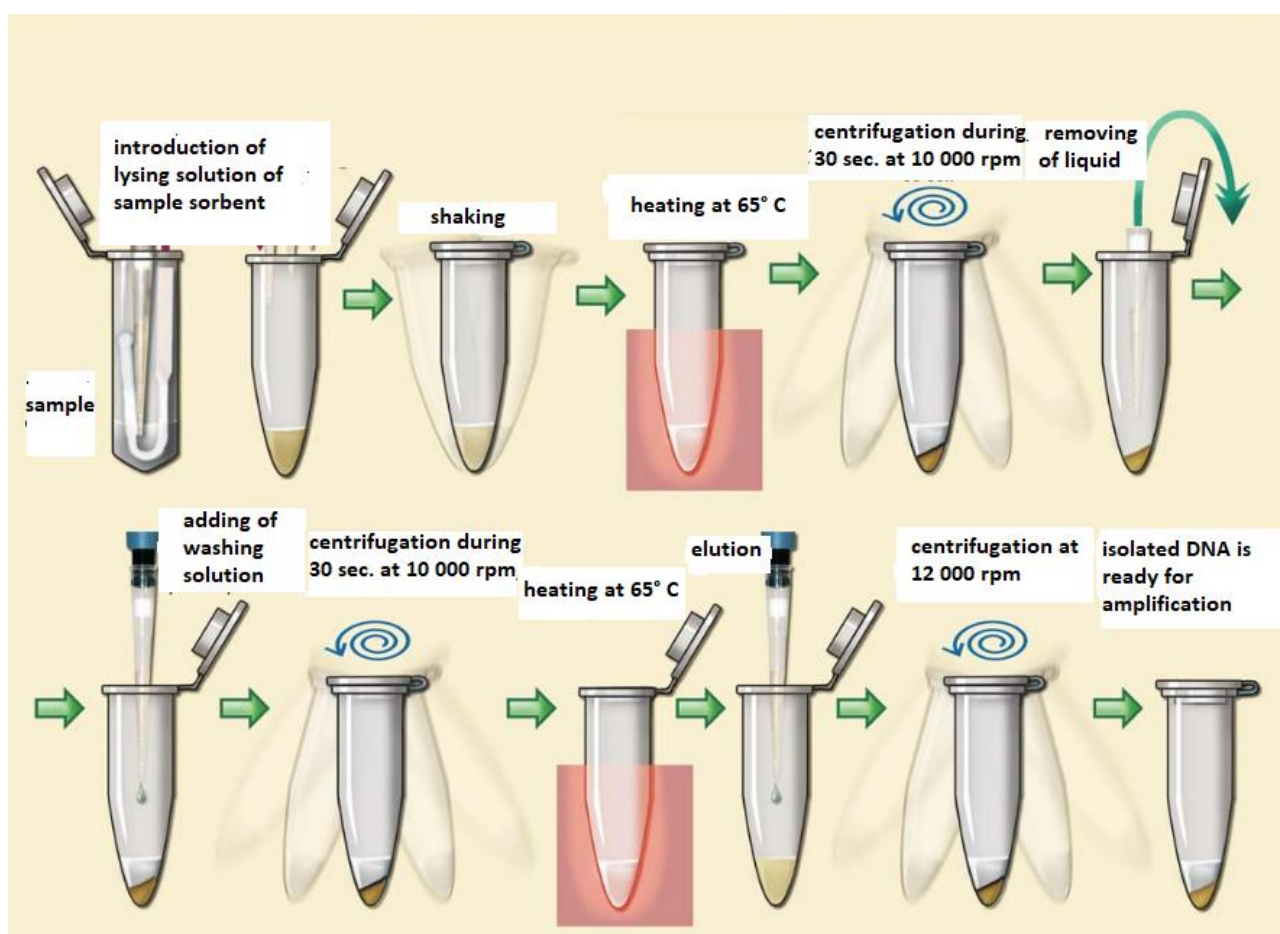


Figura 6.37. Schema izolării acizilor nucleici pe bază de silice

Acidul nucleic se leagă înapoi de sticlă în prezența unei concentrații mari de săruri chaotrope (de exemplu, clorură de guanidină, tiocianat de guanidină). În aceste condiții, legarea proteinelor de matrice nu are loc. Compușii chaotropici sunt substanțe care perturbă structura ordonată a apei și astfel determină haosul membranelor (de exemplu, uree, iodură de sodiu). Pe lângă legare, agenții chaotropici asigură distrugerea membranelor celulare și liza celulară cu eliberarea ulterioară de acid nucleic. Impuritățile sunt spălate cu sare chaotropică și sare chaotropică cu 80 % de etanol. Acidul nucleic purificat este îndepărtat din sticlă cu o soluție tampon cu rezistență ionică redusă. În prezent, multe firme comerciale oferă pentru izolarea coloanelor de acizi nucleici cu o matrice de sticlă. Metodele care utilizează aceste coloane includ etape de centrifugare sau aspirare în vid.

Metodă bazată pe separarea magnetică. Utilizarea purtătorilor de solide magnetice în procesele biologice biochimice și moleculare are multe avantaje față de metodele de separare nemagnetică. De obicei, un magnet este aplicat pe peretele eprubetei care conține proba pentru agregarea particulelor lângă peretele

eprubetei, iar restul probei poate fi îndepărtat. În acest fel, este posibil să se separe componentele lizatului celular care inhibă ADN polimeraza și reacția PCR, de exemplu, polizaharide, componente fenolice, humus. Pentru procesul de izolare se utilizează purtători magnetici cu liganzi de afinitate imobilizați sau din biopolimer, care crește afinitatea pentru acidul nucleic dorit. Particulele magnetice sunt realizate din diverși polimeri sintetici, biopolimeri, sticlă poroasă sau pe bază de materiale magnetice anorganice, cum ar fi oxidul de fier cu o suprafață modificată. Particulele superparamagnetice care nu interacționează între ele în absența unui câmp magnetic sunt deosebit de potrivite pentru izolare. Aceste particule dobândesc un moment magnetic într-un câmp magnetic puternic, dar nu păstrează magnetismul permanent când câmpul este degajat. Dacă agregarea magnetică și aderența particulelor sunt eliminate, atunci suspensia de particule și extracția identică a acizilor nucleici se realizează în timpul reacției.

Particulele magnetice acoperite cu sticlă sunt utilizate pentru izolarea automată a acizilor nucleici. Acidul nucleic se leagă de suprafața sticlei, apoi, legat de particule, suferă aceleași etape ale procesului de extracție ca și în tehnica Boom: după o serie de spălări acidul nucleic, absorbit pe purtător rămâne în probă. Este ușor de îndepărtat din probă folosind un tampon de eluare. Kituri pentru izolarea acizilor nucleici pe piese magnetice, fabricate de Ambioo, Macherey-Nagel (NucleoMag), Invitrogen (Dynabeads®) și altele pot fi un astfel de exemplu.

Metoda este convenabilă, tehnologică și adecvată pentru prepararea probei pentru amplificarea, poate fi reprodusă pe stații de lucru cu pipetare robotizată.

Fără îndoială, posibila pierdere a produsului poate apărea ca urmare a sorbției ireversibile a purtătorului în procesul de spălare numeroasă. Acest fapt este deosebit de important atunci când se tratează cantități mici de ADN dintr-o probă. ADN-ul brut și ARN-ul sunt izolate de aceleași particule magnetice. Pentru a separa ARN-ul de ADN, ARN-ul este distrus de starea de separare a ADN-ului. Cea mai bună opțiune este adăugarea de ARNază sau alcali. Dimpotrivă, ARN-ul poate fi izolat în timpul distrugerii ADN-ului prin dezoxiribonuclează (ADN-ază).

De obicei, soluțiile de liant sunt adăugate la mediul magnetic pentru a lega selectiv acizii nucleici. De exemplu, atât proteinele virale, cât și secvențele complementare de ADN sau ARN pot fi utilizate pentru a lega acizii nucleici virali.

Există particule magnetice comerciale cu oligodeoxitimidine imobilizate pe suprafața lor pentru izolarea eficientă și rapidă a ARN șablon (ARN_m) ultra purificat din culturi de celule eucariote sau izolarea ARN grosieră. Metoda de izolare se bazează pe hibridizarea secvenței oligodeoxitimidinei printr-un capăt 3-terminal poliadenilat stabil al ARN_m eucariot. Lungimea secvenței complementare este de 20-30 oligonucleotide. Această secvență se leagă direct covalent de suprafața particulei, sau indirect, prin biotilarea oligonucleotidelor prin interacțiunea dintre particulele acoperite cu streptavidină. Numărul producătorilor de particule magnetice este în continuă creștere, astfel încât pentru această sarcină este ușor să găsiți o metodă convenabilă.

Metoda de absorbție diferențială a impurităților prin precipitare selectivă a ADN-ului și spălare în tampon TE folosind un set de reactivi ADN Diamond. Tehnica de izolare a ADN-ului folosind DiamondDNA implică liza țesutului în tampon de liză, inhibitori ai sorbției reacțiilor enzimatice din soluție și ADN din soluție folosind un precipitator de ADN extrem de eficient. Simplitatea de bază și durata redusă a procesului de izolare și purificare a ADN-ului se realizează prin utilizarea sortării selective. O adsorbție selectivă extrem de eficientă a exemplurilor este utilizată pentru a furniza indicatori unici de puritate a ADN-ului (OD₂₆₀ / OD₂₈₀ nu mai puțin de 1,8). Reziduurile de proteine din ADN-ul purificat nu pot fi identificate prin colorare diferențială și fluorimetrie ulterioară. Cu DiamondDNA, se obține un grad ridicat de purificare de la inhibitori PCR atât de puternici precum polifenoli și polizaharide. Conținutul de ADN al soluției după purificare este direct proporțional cu conținutul de acizi nucleici din obiectul original, ceea ce mărește precizia atunci când se utilizează metode cantitative de analiză (RealTime PCR și detectarea punctului final). Spre deosebire de metodele și kiturile utilizate pe scară largă bazate pe absorbția moleculelor de ADN pe particule de silica (în suspensie sau pe coloane), purificarea ADN-ului folosind DiamondDNA elimină degradarea puternică a moleculelor de acid nucleic. Ca urmare, lungimea fragmentelor este mai mare de 20.000 de perechi de nucleotide.

Avantajele utilizării unui kit de reactivi DiamondDNA:

- Folosirea unei etape suplimentare de depunere permite obținerea unei calități superioare de curățare. În timpul utilizării DiamondDNA, nu există nicio interacțiune directă a moleculelor de ADN cu sorbentul, ceea ce permite menținerea integrității helixului dublu.

- Intrarea accidentală a sorbentului în amestecul PCR nu blochează amplificarea.

- Utilizarea proteazelor este opțională și este utilizată pentru extragerea ADN-ului din materialul degradat.

- Nu există substanțe toxice și componente interzise circulației libere în kit.
- ADN-ul izolat prin intermediul kitului DiamondDNA este pregătit pentru analize hibride ulterioare, stadializare PCR și secvențiere.

Trebuie marcat faptul că metodele de izolare a acidului nucleic sunt îmbunătățite continuu pentru a reduce numărul de manipulări și în mod ideal ar trebui să consistă din una sau două proceduri. În biologia moleculară, se aplică o serie de metode avansate de separare a acizilor nucleici în fracții din specimenul total. Ele pot fi utilizate pentru a obține probe de acizi nucleici purificați și pentru reacții ulterioare de amplificare. Sunt metode de purificare cromatografice: inversate, schimb de ioni (ca adsorbanți sunt utilizați DEAE-celuloză, DEAE-Sephadex), cromatografie distributivă, cromatografie pe gel permeabil; cromatografia probei pe gel de fosfat de calciu și de afinitate pe purtători de proteine; ultracentrifugare în gradient de densitate a zaharozei, filtrare prin geluri de agaroză, electroforeză pe gel.

6.8 Metode de analiză a datelor genetice obținute și verificarea acestora

6.8.1 Metode de procesare matematică a datelor obținute pentru a confirma ipoteza de lucru.

Scopul principal al utilizării markerilor în reproducere este identificarea așa-numitelor *locilor trăsăturilor cantitative* (QTLs), adică regiuni ale genomului care afectează semnificativ statistic variabilitatea trăsăturilor cantitative. Schema obișnuită de selecție asistată prin marker (MAS) constă în trei pași:

- 1) detectarea unuia sau mai multor QTL-uri;
- 2) identificarea genei corespunzătoare (mutație cauzală);
- 3) creșterea frecvenței unei alele favorabile fie prin metoda de selecție, fie prin introgresiune (hibridizare, penetrare a genelor unei specii în fondul genetic al alteia).

În plus față de selecția asistată de marker (MAS), se utilizează introgresiunea asistată de marker de contrast (MAI). Se bazează pe selecția în tandem în cadrul programului backcross, când prima etapă folosește alele de rasă donatoare situate în interiorul sau adiacente genei care determină trăsătura dorită (în special rezistența la anumite boli), iar la a doua etapă, backcross-ul se efectuează pentru a avea alele din spate ale rasei destinatarilor.

Exemplele de teste genetice utilizate comercial sunt prezentate în **Tabelul 6.3**.

Tabelul 6.3

Testele genetice comerciale utilizate la reproducerea animalelor,
(Dekkers JCM, 2004)

Categoria de caracteristici	Marker	Specii de animale
Defecte ereditare	BLAD Citrulinemie DUMPS CVM Urină de sirop de arțar Manozidoză RYS	Bovine de lapte bovine de lapte și carne Bovine de lapte Bovine de lapte bovine de lapte și carne bovine de lapte și carne porci
Exterior	CKIT MC1R / MSHR MGF	porci porci, bovine de carne și lapte, bovine de carne
Calitatea laptelui	κ -cazeină β -lactoglobulină FMO3	Bovine de lapte Bovine de lapte Bovine de lapte
Calitatea cărnii	RYS RN / PRKAG3	porci porci
Aportul de furaje	MC4R	porci
Boli	Prp F18	oaie porci
Reproducerea	Booroola Inverdale Hanna	oaie oaie oaie
Creșterea și compoziția cărnii	MC4R IGF-2 Miostatina Callipyge	porci porci bovine de carne oi
Producția de lapte și compoziția laptelui	DGAT1 GRH κ -cazeină	Bovine de lapte Bovine de lapte Bovine de lapte

Acest sistem include proceduri de colectare și acumulare a probelor de ADN, genotipare și analiză a datelor pe baza fenotipului animalelor, precum și luarea deciziilor zilnice (care animale ar trebui genotipate

sau regenotipate în caz de erori), care animale ar trebui evaluate prin fenotip, etc. (Meuwissen Th., BJHayes DNA ME Goddard 2016).

Pentru verificarea datelor primite (din Lat.verum-true, facere-to do), adică verificarea pozițiilor teoretice prin compararea diferitelor grupuri (control, experiment), este adesea utilizată analiza varianței.

Analiza varianței este o parte independentă și importantă a statisticilor biologice. Poate fi folosită pentru a stabili rolul unor factori în variabilitatea unei anumite trăsături, pentru a descompune variabilitatea generală a trăsăturii în componente cauzate de factori studiați specifici (vârsta părinților, mărimea părinților, rasa, nivelul de hrănire etc.), precum și cauzate de factori aleatori, necontrolați (temperatură, iluminare etc.). Astfel, esența analizei varianței este studierea efectului statistic al unui sau mai multor factori asupra trăsăturii rezultate.

Trăsătura eficientă (rezultată) (de exemplu, producția laptelui, multiplicitatea, multiplicitatea purcelor), este studiată ca urmare a influenței a doi factori diferiți:

1. Organizate în cercetări - rase diferite, animale aparținând unui anumit grup genetic (grup marker), nivel de hrănire etc. ($\bar{x}$);

2. Neorganizate, adică aleatoriu, nu este luat în considerare în studii ($\bar{z}$);

În zootehnie, termenul „varianță” înseamnă prezența diferitelor valori ale trăsăturii la diferiți indivizi, grupați în animale studiate, precum și măsura care determină gradul acestei diversități (în cazul nostru, grupul genetic). Varianța este indicată de C. Varianța globală este utilizată la analiza varianței la un grup sau altul de animale.

Varianța totală a semnelor (C_y) în grupul studiat de animale este împărțit în componentele sale:

a) varianță factorială (varianță de grup – C_x) cauzată de factori organizați;

b) varianță aleatorie (varianță C_z reziduală) cauzată de alți factori neorganizați în acest experiment.

Suma varianței factoriale și aleatorii este întotdeauna egală cu varianța totală:

$$C_x + C_z = C_y$$

Pentru a obține date fiabile de analiză a varianței la construirea complexelor de dispersie (în special bi- și multifactoriale), următoarele operații trebuie efectuate corect:

1. *Selectarea factorilor.* Factorul este orice manifestare a unei trăsături al cărei impact asupra trăsăturii productive (greutatea vie, productivitatea laptelui, multiplicitate etc.) trebuie studiat

Atunci când se organizează complexe bi- și multifactoriale, libera alegere a factorilor pentru cercetare este limitată de cerința independenței complete între ei, adică nu ar trebui să se coreleze. De exemplu, masa și dimensiunea animalului, circumferința inimii și greutatea animalului, multiplicitatea și mărimea cuibului etc. nu pot fi luate. Factorii independenți pot fi: sexul animalelor, rasa animalelor, apartenența la grupul de markeri, temperatura și umiditatea camerei etc.

2. *Distribuția factorilor după absolvire.* Pentru complexele cu un singur factor și bi- și multi-factoriale, acestea pot avea gradații cantitative (numărul de stimulente în grame, rata de hrănire + 20% sau - 20% la normă etc.) și calitative (sex - masculin și feminin; îngrășare la porci: grăsime, carne, slănină; grăsime - cu margini roșii, deschis la culoare).

3. *Selectarea indivizilor.* Rezultatele analizei varianței depind în mare măsură de selecția corectă a indivizilor atât în cantitate, cât și în calitate. Indivizii selectați în funcție de calitate ar trebui să reflecte populația generală pentru care se desfășoară studiul. Prin urmare, în funcție de calitate (valoarea trăsăturii (rezultante) rezultate), indivizii ar trebui selectați aleatoriu. Încălcarea acestui principiu duce întotdeauna la concluzii greșite.

Cantitativ, indivizii pot fi distribuiți prin clasificarea factorilor în diferite moduri: uniform (1: 1), proporțional (1: 2), ceea ce facilitează analiza varianței; și inegal (1: 1,66), ceea ce complică calculele.

4. *Transformarea valorilor trăsăturii rezultante.* Pentru a facilita calculele, valorile incomode ale trăsăturii rezultante (rezultate) (multidigitale, fracționale) pot fi transformate în altele convenabile (mai puține cifre, exprimate în numere întregi).

a) Toate valorile trăsăturii pot fi înmulțite cu același număr: $0,30 \times 100 = 30$ sau $0,45 \times 100 = 45$; rezultatul final trebuie corectat (împărțit la 100).

b) Toate valorile trăsăturii de gradare pot fi împărțite la același număr (cu 2, 3 sau 4) și corectate la final, adică înmulțite cu numărul cu care a fost împărțită;

c) Puteți scădea același număr din toate valorile trăsăturii rezultante (este mai bine să scădeți cea mai mică valoare a trăsăturii). În cele din urmă, corectarea trebuie făcută numai pentru media aritmetică M , adăugându-le numărul eliminat anterior.

5. *Tehnica calculelor la analiza varianței.* Calculul complexelor de dispersie se realizează prin formule speciale de lucru. Cu toate acestea, tehnica de calcul pentru grupuri mici și mari este diferită. Pentru grupurile mici (probe) dispersiile sunt calculate mai ușor, pentru grupurile mari - puțin mai dificil. Grupul de 40-50 de variante (trăsături multidigitale) este deja considerat ca fiind mare.

Complex monofactorial

Este un complex în care se studiază efectul asupra trăsăturii rezultante (rezultate) a unui factor (nivelul aprovizionării cu proteine a barajelor ca factor, multiplicitatea ca trăsătură rezultantă).

Tehnica de calcul a complexului monofactorial pentru grupuri mici poate fi prezentată în următorul exemplu: pentru a studia efectul unui aditiv proteic de origine animală asupra multiplicității scroafelor, dacă se stabilesc trei gradații ale acestui factor: primul grup - 0%, al doilea grup - (+ 10%) și al treilea grup - (+ 20%) de supliment la norma zilnică de proteine digerabile. Multiplicitatea scroafelor în timpul perioadei experimentale a fost determinată ca o trăsătură rezultantă (rezultantă). Pentru fiecare gradare a factorului (0%; + 10%; + 20%), doi indivizi (scroafe) au fost reținuți pe principiul aleatoriei, care în timpul experimentului a arătat multiplicitate diferită, care este exprimată în următoarele numere: primul grup 14 și 6; al doilea - 20 și 16; al treilea - 10 și 6 purcei. Aceste numere pot fi ușor convertite prin scăderea multiplicității minime (6 purcei), rezultând datele obținute (valorile trăsăturii (rezultate)), devin mai convenabile pentru calcul (primul grup - 8 și 0, al doilea - 14 și 10 și al treilea - 4 și 0).

Tabelul 6.4

Tehnica de calcul pentru analiza varianței monofactorialial pentru probe mici

Simbol	caracter	Gradarea factorului			r numărul de gradații
		0	10	20	
v	Valoarea trăsăturii rezultate, date	8; 0	14; 10	4; 0	$\Sigma v = 36$
v^2	Pătratul datelor	64; 0	196; 100	16; 0	$\Sigma v^2 = 376$
n	Frecvențe - numărul scroafelor	2	2	2	$n_x = 6$
Σv	Suma valorilor trăsăturilor rezultante	8	24	4	
$(\Sigma v)^2$	Pătratul sumei valorilor trăsăturilor productive	64	576	16	
$h = \frac{(\Sigma v)^2}{n}$	Pondere diviziunii	32	288	8	$\Sigma h = 328$
$M = \frac{\Sigma v}{n}$	Pondere valorii medii a trăsăturii rezultante	4 + (6)	12 + (6)	2 + (6)	$M = 6 + (6)$
M	Multiplicitatea medie a scroafelor (capete)	10	18	8	$M=12$

În acest exemplu, valorile medii private sunt obținute în forma convertită: cu 6 unități mai puțin decât cele adevărate. Pentru a recupera valoarea reală a trăsăturii rezultante (rezultate), este necesar să adăugați la fiecare medie (M) valoarea 6, - - (4 + 6); (12 + 6); etc. Apoi obținem multiplicitatea medie reală în funcție de gradații de factori: 10.18 și 8 purcei.

Astfel, s-a constatat că un aditiv proteic în cantitate de 10% din normă are un efect mai pozitiv asupra multiplicității scroafelor decât aditivul de 20% din normă. Pentru concluzia finală, este necesar să se determine gradul sau puterea impactului factorului asupra trăsăturii productive.

Pentru a determina gradul de impact al factorului organizat este necesar să se găsească raportul dintre varianța factorială și cea totală ($\frac{Cx}{Cy}$). Esența calculelor făcute în acest tabel este de a calcula indicii ($\Sigma v^2 = 376$; $\Sigma h = 328$) utilizați într-o formulă specială de lucru: generală (Cy), factorială (Cx) și varianță aleatorie (Cz).

Pentru calcularea varianței generale, factoriale și aleatorii este necesar să se determine:

1) valoarea auxiliară H prin pătrat totalul indicilor rezultanți și împărțirea acestei valori la numărul de indivizi (n)

$$H = \frac{(\Sigma v)^2}{n} = \frac{(36)^2}{6} = \frac{1296}{6} = 216$$

2) valoarea varianței totale a trăsăturii rezultante (rezultate) prin următoarea formulă:

$$Cy = \Sigma v^2 - H = 376 - 216 = 160;$$

3) valoarea varianței aleatorii

$$Cz = \Sigma v^2 - \Sigma h = 376 - 328 = 48;$$

4) valoarea varianței factoriale

$$Cx = \Sigma h - H = 328 - 216 = 112;$$

5) gradul de impact al factorului organizat asupra trăsăturii rezultante (rezultată)

$$\eta^2 = \frac{Cx}{Cy}$$

6) gradul de impact al factorilor neorganizați (aleatori) $\eta^2 = \frac{Cz}{Cy}$

Rezumatul rezultatelor analizei complexului factorial de varianță pentru probe mici este prezentat în Tabelul 6.5.

Tabelul 6.5

Rezumatul rezultatelor analizei varianței pentru probe mici

Indici		x	z	y
$Cy = \Sigma v^2 - H = 376 - 216 = 160$	C	112	48	160
$Cz = \Sigma v^2 - \Sigma h = 376 - 328 = 48;$	η^2	0,70	0,30	1,00
$Cx = \Sigma h - H = 328 - 216 = 112;$ Verifica: $Cx + Cz = Cy = 112 + 48 = 160$	%	70	30	100
Numărul gradului de libertate	v	$v_x = l-1 = 3-1 = 2$	$v_z = nl = 6-3 = 2$	$v_y = n-1 = 6-1 = 5$
Varianță corectată (deviantă)	σ^2	$\sigma_x^2 = \frac{Cx}{v_x} = \frac{112}{2} = 56$	$\sigma_z^2 = \frac{Cz}{v_z} = \frac{48}{2} = 24$	
Coeficient de fiabilitate F		$F = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_z^2} = \frac{56}{24} = 2,33$		

Valorile tabelare

F

0,99 = 30,8

la 0,95 = 9,6
0.999 = 148,5

Rezumatul acestei analize poate fi exprimat după cum urmează:

- impactul factorului organizat (nivelul proteinei asupra multiplicității scroafelor) - 70%;

- impactul factorului neorganizat (toți ceilalți factori asupra fertilității femelelor) - 30%;

- impactul tuturor factorilor - 100%. În continuare definim numărul gradelor de libertate (v). Pentru C_x este egal cu numărul de clase conform factorului 1 - 1 sau $v_x = l - 1 = 3 - 1 = 2$.

Varianța reziduală C_z numărul gradelor de libertate este definită de diferența dintre numărul de observații n și numărul de clase l , adică $v_y = v_x - v_z = 6 - 3 = 3$.

Numărul gradelor de libertate la variabilitatea generală este egal cu numărul de observații (n) fără unul sau $v_y = n - 1 = 6 - 1 = 5$.

Suma gradelor de libertate ar trebui să dea numărul lor variabilități generale, adică $v_y = v_x + v_z$

Apoi, calculăm varianța corectată (așa-numita devianta - σ^2). Pentru aceasta, fiecare varianță (factorială și reziduală) este împărțită la numărul corespunzător de grade de libertate

$$\sigma_x^2 = \frac{C_x}{v_x} = \frac{112}{2} = 56; \sigma_z^2 = \frac{C_z}{v_z} = \frac{48}{3} = 16$$

Apoi, determinăm fiabilitatea varianței factoriale. Pentru a determina fiabilitatea varianței factoriale și impactul factorului de variabilitate a trăsăturii prin împărțirea varianței factoriale la una reziduală, calculăm coeficientul de fiabilitate al lui Fisher:

$$F = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_z^2} = \frac{56}{16} = 3,5$$

Apoi, comparăm valoarea calculată a lui F cu valoarea sa din tabel (Anexa II). Trebuie reamintit că în coloana din stânga găsim valoare $v_2 = v_z$ (dacă este 3), iar în linia de titlu superioară găsim valoarea $v_1 = v_x$ (dacă în exemplu, este 2). La intersecția acestor rânduri și coloane găsim valoarea F tabelată la trei niveluri de probabilitate:

0,95 = 9,6;

0,99 = 30,8;

0,999 = 148,5

Deoarece F este egal cu 3, 2, impactul factorului studiat asupra trăsăturii rezultante (rezultate) nu este fiabil.

Sarcina 1 Pentru a stabili impactul factorului de rasă asupra digestibilității nutrienților (trăsătură rezultantă) dacă, prin principiul prelevării aleatorii, pentru fiecare gradare a factorului au fost selectați trei indivizi (scrofițe). Au următorii indici ai coeficientului de digestibilitate a proteinei: rasă albă mare - 78,33; 76,70; 76,37%; alb mare $\times$ landrace - 81,20; 82,16; 83,50%

Tabelul 6.6 Tehnica de calcul pentru analiza varianței complexului cu un singur factor pentru probe mici

Indici	Rasă	
	A ₁ (alb mare)	A ₂ (alb mare $\times$ landrace)
v valoarea trăsăturii rezultante	78,33 76,70 76,37	81,20 82,16 83,50
v^2 - pătratul valorilor (date)	6135,59 5882,89 5832,37	6593,44 6750,26 6972,25
n - volumul de gradație	3	3
Σv - suma datelor	231,40	246,86
$(\Sigma v)^2$ - suma pătratelor datelor	53545,96	60939,85
$h = \frac{(\Sigma v)^2}{n}$	17848,65	20313,28
$M = \frac{\Sigma v}{n}$	77,13	82,29

Pentru a calcula varianța totală, factorială și aleatorie, este necesar să se determine H

$$= \frac{(\Sigma v)^2}{n} = \frac{(478,26)^2}{6} = \frac{228732,62}{6} = 38122,1$$

$$C_y = \Sigma v^2 - H = 38166,80 - 38122,1 = 44,70;$$

$$Cz = \Sigma v^2 - \Sigma h = 38166,80 - 38161,93 = 4,87;$$

$$Cx = \Sigma h - H = 38161,93 - 38122,1 = 39,83;$$

$$Cx + Cz = Cy; Cy = 39,83 + 4,87 = 44,70.$$

Tabelul 6.7

Rezumatul rezultatelor analizei varianței complexului monofactor pentru probe mici

$H = \frac{(\Sigma v)^2}{n} = \frac{(478,26)^2}{6} = \frac{228732,62}{6} = 38122,1$		Varianțe		
		x	z	y
$Cy = \Sigma v^2 - H = 38166,80 - 38122,1 = 44,70$	C	39,83	4,87	44,70
$Cz = \Sigma v^2 - \Sigma h = 38166,80 - 38161,93 = 4,87$	η^2	$\frac{Cx}{Cy}$	$\frac{Cz}{Cy}$	$\frac{Cy}{Cy}$
$Cx = \Sigma h - H = 38161,93 - 38122,1 = 39,83$	η^2	0,8911	0,1089	1,00
$Cx + Cz = Cy; Cy = 39,83 + 4,87 = 44,70$	%	89,11	10,89	100
Numărul gradelor de libertate	v	$v_x = l-1 = 2-1 = 1$	$v_z = nl = 6-3 = 3$	$v_y = n-1 = 6-1 = 5$
Varianță corectată (deviantă)	σ^2	$\sigma_x^2 = \frac{Cx}{v_x} = \frac{39,83}{1} = 39,83$	$\sigma_z^2 = \frac{Cz}{v_z} = \frac{4,87}{3} = 1,62$	$\sigma_y^2 = \frac{Cy}{v_y} = \frac{44,70}{5} = 8,94$
Coeficient de fiabilitate F Valori tabelare	$F = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_z^2} = \frac{39,83}{1,62} = 24,58$ $F_{21,2} - P_2 = 0,99$ { $74,1 - P_3 = 0,999$ $7,7 - P_2 = 0,95$			

Prin urmare, în acest exemplu, a fost stabilit un impact fiabil al factorului asupra trăsăturii rezultante (rezultate) (la $P > 0,99$).>

Complex bi-factorial

Structura complexelor bi-factoriale este mai complexă decât a complexelor mono-factoriale. Pentru a facilita calculele în complexe bi-factor, este necesar ca factorii studiați să fie independenți unul de celălalt și frecvențele să fie proporționale (cu gradațiile).

Când se studiază acțiunea mai multor factori, este necesar să se ia în considerare impactul factorului A și al factorului B asupra trăsăturii rezultante (rezultate), dar și a impactului lor comun AB asupra trăsăturii variate.

Prin urmare, analiza varianței complexului bi-factorial ar trebui să determine nu numai Cy , Cx , C_A , C_B , C_Z , dar și varianța lui C_{AB} . Indicii Cy , C și C_Z se calculează în același mod ca și în complexul mono-factorial. Pentru a calcula varianța factorială C_A și C_B , procesarea datelor este oarecum nouă. Pentru a obține Σh_A și Σh_B , rețelele, separate pentru factorii A și B, sunt procesate, compilând tabele utilitare. În complexe uniforme și proporționale se calculează varianța acțiunii comune factorilor $C_{AB} = Cx - C_A - C_B$

Varianța generală $Cy = \Sigma v^2 - H$

Varianța factorială $Cx = \Sigma h - H$

Varianța față de factorul A $C_A = \Sigma h_A - H$

Varianța față de factorul B $C_B = \Sigma h_B - H$

Exemplu. Pentru a determina efectul aditivului de făină pe bază de plante (*B*) la multiplicitatea scroafelor, se stabilesc două gradații ale acestui factor (*B*₁) - primul grup 0 %, (*B*₂) - al doilea grup + 25 %, la dieta zilnică în funcție de valoarea nutrienților,

Factor *A* - rasa scroafelor, gradarea acesteia;

*A*₁ - alb mare;

*A*₂ - myrgorodska.

Au fost selectați doi indivizi (scroafe însărcinate) pentru fiecare gradare a factorilor, care au arătat următoarea multiplicitate în perioada experimentală:

A ₁ - alb mare	B ₁ I grupa 8 și 11 porci
	B ₂ II grupa 9 și 13 porci

A ₂ - myrgorodska	B ₁ I group 10 and 15 pigs
	B ₂ II grupa 11 și 17 porci

Primul factor
A

Al doilea factor
B

Caracter
rezultant

Să transformăm numerele trăsăturii rezultante (rezultate) scăzând 5 din fiecare valoare a datelor; drept urmare, vom obține datele mai convenabile pentru calcul

B ₁ - 3; 6	A ₁
B ₂ - 3; 8	
B ₁ - 5; 10	A ₂
B ₂ - 6; 12	

Tabelul 6.8.

Tehnica de calcul la analiza varianței complexului bi-factorial pentru probe mici

Indici	Rasa (A)				A=2 B=2	Factori	n	Σv	(Σv) ²	$h=\frac{(\Sigma v)^2}{n}$	$M=\frac{\Sigma v}{n}$
	Mare și alb		Myrgorodska								
	Făină de plante (B)										
	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂							
v	6; 6	4; 8	5; 10	6; 12	Σv = 54	A ₁	4	21	441	110	5 (+5)
v ²	9; 36	16; 64	25; 100	36; 144	<u>(Σv) ² = 430</u>	A ₂	4	33	1089	272	8 (+5)
n	2	2	2	2	<u>$H=\frac{(54)^2}{8}=365$</u>		8	54		<u>$\Sigma h_A=\frac{(\Sigma v)^2}{n}=382$</u>	
Σv	9	12	15	18		B ₁	4	24	576	144	6 (+5)
(Σv) ²	81	144	225	324		A ₂	4	30	900	225	7 (+5)
$h=\frac{(\Sigma v)^2}{n}$	40*	72	112	162	<u>Σh = 386 **</u>		8	54		<u>Σh_B = 369</u>	

* 81/2 = 40,5 - aproximăm la 40 pentru calcul mai ușor

** Rezultatele celor cinci valori (subliniate) vor fi utilizate în formulele de calcul ale analizei varianței.

Tabelul 6.9

Rezumatul rezultatelor analizei varianței complexului bi-factorial pentru probe mici

Indici	Cod alfabetic	Pentru factorul de rasă A	Pentru factorul de făină de plante B	Acțiunea comună a ambilor factori AB	Varianță		
					x factorial	z aleatoriu	y general
$C_y = \sum v^2 - H = 430 - 365 = 65$							
$C_z = \sum v^2 - \sum h = 430 - 386 = 44$							
$C_x = \sum h - H = 386 - 365 = 21$	C	17	4	0	21	44	65
$C_A = \sum h_A - H = 382 - 365 = 17$							
$C_B = \sum h_B - H$	η^2	0,26	0,06	0,00	0,32	0,68	1,00
$C_{AB} = C_x - C_A - C_B = 21 - 17 - 4 = 0$	η^2	$\frac{Ca}{Cy}$	$\frac{CB}{Cy}$	$\frac{CAB}{Cy}$	$\frac{Cx}{Cy}$	$\frac{Cz}{Cy}$	$\frac{Cy}{Cy}$

Găsiți gradul de impact al factorului A, B, AB și raportul dintre varianța factorială și total.

Concluzia generală a acestei analize poate fi exprimată în următorul mod: impactul rasei - 26%; impactul aditivilor din făină pe bază de plante - 6%; impactul îmbinării raselor cu aditivi de făină pe bază de plante - 0%; efectul cumulativ al factorilor organizați - 32%; efectul factorilor neorganizați - 68%. impactul tuturor factorilor - 100 %.

Găsiți gradul de impact al factorului A, B, AB și raportul varianței factoriale cu impactul general, e.i., total (general) al factorilor organizați în experiment asupra multiplicității.

Capitolul 7. Analize senzoriale

7. 1. Introducere în analiza senzorială

7.1.1 Aplicarea analizei senzoriale în tehnologia alimentară modernă

În condițiile moderne de creștere a concurenței pe piața alimentară, analiza senzorială devine un instrument foarte important și indispensabil nu numai pentru controlul calității, ci și pentru marketing. Atributele organoleptice ale unui produs alimentar au fost considerate ca factori importanți de la începutul procesului de industrializare a alimentelor datorită influenței lor asupra calității sale generale.

Conform ISO 5492: 2008 "Analiza senzorială - vocabular" analiza senzorială este știința implicată în evaluarea atributelor organoleptice ale unui produs de către simțuri (vedere, miros, gust, atingere și auz). Deci, este folosit pentru a caracteriza și măsura aspectul, aroma, gustul și caracteristicile texturii, precum și caracteristicile sonore (în cazuri particulare) ale produselor alimentare. Mai mult de atât, patru variabile afectează evaluarea senzorială: mâncarea, oamenii, mediul de testare și metodele de testare aplicate.

Analiza senzorială poate fi utilizată în mai multe scopuri diferite. Unele întrebări de analiză senzorială au ca obiectiv descrierea caracteristicilor unui produs și / sau măsurarea oricăror diferențe care se găsesc

între produse. Alte întrebări de analiză senzorială au ca obiectiv descrierea plăcerii sau acceptabilității unui produs. De exemplu: „Ce gust are acest produs?”, „Care sunt cele mai importante trei atribute de textură pe care le percepeți în acest produs?”, „Care sunt diferențele senzoriale dintre produsul A și B?”, „Vă place acest lucru produs?” „Cât de mult vă place acest produs pe o scară de la 1 la 9?” „Este acest produs acceptabil?” „Ce vă place cel mai mult la acest produs?” „Este produsul A mai bun decât produsul B?” „Care dintre cele trei produse A, B sau C preferați?”.

Având în vedere obiectivele menționate, scopurile analizei senzoriale în tehnologia alimentară modernă pot fi definite după cum urmează:

1. detectarea diferențelor senzoriale între produse;
2. să descrie calitativ și cantitativ atributele senzoriale ale alimentelor produse în controlul calității, dezvoltarea produselor, cercetare de piață, comunicare;
3. să evalueze calitatea senzorială a alimentelor: absența defectului și conformitatea cu standardele date;
4. să studieze răspunsurile afective ale consumatorilor la alimente: acceptarea și preferința alimentelor;
5. să studieze relația dintre proprietățile organoleptice și răspunsurile afective ale consumatorilor la alimente (optimizare, diferențiere, inovare);
6. să studieze relația dintre compoziția chimico-fizică și proprietățile senzoriale ale alimentelor (inclusiv efectul condițiilor operaționale în procesarea alimentelor).

Analiza senzorială este o știință naturală. Măsurătorile atributelor senzoriale ale alimentelor trebuie efectuate cu atenție în deplină conformitate cu metodologiile standardizate. În acest caz, informațiile senzoriale pot oferi o perspectivă excelentă asupra lumii. În caz contrar, atunci când măsurile sunt luate prost, ele fac mai mult pentru a induce în eroare decât pentru a informa.

Trebuie implementate și urmărite controale atente atunci când se efectuează analize senzoriale, inclusiv respectarea procedurii de prezentare a probelor, eliminarea subiectivității și a prejudecății, aplicarea metodelor care necesită ca membrii panelului să își demonstreze abilitatea decât să se bazeze pe auto-raportări. Nerespectarea oricăruia dintre aceste controale diminuează valoarea datelor senzoriale colectate. Pe de altă parte, efectuarea controalelor adecvate și asigurarea faptului că acestea sunt la locul lor va avea ca rezultat date fiabile despre alimente pe care niciun instrument nu le poate măsura, adică calitatea alimentelor.

7.1.2. Vocabular și termeni de bază

Tot vocabularul și termenii analizei senzoriale sunt prezentate aici în conformitate cu ISO 5492: 2008 "Analiza senzorială - vocabular". Terminologia generală include următoarele definiții:

- **senzorial** (adj) - referitor la utilizarea simțurilor, adică la experiența unei persoane
- **atribut** (n) - caracteristică perceptibilă
- **organoleptic** (adj) - referitor la un atribut perceptibil de simțuri, adică la un atribut al unui produs
- **evaluator senzorial** (n) - orice persoană care ia parte la un test senzorial. Există două posibilități: un evaluator naiv este o persoană care nu îndeplinește niciun criteriu special și un evaluator inițiat care a participat deja la un test senzorial
- **evaluator selectat** (n) - evaluator ales pentru capacitatea sa de a efectua un test senzorial
- **expert** (n) - în sensul general, o persoană care, prin cunoștințe sau experiență, are competența de a da o opinie în domeniile despre care este consultat
- **expert evaluator senzorial** (n) - evaluator selectat cu o sensibilitate senzorială demonstrată și cu o pregătire și experiență considerabile în testarea senzorială, care este capabil să facă evaluări senzoriale consistente și repetabile ale diferitelor produse
- **grup senzorial** (n) - grup de evaluatori care participă la un test senzorial
- **instruire grupului** (n) - serie de sesiuni în care evaluatorii sunt orientați către sarcinile care trebuie îndeplinite de un grup senzorial în evaluarea anumitor produs(e), care pot include caracteristici relevante ale produsului, scale de evaluare standard, tehnici de evaluare și terminologie
- **consensul grupului** (n) - acord între evaluatori cu privire la terminologia și intensitatea caracteristicilor produsului
- **consumator** (n) - persoană care folosește un produs
- **degustator** (n) - evaluator, evaluator selectat sau expert care evaluează atributele organoleptice ale unui produs alimentar, în special cu gura

- **degustare** (n) - evaluarea senzorială a unui produs alimentar în gură
- **produs** (n) - materie comestibilă sau altfel, care poate fi evaluată prin analize senzoriale
- **probă** (n), **probă de produs** (n) - specimen sau porțiune a produsului prezentat pentru evaluare
- **proba de testare** (n) - probă de material în testare
- **porțiunea de testare** (n) - porțiunea probei testate care este evaluată direct de evaluator
- **punct de referință** (n) - valoarea selectată (a unui sau mai multor atribute sau a unui produs) în raport cu care sunt evaluate probele
- **proba de control** (n) - probă de material evaluat, ales ca referință cu care se compară toate celelalte probe
- **probă de referință** (n) - stimul / substanță, uneori diferit de materialul testat, atent selectat pentru a defini sau ilustra un atribut sau un nivel specificat al unui atribut dat cu care trebuie comparate toate celelalte
- **hedonic** (adj) - referitor la plăcere sau dis plăcere
- **acceptabilitate** (n) - gradul în care un stimul este plăcut sau nu, în general sau pentru anumite atribute senzoriale
- **preferință** (n) - selectarea, de către un evaluator, a unui stimul sau produs asupra altora într-un set dat pe baza criteriilor hedonice
- **aversiune** (n) - senzație de respingere provocată de un stimul
- **discriminare** (n) - act de diferențiere calitativă și / sau cantitativă între doi sau mai mulți stimuli
- **capacitate discriminatoare** (n) - sensibilitate, acuitate, capacitatea de a percepe diferențele cantitative și / sau calitative
- **apetit** (n) - stare fiziologică și psihologică exprimată prin dorința de a mânca și / sau de a bea
- **apetisant** (adj) - descrie un produs capabil să stimuleze apetitul individului
- **gustul** (n) - calitatea unui produs care îl face plăcut să mănânce sau să bea
- **psihofizică** (n) - studiul relațiilor dintre stimulii măsurabili și răspunsurile senzoriale corespunzătoare
- **olfactometrie** (n) - măsurarea răspunsului evaluatorilor la stimulii olfactivi (se referă la evaluatori)
- **olfactometru** (n) - aparat utilizat pentru a prezenta stimulilor olfactivi evaluatorilor în condiții reproductibile
- **odourimetrie** (n) - măsurarea proprietăților de miros ale substanțelor (se referă la produse)
- **odorant** (n) - substanță ale cărei materii volatile pot fi percepute de organul olfactiv (inclusiv nervii)
- **calitate** (n) - colecția de caracteristici și caracteristici ale unui produs, proces sau serviciu care conferă capacitatea sa de a satisface nevoile declarate sau implicite
- **factor de calitate** (n) - un parametru sau caracteristică aleasă printre altele pentru a evalua calitatea generală a unui produs
- **atitudine** (n) - dispoziție de a răspunde într-un mod dat către o clasă de obiecte sau idei
- **masticatie** (n) - act de mestecat, măcinat și mărunțit cu dinții

Pentru terminologia referitoare la simțuri, atributele și metodele organoleptice apelează ISO 5492: 2008 "Analiza senzorială - vocabular".

Există 39 de standarde ISO de analiză senzorială care sunt relevante în prezent. Acestea acoperă toate punctele necesare referitoare la vocabular, organizarea sălilor de testare, evaluatori, metodologie etc. Lista completă a acestora este prezentată mai jos. Cu toate acestea, este revizuită și completată tot timpul (a se vedea lista ISO în curs de dezvoltare de mai jos).

Standard ISO în analiza senzorială:

1. ISO 5492: 2008 Analiza senzorială - Vocabular
2. ISO 20613: 2019 Analiza senzorială - Indicații generale pentru aplicarea analizei senzoriale în controlul calității
3. ISO 8586:2012 Analiza senzorială -- Ghid general pentru selectarea, instruirea și monitorizarea evaluatorilor selectați și experților în domeniul evaluării senzoriale

4. ISO 11037: 2011 Analiza senzorială - Orientări pentru evaluarea senzorială a culorii produselor
5. ISO 8589: 2007 Analiză senzorială - Indicații generale pentru proiectarea sălilor de testare
6. ISO 3591: 1977 Analiză senzorială - Aparat - Pahar de degustare a vinului
7. ISO 16657: 2006 Analiză senzorială - Aparat - Pahar de degustare a uleiului de măsline
8. ISO 13300-1: 2006 Analiză senzorială - Indicații generale pentru personalul unui laborator de evaluare senzorială - Partea 1: Responsabilitățile personalului
9. ISO 13300-2: 2006 Analiză senzorială - Îndrumări generale pentru personalul unui laborator de evaluare senzorială. Partea 2: Recrutarea și instruirea liderilor comisiei
10. ISO 6658: 2017 Analiză senzorială - Metodologie - Îndrumări generale
11. ISO 11132: 2012 Analiza senzorială - Metodologie - Orientări pentru monitorizarea performanței unui grup senzorial cantitativ
12. ISO 8588: 2017 Analiză senzorială - Metodologie - Test „A” - „nu A”
13. ISO 4120: 2004 Analiza senzorială - Metodologie - Test triumfiular
14. ISO 10399: 2017 Analiză senzorială - Metodologie - Test duo-trio
15. ISO 5495: 2005 Analiză senzorială - Metodologie - Test de comparație pereche
16. ISO 8587: 2006 Analiză senzorială - Metodologie - Clasament
17. ISO 13299: 2016 Analiza senzorială - Metodologie - Îndrumări generale pentru stabilirea unui profil senzorial
18. ISO 11036: 1994 Analiză senzorială - Metodologie - Profil de textură
19. ISO 16820: 2004 Analiză senzorială - Metodologie - Analiză secvențială
20. ISO 29842: 2011 Analiză senzorială - Metodologie - Proiecte de blocuri incomplete echilibrate
21. ISO 13302: 2003 Analiză senzorială - Metode de evaluare a modificărilor aromelor produselor alimentare datorate ambalării
22. ISO 13301: 2018 Analiză senzorială - Metodologie - Îndrumări generale pentru măsurarea pragurilor de detectare a mirosului, aromelor și gustului printr-o procedură cu trei variante de alegere forțată (3-AFC)
23. ISO 5496: 2006 Analiză senzorială - Metodologie - Inițierea și instruirea evaluatorilor în detectarea și recunoașterea mirosurilor
24. ISO 11056: 1999 Analiza senzorială - Metodologie - Metoda de estimare a magnitudinii
25. ISO 5497: 1982 Analiză senzorială - Metodologie - Orientări pentru prepararea probelor pentru care analiza senzorială directă nu este fezabilă
26. ISO 11136: 2014 Analiză senzorială - Metodologie - Îndrumări generale pentru efectuarea testelor hedonice cu consumatorii într-o zonă controlată
27. ISO 3972: 2011 Analiză senzorială - Metodologie - Metodă de investigare a sensibilității gustului
28. ISO 16779: 2015 Analiză senzorială - Evaluarea (determinarea și verificarea) duratei de valabilitate a produselor alimentare
29. ISO 4121: 2003 Analiza senzorială - Orietari pentru utilizarea scalelor de răspuns cantitativ
30. ISO 11035: 1994 Analiza senzorială - Identificarea și selecția descriptorilor pentru stabilirea unui profil senzorial printr-o abordare multidimensională
31. ISO 22308: 2005 Dopuri de plută - Analiză senzorială
32. ISO 707: 2008 Lapte și produse lactate - Îndrumări privind prelevarea
33. ISO 22935-1: 2009 Lapte și produse lactate. Analiză senzorială. Partea 1: Îndrumări generale pentru recrutarea, selecția, instruirea și monitorizarea evaluatorilor
34. ISO 22935-2: 2009 Lapte și produse lactate. Analiză senzorială. Partea 2: Metode recomandate pentru evaluarea senzorială
35. ISO 22935-3: 2009 Lapte și produse lactate. Analiză senzorială. Partea 3: Îndrumări privind o metodă de evaluare a conformității cu specificațiile produsului pentru proprietățile senzoriale prin notare
36. ISO 18794: 2018 Cafea - Analiza senzorială - Vocabular
37. ISO 6668: 2008 Cafea verde - Pregătirea probelor pentru utilizare în analiza senzorială
38. ISO 7304-1: 2016 Grâu dur griș și paste alimentare - Estimarea calității gătirii pastelor alimentare prin analiză senzorială. Partea 1: Metoda de referință
39. ISO 7304-2: 2008 Pastele alimentare produse din gris grâu dur. Estimarea calității gătitului prin analize senzoriale. Partea 2: Metodă de rutină

În prezent în curs de dezvoltare (începând cu iulie 2019):

1. ISO / FDIS 16820 Analiză senzorială - Metodologie - Analiză secvențială (anterior ISO 16820: 2004)

2. ISO / CD 11132 Analiză senzorială - Metodologie - Orientări pentru monitorizarea performanței unui grup senzorial cantitativ (anterior ISO 11132: 2012)
3. ISO / DIS 11036 Analiză senzorială - Metodologie - Profil de textură (anterior ISO 11036: 1994)
4. ISO / DIS 8586 Analiza senzorială - Orientări generale pentru selecția, instruirea și monitorizarea evaluatorilor selectați și a evaluatorilor senzoriali experți (anterior ISO 8586: 2012)
5. ISO / DIS 4120 Analiză senzorială - Metodologie - Test triunghiular (anterior ISO 4120: 2004)
6. ISO / DIS 11056 Analiza senzorială - Metodologie - Metoda de estimare a magnitudinii (anterior ISO 11056: 1999, ISO 11056: 1999 / Amd 1: 2013, ISO 11056: 1999 / Amd 2: 2015)
7. ISO / AWI 22308-1 Coaja de plută selectată ca produs de îmbuteliere. Partea 1: Analiza senzorială (anterior ISO 22308: 2005)

7.2 Atributele senzoriale și percepția lor

Oamenii sunt instrumentul principal al analizei senzoriale, deoarece își folosesc simțurile pentru a evalua proprietățile senzoriale (atributele) produselor alimentare. De aceea este atât de important să aveți evaluatori selectați și o comisie instruită. Este crucial pentru controlul calității, deoarece analiza senzorială poate ajuta să răspundă la diferite întrebări:

- Identificați preferințele consumatorilor și motivele pentru care le place acest produs
- Măsurarea rapidă într-o manieră cuantificabilă a atributelor calității produsului
- Alte tehnici analitice uneori nu pot detecta un anumit defect în contrast cu analiza senzorială
- Oamenii sunt cel mai bun instrument pentru detectarea odoranților la niveluri scăzute și singurul care măsoară preferințele
- Asigură produse noi sau chiar inovatoare, rentabile
- Monitorizează modificările de procesare și formulare.

Evaluarea senzorială este disciplina științifică utilizată pentru a evoca, măsura, analiza și interpreta reacțiile la atributele senzoriale ale alimentelor și materialelor, cum ar fi aspectul, aroma, gustul, textura și sunetul, deoarece sunt percepute de simțurile umane ale vederii, mirosului, gust, atingere și auz. Pentru a înțelege puterea evaluării senzoriale, ar trebui dezvoltată o înțelegere a psihologiei și fiziologiei simțurilor de bază. Această înțelegere a simțurilor va ajuta la înțelegerea în continuare a produselor testate.

Structura sistemului senzorial al omului este prezentată în Figura 1. Există cinci organe ale simțului care compun sistemul nostru senzorial și ajută la interacțiunea cu lumea exterioară: ochi, urechi, nas, piele și limbă. Uneori, sistemul vestibular, prin care conștientizăm plasarea noastră în spațiu, menținând echilibrul, senzația de greutate și poziție, este adăugat la această listă ca al șaselea organ al simțului. Aceste organe percep informațiile din lumea exterioară și apoi le transformă într-un impuls nervos care intră în creier pentru a analiza și forma reacția de răspuns. Pentru fiecare organ al simțului corespunde o anumită zonă a cortexului cerebral, care procesează impulsurile.

Vedere. Culoarea este percepția vizuală rezultată din stimularea retinei ochiului de către lumină (lungimi de undă cuprinse între 380 și 760 nm).

Primele atribute au afectat adesea calitatea alimentelor: culoarea și aspectul, precum și limpiditatea băuturilor. Importanța culorii este demonstrată și în alimente precum vinul, uleiul de măsline și șerbetul, în care culoarea afectează percepția altor atribute datorită asocierii cu culoarea lor. Într-adevăr, oamenii se așteaptă adesea ca o băutură galbenă să aibă aromă de lămâie, precum și căpșuna roșie ar trebui să aibă o aromă dulce.

Factorii care afectează percepția vederii includ: intensitatea sursei de lumină, distribuția lungimii de undă în sursa de lumină, caracteristicile de absorbție sau transmisie, caracteristicile suprafeței și forma unui produs, reflectanța, textura sau suprafața unui produs. Factorii fiziologici includ starea de adaptare, angel?, sensibilitatea ochiului la anumite lungimi de undă și deficiențe în vederea culorii.

Pentru a obține rezultate de testare fiabile, testerii trebuie verificați pentru absența deficiențelor în vederea culorii. Acest lucru se poate face utilizând diferite teste (a se vedea secțiunea 3.2). Mai mult decât atât, ar trebui stabilite standardele pentru evaluarea vizuală (memorie, plăci de culoare fizice sau produse model). Condițiile de iluminare pentru evaluarea unui anumit produs trebuie să fie predeterminate - probele trebuie evaluate în viitor cu aceeași sursă de lumină. În caz contrar, s-ar putea să apară o

combinare metameră, atunci când o pereche de probe pot părea a fi potrivite într-o singură condiție de lumină, dar nepotrivire în majoritatea celorlalte condiții.

Sunet. Undele sonore sunt produse prin vibrații care se strâng împreună sau răspândesc molecule în aer. Sunetul poate fi descris în termeni de frecvență și amplitudine. Se măsoară în frecvență (Hz) - numărul de cicluri pe care o undă sonoră le poate realiza într-o secundă. Frecvența corespunde înălțimii sunetului. Amplitudinea este presiunea maximă creată de undele sonore. Amplitudinea este adesea măsurată în decibeli și corespunde percepției zgomotului.

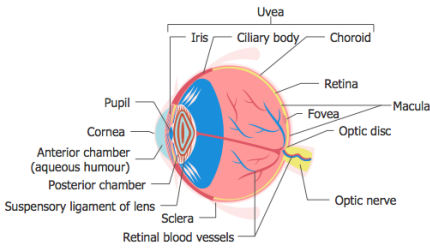
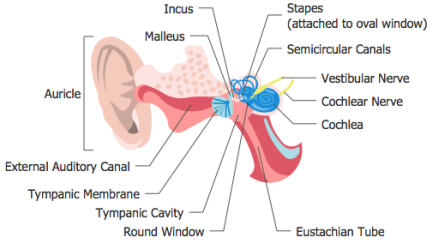
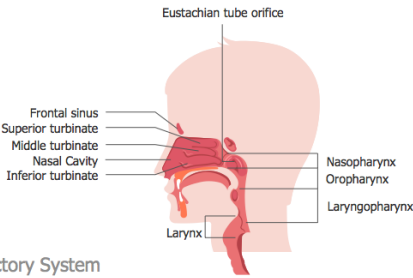
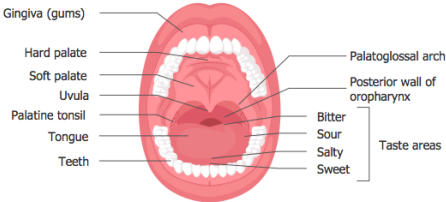
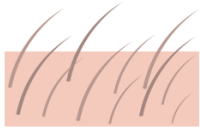
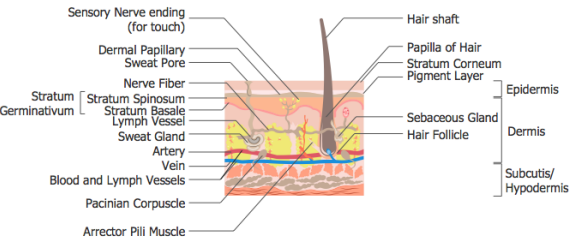
Sistem senzorial	
 Eye	 Visual System
 Ear	 Auditory System
 Nose	 Olfactory System
 Tongue	 Gustatory Organ
 Skin	 Integumentary System

Figura 1 - Structura sistemului senzorial uman
(sursă: <https://www.conceptdraw.com/solution-park/health-human-anatomy>)

Undele sonore lovesc membrana timpanică și acestea îi provoacă vibrația. Această vibrație este apoi trecută prin urechea medie către cohlea plină de lichid din urechea internă. În urechea internă vibrația este preluată de celulele senzoriale care apoi o trimit la creier de-a lungul nervului auditiv.

Factorii care afectează percepția sunetului includ: deficiențe de auz, surditate de transmisie, surditate nervoasă și interacțiune cu alte simțuri.

Sunetul este atributul important în evaluarea caracteristicilor de calitate ale unor produse precum ciocolata, de exemplu.

Aroma și gustul. Simțul mirosului este foarte complex. Aroma și gustul sunt simțuri chimice care sunt stimulate de proprietățile chimice ale moleculelor de miros. Pentru ca omul să simtă aroma și gustul aceste molecule trebuie să ajungă la bulbul olfactiv pentru a interacționa cu celulele olfactive din mucoasa olfactivă. Mirosurile sunt detectate prin respirația aerului care transportă molecule de miros. De aceea, pentru a mirosi, moleculele trebuie să fie volatile. Aerul cu molecule de miros volatile vine în contact cu micii receptori ai mirosului ridicat în cavitatea nazală. Acești receptori trimit informații mai întâi nervilor olfactivi și apoi aceștea le transmit creierului. Reacția specifică cu molecula de miros rămâne încă necunoscută. Un termen „gust” este o combinație de experiențe, inclusiv senzații de vedere, miros, temperatură, durere, presiune și textură. Prin definiție, gustul se bazează pe judecata umană.

Factorii care afectează sensibilitatea la miros includ interacțiunile cu alte simțuri umane, cum ar fi gustul și vederea. Culoarea poate provoca uneori percepția mirosului atunci când nu este prezentă în realitate, precum și percepții crescute sau chiar percepții distorsionate. Mirosurile sunt supuse adaptării. Alți factori care afectează sensibilitatea mirosului includ: sex, vârstă, fumat și tulburări olfactive (hiposmie, hipersomnie, anosmie și disomie).

Gust. Simțul gustului este un sens chimic. Acesta este detectat de celulele gustative, situate pe partea din față și din spate a limbii și pe părțile laterale, în spatele și pe cerul gurii. Aceste celule receptoare, sau papilele gustative, se leagă de moleculele din alimentele sau băuturile consumate și trimit semnale către creier. În general, este acceptat faptul că oamenii ar putea distinge între cinci și șase gusturi de bază: sărat, dulce, amar, acru, umami și gras. Factorii care afectează sensibilitatea gustului includ: vârsta, fumatul, vâscozitatea produselor, tulburările gustului (ageusia, non-tasteri, hipogeuzie, hipergeuzie, disgeuzie) și temperatura.

Simțul Tactil. Acesta este simțul senzațiilor pe piele (inclusiv limba). Pielea omului este cel mai mare sistem senzorial care conține numeroși receptori. Acești receptori au terminații nervoase libere cu ajutorul cărora oamenii simt atingerea, presiunea, căldura, frigul și durerea. Cele mai multe senzații de pe piele sunt o combinație de senzații. Mai mult, nu toate părțile pielii sunt la fel de sensibile la presiune, atingere, temperatură etc. Simțul tactil ajută la luarea deciziilor și ne ajută să evităm durerea. Deși acest organ al simțului este adesea subestimat în evaluarea senzorială, atributele tactile joacă un rol important în evaluarea produselor pe care le consumăm. De exemplu, ciocolată caldă, limonadă cu gheață etc.

Textură. Textura este definită ca „suma totală a senzațiilor kinestezice (simț muscular) și cutanate derivate din manipularea manuală și orală”. Include simțul gurii, proprietăți de mestecat, proprietăți reziduale și chiar proprietăți vizuale și auditive ale alimentelor.

Prima mușcătură sau faza inițială include evaluarea caracteristicilor mecanice ale durității, distructibilității și vâscozității. În plus, sunt evaluate și caracteristicile geometrice inițiale. A doua, faza de mestecat, acoperă evaluarea caracteristicilor mecanice ale vâscozității, masticabilității și aderenței, precum și caracteristicile geometrice observate în timpul mestecării. A treia fază, reziduală, include evaluarea modificărilor cauzate de caracteristicile mecanice și geometrice în timpul mestecării. Senzația de mâncare este asociată cu alte senzații care apar simultan în timpul unei alimentații “normale”.

Toate simțurile împreună joacă un rol cheie în dezvoltarea gustului produsului, deoarece ajută oamenii să perceapă atributele alimentelor și băuturilor: culoare, aromă și miros, simțul în mână sau gură, sunetul la urechi și, în cele din urmă, gust.

7.3 Cerințe pentru laboratoarele de analiză senzorială. Recunoaștere națională și internațională

Informațiile furnizate în această secțiune corespund pe deplin ISO 8589: 2007 Analiză senzorială - Indicații generale pentru proiectarea sălilor de testare. Acest standard internațional oferă îndrumări generale pentru proiectarea sălilor de testare destinate analizei senzoriale a produselor. Descrie cerințele pentru înființarea unei camere de testare care cuprinde o zonă de testare, o zonă de pregătire și un birou, specificând zonele esențiale sau cele care sunt doar de dorit.

Acest standard internațional nu este specific pentru niciun produs sau tip de test. Atât produsele alimentare, cât și cele nealimentare pot fi evaluate în astfel de spații de testare. Cu toate acestea, adaptarea sălilor de testare poate fi necesară pentru fiecare utilizare specializată.

Mai mult, deși multe dintre principiile generale sunt similare, acest standard internațional nu se referă la sălile de testare pentru evaluarea specializată a produselor alimentare care sunt inspectate sau care se află sub controlul calității direct la întreprindere.

În diferite țări, acest standard este tradus în limbile naționale, iar introducerea națională este adăugată la început. Încă mai poate exista o situație în unele țări din Europa de Est, când standardele internaționale nu sunt prezente în limbile naționale din cauza lipsei de timp și resurse. Cu toate acestea, în toate domeniile, instrucțiunea este valabilă - dacă există un standard internațional ISO, ghidați-vă în absența unui standard național.

7.3.1. Proiectarea sălilor de testare

Sălile de testare tipice pentru analiza senzorială a produselor constau din:

- sectorul de testare în care munca poate fi efectuată atât individual în cabine de testare, cât și în grup;
- sectorul de pregătire a probelor;
- birou;
- vestiar și toaletă;
- zona de depozitare a stocurilor;
- zona de depozitare a probelor;
- cameră de odihnă pentru degustatori.

Cerințele minime sunt următoarele:

- sectorul de testare în care munca poate fi efectuată atât individual în cabine de testare, cât și în grup;
- sectorul de pregătire a probelor.

Sala de testare trebuie să fie accesibilă degustatorilor și nu trebuie să fie amplasată în zone cu trafic intens, cu excepția cazului în care s-au luat măsuri pentru reducerea zgomotului și a factorilor de distragere a atenției. De asemenea, este necesar să se ia măsuri pentru a asigura accesibilitatea acestui loc pentru persoanele cu dizabilități.

Este recomandabil, dar nu obligatoriu, să existe o cameră pentru degustatori unde aceștea să se poată reuni sau să se odihnească înainte de a intra în spațiul de lucru. Aceste camere trebuie să fie amenajate astfel încât să poată fi curățate cu ușurință și să mențină igiena.

Deci, principiile de bază care ghidează proiectarea sălilor de testare pentru analiza senzorială a produselor sunt:

- evaluarea senzorială trebuie efectuată în condiții cunoscute și controlate, cu un minim de factori de distragere a atenției;
- sala de testare trebuie să contribuie la reducerea influenței factorilor psihologici și a condițiilor fizice inerente omului.

ISO 8589: 2007 Analiza senzorială - Ghidul general pentru proiectarea sălilor de testare conține 4 exemple de proiecte ale sălilor de testare.

Proiectarea sectorului de testare

Cerințe generale

Locație. Sectorul de testare trebuie amplasat în apropierea secțiunii de preparare a probelor pentru a facilita prezentarea probelor. Cu toate acestea, acestea trebuie să fie separate pentru a preveni diferite tipuri de interferențe (de exemplu, zgomot și miros). Degustatorii nu ar trebui să intre sau să părăsească sectorul de testare prin sectorul de pregătire, deoarece acest lucru poate duce la abateri în rezultatele testelor.

Temperatura și umiditatea relativă. Temperatura și umiditatea relativă din sectorul de testare trebuie controlate. Nivelul temperaturii aerului și umidității relative trebuie să fie confortabil pentru degustatori, cu condiția ca testarea produsului să nu necesite condiții neobișnuite.

Zgomot. Nivelul de zgomot ar trebui să fie minim în timpul testului, deoarece acesta poate, de asemenea, distra degustatorii. Este de dorit ca camera să fie izolată fonic, iar podeaua să reducă la minimum zgomotul asociat cu obiectele care merg sau se deplasează.

Mirosuri. Sectorul de testare ar trebui să fie lipsit de mirosuri. Acest lucru poate fi realizat fie prin instalarea unui aparat de aer condiționat cu filtre de cărbune activ, fie prin crearea unei presiuni ușor pozitive pentru a reduce fluxul de aer din alte zone. Mai mult, sectorul de testare trebuie să fie echipat cu materiale ușor de curățat și care nu acumulează mirosuri. Mobilierul, covoarele, scaunele etc. nu trebuie să aibă mirosuri care pot afecta evaluarea. Detergenții utilizați pentru curățare nu ar trebui să lase mirosuri în sectorul de testare.

Decorațiuni interioare. Culorile pereților și mobilierului din sectorul de testare trebuie să fie neutre pentru a nu provoca modificări în culorile probelor. Culorile recomandate sunt mat, nu alb pur sau nuanțe de gri deschis neutru.

Illuminat. Sursa, tipul și gradul de iluminare sunt de o mare importanță în evaluarea senzorială. Ar trebui acordată atenție iluminării generale a tuturor zonelor și, dacă este posibil, iluminării fiecărei cabine. Iluminarea sectorului de testare trebuie să fie uniformă, controlată și fără umbră.

La evaluarea culorii produselor sau materialelor, poate fi importantă iluminarea specială. Mai mult, ar putea fi necesare dispozitive speciale de iluminare pentru a masca diferența de culoare sau vizuală în unele cazuri, atunci când este necesar să se evite influența lor asupra rezultatelor testului. Dispozitivele care pot fi utilizate includ: reostat pentru reglarea intensității luminii; surse de lumină colorată; filtre de culoare; culoare neagra; surse monocromatice, cum ar fi lămpile de sodiu.

Cabine de testare

Cerințe generale. Atunci când se evaluează cu diferite metode de analiză senzorială, degustătorilor li se propune să prezinte concluzii individuale independente despre produsele care sunt analizate. Pentru a evita posibilitatea influenței altor degustători, precum și pentru a minimiza influența altor factori de distragere a atenției, se utilizează cabine individuale.

Numărul de cabine depinde de disponibilitatea spațiului, precum și de tipul de evaluare efectuată. Ar trebui să permită circulația liberă și furnizarea de probe din sectorul de pregătire a probelor.

Instalarea cabinelor. Se pot folosi atât cabine portabile permanente, cât și temporare. În zilele noastre, toate cabinile sunt echipate cu ferestre pentru servirea probelor. Astfel de ferestre ar trebui să asigure trecerea liberă a probelor de produse fără dificultăți și ar trebui să fie închise prin uși glisante sau huse. Ferestrele ar trebui să fie proiectate astfel încât testerii să nu poată vedea pregătirea sau codificarea probei.

Prizele trebuie să fie asigurate și amplasate convenabil în cabină pentru utilizarea echipamentelor electrice. Atunci când se utilizează echipamente informatice, este necesar să-i localizăm componentele pentru a nu distra degustătorii de la evaluarea senzorială. De asemenea, este util să numerotați cabinile sau să le etichetați într-un fel pentru identificarea și amplasarea ușoară a degustătorilor.

Poziție și dimensiune. Spațiul de lucru din fiecare cabină de testare ar trebui să fie suficient de mare pentru a găzdui:

- probe;
- instrumente;
- scuipătoare;
- chiuveță;
- agent de clătire;
- formulare de răspuns și stilou sau dispozitiv pentru introducere computerizată.

În spațiul de lucru trebuie, de asemenea, să fie prevăzut un spațiu suficient pentru a completa formularele de răspuns sau pentru a găzdui echipamente informatice pentru transmiterea reacțiilor testerilor.

Spațiul de lucru trebuie să aibă cel puțin 0,9 m lățime și cel puțin 0,6 m adâncime. Dacă este nevoie de echipament suplimentar, poate fi necesară mărirea dimensiunii cabinei. Mai mult, spațiul de lucru al cabinei de testare trebuie să aibă o înălțime adecvată pentru a testa probele în confort.

Peretii despărțitori laterali dintre cabine ar trebui să se extindă dincolo de desktop pentru a ascunde parțial degustătorii - 0,3 m este considerat suficient. Pentru a asigura izolarea completă a degustătorilor, pereții despărțitori pot fi amplasați de la podea până la tavan. Cu toate acestea, proiectarea lor trebuie să asigure o ventilație și o curățare adecvată. De asemenea, sunt permisi pereți despărțitori suspendați.

Dacă acest lucru este prevăzut de legislația locală, cel puțin o cabină ar trebui să fie proiectată cu o astfel de lățime și înălțime încât să poată fi folosită pentru lucru de către un degustător cu scaun cu roțile.

Culoarea cabinelor. Interiorul cabinei de uz general trebuie să fie de culoare gri mat, cu un factor de luminozitate de aproximativ 15%. Dacă este necesar să comparați în principal culorile deschise și nuanțele de alb murdar, interiorul cabinei poate fi vopsit pentru a oferi un factor de luminozitate de 30% sau mai mult pentru a reduce contrastul luminozității cu culoarea de testare.

Iluminat liniile directoare sunt aceleași ca și pentru sălile de testare.

Sectorul pentru munca în echipă

Cerințe generale. Este necesar să se prevadă un sector de lucru în echipă pentru discuții între degustători și operator. Acest sector poate fi utilizat în timpul sesiunilor inițiale de training și în orice moment când este necesară discuția între degustători.

Acest sector ar trebui să fie suficient de mare pentru a găzdui o masă cu scaune confortabile pentru toți degustătorii care efectuează simultan teste. Masa trebuie să aibă suficient spațiu pentru a putea pune pe ea:

- o tavă sau alt dispozitiv în care ar trebui să fie formulare de răspuns și probe pentru fiecare degustator;
- materiale suplimentare, cum ar fi probe de referință, dacă sunt utilizate, precum și pixuri, creioane sau cupe;
- computer (dacă este necesar).

Pentru a transfera probele, este util să fie prevăzută o secțiune mobilă în centrul mesei. De asemenea, masa poate fi echipată cu panouri detașabile care împart degustătorii pentru munca individuală. Pentru a înregistra momente de discuție, trebuie furnizate o tablă / tablă albă și cretă / markere sau o hartă.

Iluminat liniile directoare sunt aceleași ca și pentru sălile de testare.

Proiectarea sectorului de pregătire a probelor

Cerințe generale. Laboratorul (sau bucătăria) pentru prepararea probelor ar trebui să fie amplasat în imediata apropiere a sectorului de testare, dar, așa cum s-a menționat deja, ar trebui să fie amplasat astfel încât degustătorii să nu fie nevoiți să treacă prin acesta în drum spre sectorul de testare.

Sectorul de preparare a probelor ar trebui să fie bine ventilat pentru a elimina mirosurile de gătit și mirosurile exterioare. Materialele selectate pentru podea, pereți, tavan și mobilier ar trebui să fie ușor de prelucrat, să nu aibă miros și să fie impermeabile la mirosuri.

Echipament

Echipamentul din sectorul de preparare a probelor depinde de gama de produse care urmează să fie prelucrate.

Principalele elemente sunt următoarele:

- suprafața de lucru;
- chiuvetă sau alte echipamente necesare spălării probelor;
- echipamente, inclusiv electrice, pentru depozitarea, pregătirea, controlul și servirea probelor (de exemplu, recipiente, vase, diferite dispozitive etc.) în stare de lucru satisfăcătoare, calibrate pentru testare;
- detergenți;
- Recipient pentru deșeuri;
- condiții de depozitare.

Rezervoarele pentru prepararea și depozitarea probelor, precum și vasele și cuțitele utilizate la prepararea probelor, ar trebui să fie realizate din materiale care să nu confere produselor mirosuri sau gusturi secundare și să prevină falsificarea și contaminarea probelor.

Birou

Cerințe generale. Biroul este un sector de lucru în care sunt executate documentele legate de performanța evaluării senzoriale. Este necesar ca biroul să fie separat de sectorul de testare, dar alăturat acestuia.

Mărimea. Ar trebui oferit suficient spațiu pentru planificarea testelor, dezvoltarea formularelor de răspuns, sortarea și decodificarea formularelor de răspuns, analiza datelor statistice, rapoarte scrise și, dacă este necesar, pentru întâlniri cu clienții pentru a discuta testele și rezultatele.

Echipament. În funcție de specificul sarcinii care urmează să fie efectuată în birou, acesta poate fi echipat cu următoarele echipamente: un birou, un dulap, o bibliotecă, scaune, un telefon, un calculator și un computer pentru analiza datelor statistice.

De asemenea, biroul poate găzdui un mijloc de fotocopiere și stocare a documentației.

ISO 8589: 2007 Analiză senzorială - Îndrumări generale pentru proiectarea sălilor de testare conțin exemple de proiectare a sectorului de testare, proiectare cabine, proiectare geamuri cabine și exemple de diferite amplasări a cabinelor.

7.3.2. Selectarea grupului și instruirea

Informațiile furnizate în această secțiune corespund pe deplin ISO 8586: 2012 Analiza senzorială - Linii directoare generale pentru selecția, instruirea și monitorizarea evaluatorilor selectați și a evaluatorilor senzoriali experți. Prezentul standard internațional specifică criteriile de selecție și procedurile pentru formarea și monitorizarea evaluatorilor selectați și a evaluatorilor senzoriali experți.

Având în vedere că un grup de analiză senzorială constituie un adevărat „instrument de măsurare”, rezultatele analizei depind de fiecare membru al acestuia. De aceea, recrutarea persoanelor care doresc să participe la un grup trebuie să fie efectuată cu grijă și să fie considerată un instrument real, atât în timp cât și în bani. Nu fiecare persoană are capacitatea de a efectua o evaluare senzorială. Mai mult, chiar dacă persoana a demonstrat capacitatea de a participa la evaluarea senzorială, ar trebui să se desfășoare instruire suplimentare pentru diferite tipuri de produse.

Evaluarea senzorială poate fi efectuată de trei tipuri de evaluatori:

1. *Evaluatori senzoriali* - orice persoană care ia parte la un test senzorial. Pot fi „evaluatori naivi” care nu trebuie să îndeplinească niciun criteriu precis sau „evaluatori inițiați” care au participat deja la testele senzoriale.
2. *Evaluatori selectați* sunt aleși pentru capacitatea lor de a efectua un test senzorial.
3. *Evaluatori senzoriali experți* - evaluatori selectați cu o sensibilitate senzorială demonstrată și cu o pregătire și experiență considerabilă în testarea senzorială, care sunt capabili să facă evaluări senzoriale consistente și repetabile ale diferitelor produse. Orice persoană înainte de participarea la testele senzoriale ar trebui evaluată prin procedura specială. În primul rând, este întotdeauna necesar să se efectueze o selecție preliminară a candidaților în etapa de recrutare, pentru a-i elimina pe cei care ar putea fi nepotriviti pentru analiza senzorială. Cu toate acestea, selecția finală se poate face numai după selecție și training. Metodele de selecție și training care urmează să fie utilizate depind de sarcinile destinate pentru „evaluatorii selectați” și „evaluatorii senzoriali experți”. Conform ISO 8586: 2012 Analiza senzorială - Linii directoare generale pentru selecția, instruirea și monitorizarea evaluatorilor selectați și evaluatorilor senzoriali experți, întregul proces poate fi algoritmicizat așa cum este descris în Figura 2.

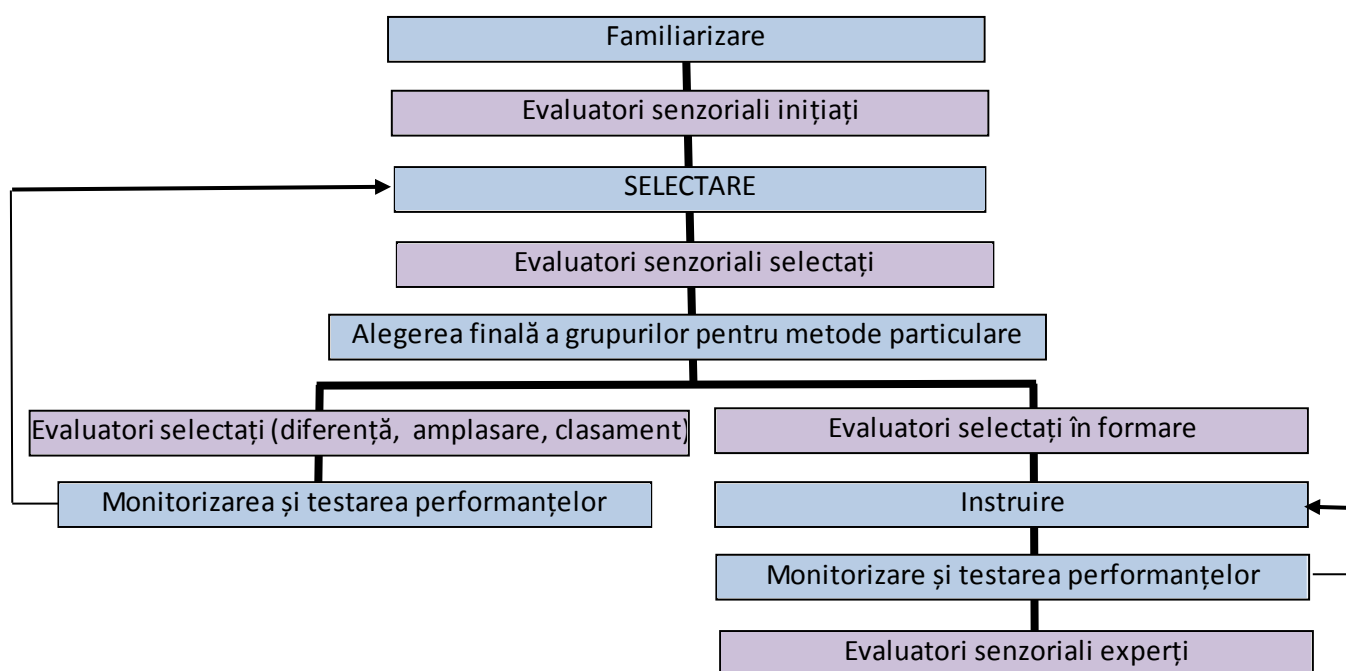


Figura 2 - Procesul de selecție, formare și monitorizare a evaluatorilor selectați și a evaluatorilor senzoriali experți (oferit de ISO 8586: 2012 Analiza senzorială - Linii directoare generale pentru selecția, instruirea și monitorizarea evaluatorilor selectați și a evaluatorilor senzoriali experți)

Deci, procedura recomandată implică:

- recrutarea și screeningul preliminar al evaluatorilor naivi;
- familiarizarea evaluatorilor naivi care urmează să devină evaluatori inițiați;

- selectarea evaluatorilor inițiați pentru a determina capacitatea acestora de a efectua teste speciale, care apoi devin evaluatori selectați;
- pregătirea posibilă a evaluatorilor selectați pentru a deveni evaluatori senzoriali experți.

Procedurile exacte de recrutare și familiarizare și natura testelor în etape ulterioare depind de sarcinile destinate grupului.

Evaluatorii senzoriali funcționează ca un grup care este gestionat de un lider de grup. În anumite cazuri (în special pentru analiza senzorială descriptivă), grupul poate fi împărțit în subgrupuri specializate. În cazul unui grup de evaluatori senzoriali experți, liderul grupului este responsabil pentru monitorizarea generală a grupului și pentru instruirea acestora. Evaluatorii senzoriali experți nu sunt responsabili pentru alegerea testelor utilizate, prezentarea probelor sau interpretarea rezultatelor. Aceste chestiuni sunt responsabilitatea liderului de grup care decide, de asemenea, cât de multe informații sunt oferite grupului. În cazul unui grup de evaluatori selectați, performanța acestora trebuie monitorizată în mod regulat pentru a se asigura că criteriile după care au fost selectați inițial continuă să fie îndeplinite.

Selecția evaluatorilor

Generalități. Următoarele caracteristici generale sunt cerute participanților dispuși pentru instruire:

- vor fi motivați și interesați să își dezvolte în continuare abilitățile senzoriale;
- vor fi dispuși să participe.

Recrutarea. În această etapă este necesar să răspundeți la următoarele întrebări:

1. De unde ar trebui căutați oameni pentru a constitui grupul?
2. Câți oameni vor fi selectați?
3. Cum vor fi selectați oamenii?

Există 2 tipuri de recrutare:

- Internă - când organizațiile recrutează personal din departamentele lor;
- Externă - atunci când organizațiile recrutează oameni din exterior.

Mai mult, poate fi organizat un grup mixt format din evaluatori interni și externi.

Există avantaje și dezavantaje ale ambelor tipuri de recrutare. Pentru recrutarea internă, principalul avantaj este că oamenii sunt disponibili tot timpul și nu este necesar să le plătiți bani în plus pentru testele senzoriale. Cu toate acestea, ei sunt influențați în judecățile lor de cunoașterea produsului. Un alt avantaj este că în cazul recrutării interne se asigură o confidențialitate mai bună, ceea ce este important pentru activitatea de cercetare. Pe de altă parte, înlocuirea candidaților este mai dificilă și sunt mai puțin oameni din care se poate alege. Mai mult, organizațiile se pot confrunta cu lipsa disponibilității membrilor personalului în timpul testelor senzoriale.

Printre avantajele recrutării externe se numără o gamă mai largă de opțiuni, o aprovizionare ulterioară cu persoane noi, o selecție mult mai ușoară (fără riscul de a ofensa persoane dacă nu sunt adecvate), o disponibilitate ușoară. Pe de altă parte, dezavantajele sunt:

- costurile mari,
- eficiență ridicată numai în comunitățile urbane,
- întrucât este necesar ca indivizii să fie disponibili, se întâlnește uneori un număr disproporționat de pensionari, femei șomere sau studenți;
- existe întotdeauna riscul ca oamenii să plece după ce aceștia au fost plătiți pentru selecție și training.

Numărul de persoane care urmează să fie selectate. Experiența a arătat că aproximativ jumătate din oameni sunt eliminați în timpul procedurilor de selecție din diferite motive. Deci, numărul persoanelor care urmează să fie recrutate variază în funcție de următoarele:

- mijloacele financiare și recrutările organizației;
- tipurile și frecvența testelor care trebuie efectuate;
- Dacă este sau nu necesară interpretarea statistică a rezultatelor.

Este de dorit ca un grup să aibă cel puțin 10 evaluatori selectați. Deci, este general acceptat faptul că, pentru a obține un grup din acest număr de persoane, ar trebui recrutați de la 40 până la 60 de persoane și ar trebui selectate minimum 20 de persoane.

Informații suplimentare și preselecție

Informațiile suplimentare se obțin de obicei din chestionarele completate de candidați, precum și prin interviuarea candidaților de către persoane cu experiență în analiza senzorială.

Criterii generale. Printre criteriile generale pentru selecția candidaților se numără următoarele:

1. Disponibilitate. Candidații vor avea timp să participe atât la instruire, cât și la evaluări.
2. Atitudini față de alimente. Candidații nu trebuie să aibă antipatii puternice pentru anumite alimente și băuturi (în special pentru cei supuși unei evaluări senzoriale), precum și interdicții culturale și orice alte interdicții pentru consumul de produse.
3. Cunoștințe și aptitudini. Percepțiile senzoriale inițiale ale candidaților trebuie interpretate și exprimate, necesitând anumite abilități fizice și intelectuale, în special capacitatea de concentrare și de a rămâne neafectate de influențele externe.
4. Abilitatea de a comunica și de a descrie. Această abilitate este extrem de importantă pentru candidații selectați pentru analize descriptive, deoarece implică necesitatea de a-și descrie senzațiile percepute în timpul evaluării. Candidații este de dorit să aibă o memorie senzorială bună și să poată descrie în cuvinte caracteristicile unui produs.

Sănătate. Candidații trebuie să aibă o sănătate bună. Nu ar trebui să aibă boli cronice care pot afecta simțurile, precum și alergii. Candidații nu ar trebui să ia medicamente care pot slăbi percepția senzorială și, prin urmare, își pot face judecățile nesigure. De asemenea, este util să aflați dacă candidații au sau nu proteze dentare, deoarece acest lucru poate afecta unele tipuri de evaluare cu privire la textura sau gustul produselor. Răcelile sau condițiile temporare temporare (de exemplu, sarcina) nu ar trebui să fie un motiv pentru respingerea unui candidat.

Criterii psihologice care sunt importante:

- Interes și motivație;
- Conștientizarea responsabilității și capacitatea de concentrare;
- Abilitatea de a judeca;
- Dorința de a coopera.

Alți factori. În plus față de informațiile menționate mai sus, în timpul recrutării candidaților pot fi obținute și următoarele informații: nume, prenume, grupă de vârstă, sex, naționalitate, educație, loc de muncă actual și experiență în efectuarea analizei senzoriale. De asemenea, se poate observa dacă candidatul fumează sau nu. Cu toate acestea, fumatul, de regulă, nu ar trebui să fie motivul respingerii unui candidat.

Screening

Testele care pot fi utilizate pentru selectarea candidaților sunt separate în 3 grupe:

- a) teste care vizează identificarea neconformității cu cerințele de bază;
- b) teste care vizează determinarea dezvoltării simțurilor;
- c) teste care vizează identificarea capacității unui candidat de a descrie și transfera sentimentele.

Scopul acestor teste este familiarizarea candidaților cu metodele și materialele utilizate în timpul analizei senzoriale.

Vederea cromatică. Candidații cu anomalii ale vederii culorilor nu sunt potriviți pentru efectuarea testelor care includ evaluarea culorii. Un test de vedere a culorilor poate fi efectuat folosind un test eficient, cum ar fi testul Ishihara sau testul de vedere Farnsworth-Munsell 100 HueColor.

Pierderea gustului și a mirosului. Este recomandabil să verificați sensibilitatea candidaților la substanțe care pot fi prezente în cantități mici în produse, pentru a dezvălui o pierdere de gust, miros sau o posibilă lipsă de sensibilitate. Probele de substanțe sunt pregătite pentru degustare după gust și miros cu concentrații care depășesc semnificativ valorile de prag. Exemple de substanțe care pot fi utilizate:

- gusturi: dulce, acru, amar, sărat, umami, astringent, metalic etc.;
- mirosuri: lămâie, vanilie, cimbru, florale etc.

Metodologia testului, precum și substanțele și concentrația acestora pentru prepararea soluțiilor sunt descrise în detaliu în ISO 8586: 2012 Analiza senzorială - Linii directoare generale pentru selecția, instruirea și monitorizarea evaluatorilor selectați și a evaluatorilor senzoriali experți.

Instruire

Instruirea este necesară pentru a oferi evaluatorilor cunoștințe de bază despre procedurile efectuate în timpul analizei senzoriale și pentru a-și dezvolta capacitatea de a identifica, recunoaște și

descrie stimuli, precum și pentru a permite evaluatorilor să folosească experiența în acest mod pentru a fi fluent în aceste metode pentru anumite produse.

Numărul de evaluatori care urmează instruirea ar trebui să fie de 1,5-2 ori mai mare decât este necesar pentru formarea finală a grupului. Pentru a asigura abordarea corectă a analizei senzoriale, toate instruirile ar trebui să se desfășoare într-un cadru adecvat, în conformitate cu recomandările prezentate în ISO 6658: 2017 Analiză senzorială - Metodologie - Îndrumări generale.

Evaluatorii trebuie să fie instruiți să fie întotdeauna obiectivi și să-și negligeze dependența sau antipatia. Mai mult decât atât, nu ar trebui să folosească produse cosmetice aromate înainte sau în timpul testelor și să se abțină de la fumat sau de la contactul cu fumătorii sau gusturi puternice și mirosuri cu cel puțin 60 de minute înainte de test. În caz contrar, ar putea aduce mirosuri extrinseci în sala de testare care pot influența rezultatele testelor.

Antrenament pentru a percepe culoarea, gustul, mirosul și textura include 6 tipuri de teste.

1. *Teste pentru determinarea stimulului.* Aceste teste se bazează pe metoda triunghiului (a se vedea secțiunea 4). În timpul unei sesiuni se examinează o singură substanță. Fiecare candidat primește două probe de substanță de testat și o probă de apă sau altă substanță neutră / sau o probă de substanță de testat și două probe de apă sau altă substanță neutră. Concentrația substanței testate trebuie să fie peste valoarea minimă. Incapacitatea de a identifica diferențele după mai multe teste repetate indică inadecvarea candidatului pentru a efectua teste de acest tip.
2. *Teste pentru determinarea diferitelor niveluri de intensitate a stimulului.* Aceste teste se bazează pe metode care utilizează scale și categorii (a se vedea secțiunea 4). Testele se efectuează folosind stimuli pentru gust, miros (numai în concentrații foarte mici), atingere (în gură și cu mâna) și viziunea culorilor. În fiecare test, candidaților li se furnizează aleatoriu patru probe de concentrații diferite ale substanței testate, pe care candidații trebuie să le plaseze în ordinea intensității creșterii stimulului. Ordinea aleatorie trebuie să fie aceeași pentru toți candidații, astfel încât, la compararea rezultatelor, să fie evident că acestea nu au depins de ordinea de familiarizare cu probele. Un rezultat satisfăcător la acest test poate fi determinat numai pe baza concentrațiilor particulare.
3. *Abilitatea de a descrie sentimentele.* Aceste teste au ca scop verificarea capacității candidaților de a-și descrie sentimentele. Se recomandă efectuarea a două teste: unul bazat pe percepția mirosurilor, celălalt - la atingere.
4. *Descrierea mirosului.* Candidaților li se oferă de la 5 la 10 probe de diferiți stimuli olfactivi, de preferință legate de produse care vor fi analizate în continuare. Trusa ar trebui să fie formată din mai multe probe ușor de recunoscut, iar restul ar trebui să fie mai puțin recognoscibile. Intensitatea ar trebui să depășească cu mult pragul percepției, dar să nu depășească prea mult concentrația în acele produse care vor fi analizate în continuare. Un rezultat satisfăcător la acest test poate fi determinat numai pe baza substanțelor particulare.
5. *Test de descriere a texturii.* Candidații primesc truse cu probe fără o ordine specială și trebuie să descrie textura lor. Probele de produse solide trebuie prezentate sub formă de blocuri de aceeași dimensiune, iar substanțele lichide trebuie prezentate în recipiente opace. Un rezultat satisfăcător la acest test poate fi determinat numai pe baza substanțelor utilizate.
6. *Recunoașterea diferențelor de textură.* Metoda utilizată: testul de clasare (a se vedea secțiunea 4). Un rezultat satisfăcător la acest test - cel puțin 80% din probe sunt localizate corect.

Pregătirea pentru identificarea și recunoașterea gusturilor și mirosurilor. Testul pentru detectarea substanțelor identice, test de comparație asociat, metode triunghi și duo-trio în conformitate cu ISO 6658: 2017 Analiză senzorială - Metodologie - Îndrumări generale sunt utilizate în această etapă. Mai mult, testele de identificare sunt folosite pentru a dezvolta sensibilitatea evaluatorilor la mirosuri. La început, stimulii sunt furnizați ca soluții apoase ale substanțelor relevante, dar pe măsură ce evaluatorii câștigă experiență, aceștia pot proceda la testarea alimentelor și băuturilor reale. Distorsiunea aspectului probei (de exemplu, folosirea iluminării colore) este deosebit de utilă pentru a sublinia necesitatea de a fi obiectiv atunci când încercăm să identificăm diferențele în alte caracteristici.

Pregătirea pentru a utiliza scale. În această etapă, evaluatorii vor fi introduși la scara estimată, clasificare, interval și raport, în funcție de scala care va fi utilizată. Diferite proceduri de evaluare sunt utilizate pentru a atribui valori rezonabile la testarea probelor. Cea mai comună mai întâi se testează soluțiilor apoase, apoi a alimentele și băuturile reale cu stimuli mixți, care pot varia independent unul de celălalt.

Instruire în compilarea și utilizarea descrierilor (profilurilor). Participanții la instruire ar trebui să știe cum sunt compilate descrierile (profilurile). Pentru a realiza acest lucru, trebuie să li se ofere probe

de produse simple și să li se solicite să compileze vocabulare pentru descrierea caracteristicilor acestor produse în termeni care să permită diferențierea probelor. Termenii sunt dezvoltați individual, apoi după discuție se elaborează o listă generală de termeni din cel puțin 10 definiții. Această listă este utilizată în continuare pentru a compila descrierile produselor, alegând mai întâi termeni adecvați pentru fiecare probă și apoi evaluând intensitatea acestora folosind diferite scale menționate mai sus.

Toată pregătirea teoretică descrisă mai sus alternează cu sarcini practice, astfel încât evaluatorii să își poată extinde experiența. După formarea de bază, evaluatorii pot fi instruiți pentru a evalua un produs real.

Formarea comisiei se efectuează pentru anumite tipuri de teste de la candidați care demonstrează succes în testele relevante. Candidații care sunt eligibili pentru un tip de test nu trebuie să fie potriviți pentru altul, iar candidații excluși din numărul de evaluatori dintr-un test nu ar trebui să fie excluși automat de la efectuarea altora.

Pregătirea experților. Experții sunt instruiți de instructori selectați care au deja cunoștințe despre fiziologia gustului și a mirosului. Pregătirea lor vizează îmbunătățirea cunoștințelor senzoriale și, în special, memorarea descriptorilor pentru profilul senzorial și valorile intensității lor, precum și dobândirea abilităților pentru a crea profiluri de produse senzoriale de înaltă calitate (repetabilitate, fiabilitate, abilități distinctive). Instruirea include de obicei:

- dezvoltarea memoriei senzoriale;
- studiul semantic și motivic al descriptorilor senzoriali;
- dezvoltarea vocabularelor descriptorului;
- instruire în condițiile certificării.

Toate metodologiile testelor menționate sunt descrise în detalii în ISO 8586: 2012 Analiza senzorială - Linii directoare generale pentru selecția, instruirea și monitorizarea evaluatorilor selectați și a evaluatorilor senzoriali experți.

7.3.3. Proceduri de servire

Informațiile generale despre materialul care urmează să fie testat, aparatele pentru acesta și probe sunt prezentate în ISO 6658: 2017 Analiză senzorială - Metodologie - Îndrumări generale. Mai mult de atât, fiecare ISO privind metodologia analizei senzoriale conține instrucțiuni scurte cu privire la acest subiect.

Conform normelor acceptate, prelevarea pentru testare trebuie efectuată în conformitate cu standardele pentru analiza senzorială a produsului sau a produselor care urmează să fie testate. În absența unor astfel de standarde, ar trebui să se ghideze după regulile de prelevare pentru acest produs sau să se ajungă la un acord între părțile interesate.

Metodele de preparare și prezentare a probelor ar trebui să fie adecvate tipului specific de produs și scopului specific al testării acestuia. Produsele trebuie degustate în aceleași condiții în care sunt consumate de obicei, cu excepția cazului în care gustatorilor li se cere să se concentreze asupra unor cazuri speciale. De exemplu, un produs care se consumă de obicei fierbinte ar trebui să fie gătit în mod obișnuit și testat la cald, iar un produs care se consumă de obicei în bucăți nu ar trebui să fie omogenizat (omogenizat), deoarece este necesar să se păstreze caracteristicile sale inerente ale textură. Cu toate acestea, este necesar să se asigure că părțile probelor evaluate de fiecare degustător sunt cât mai uniforme posibil.

Degustatorii nu trebuie să facă concluzii cu privire la natura probelor pe baza modului în care le sunt oferite aceste probe. Probele trebuie preparate în același mod (recipient identice, cantități identice de produs, aspect identic, condiții de temperatură identice etc.). Temperatura probelor trebuie controlată și menținută constantă.

Atunci când se evaluează aspectul probelor, este necesar să se creeze anumite condiții de iluminare. Când doar diferențele de miros și gust sunt determinate, aspectul diferențelor de culoare poate fi parțial netezit prin crearea condițiilor de iluminare prin care diferențele de culoare sunt reduse la minimum.

Containerul produsului nu trebuie să afecteze caracteristicile sau performanța testului ulterior. Pot fi recipiente din ceramică sau sticlă ușor de curățat și clătite, precum și recipiente de plastic sau de hârtie de unică folosință. Nu trebuie să conțină substanțe chimice care să provoace formarea petelor colorate. În special, recipientele trebuie spălate numai cu detergenți, fără miros și incolori și clătite cu apă. Recipientele din polimer și hârtie, inclusiv cele cu izolație termică (pentru probe calde sau răcite) trebuie

să fie inodore și să fie incolore. Aparatul ar trebui să fie selectat de conducătorul comisiei în funcție de natura produsului care urmează să fie analizat, numărul de probe etc. și nu ar trebui să afecteze în niciun fel rezultatele testelor.

Atunci când se efectuează o degustare oarbă (servirea anonimă a probei), ambalajele de producție, etichetele, adică toate informațiile despre un producător, trebuie eliminate din probe. Recipientele care conțin probe testate trebuie codificate folosind numere din trei cifre alese la întâmplare. Codificarea trebuie să fie diferită pentru fiecare test. Valorile codului ar trebui să fie cunoscute doar de organizatorul testului care nu participă ca degustator.

Probele unui singur tip de produs sunt colectate într-o serie. Ordinea testării produselor dintr-o serie este stabilită în funcție de gradul de creștere a intensității mirosului sau a cantității de condimente sau prin creșterea fracției de masă a elementelor constitutive, cum ar fi grăsimea, sarea, zahărul, alcoolul etilic etc. În primul rând, produse cu miros slab, apoi - moderat, în continuare - puternic exprimat. Aceeași procedură este urmată la evaluarea gustului: se testează mai întâi probe mai puțin sărate și picante.

În timpul analizei senzoriale, un factor important este numărul de probe evaluate de un grup într-o singură sesiune. Este mai bine să analizați un număr mic de probe care depinde de tipul de produse.

Ar trebui, de asemenea, discutată problema lipsei gustului, a beneficiilor clătirii gurii și a intervalelor standard între testarea diferitelor probe. Testarea diferitelor probe ar trebui să asigure restabilirea acuității percepției, dar nu ar trebui să fie prea lungă, astfel încât testerii să nu piardă capacitatea de a compara și distinge probele.

Este permisă degustătorilor să folosească mijloace pentru a neutraliza mirosul și gustul din gură între testarea probelor sau perioadele de testare. Cu toate acestea, este necesar să se asigure că aceste produse nu afectează gustul și mirosul produsului evaluat. Între testarea probelor sau perioadele de testare sunt permise apa carbogazoasă sau necarbogazoasă, precum și produsele cu aromă proaspătă (de exemplu, biscuiți nesărate).

În funcție de proprietățile produsului, după evaluarea a cinci până la opt probe, se face o pauză de cel puțin 15 minute pentru a restabili abilitățile senzoriale.

7.4 Principalele teste senzoriale

În evaluarea senzorială a caracteristicilor organoleptice ale alimentelor, sunt utilizate diferite metodologii în funcție de scopul testelor și de informațiile pe care doresc să le obțină. Este posibil, în primul rând, să distingem testele de laborator (sau testele analitice) de cele pentru consumatori. Primul grup poate fi subdivizat în trei categorii, după cum se arată în Figura 1. Cu teste discriminante calitative este posibil să se evalueze existența sau nu a diferențelor între două produse, cu teste discriminante calitative și cantitative pentru a obține informații legate de entitatea diferențelor existente între mai multe probe sau categoria de care aparține unei probe. Cu testele descriptive, este posibil să se identifice și să se cuantifice atributele senzoriale (descriptori) care caracterizează cel mai bine un aliment. Distincția dintre cele trei grupuri își găsește justificarea, în plus, desigur, în scopul testului și, prin urmare, în tipul de informații care pot fi obținute, și în dificultatea diferită a fiecărui test și, în consecință, în gradul diferit de formare și numerozitate a grupului.

Test de laborator		
Teste discriminante calitative	Teste discriminante calitative și cantitative	Teste descriptive
1. Test de diferență pereche 2. Test triunghiular (test triunghi) 3. Test duo-trio (test duo-trio).	1. Test de sortare 2. Test de clasificare a gamei 3. Test de scor (scale de raport)	1. QDA 2. Profilul aromatic 3. Profil de textură
Testele consumatorilor		
1. Test de acceptabilitate 2. Test de preferință 3. Test hedonist		

Figura 1 Clasificarea principalelor teste senzoriale

7.4.1 Teste discriminatorii de calitate

O serie de anchete efectuate în Statele Unite și Anglia au arătat că testele discriminatorii calitative reprezintă cea mai utilizată metodă senzorială în sectorul alimentar. Utilizarea pe scară largă a acestor metode este atribuită simplității procedurii experimentale, rapidității efectuării testelor și ușurinței de interpretare a rezultatelor. Testele discriminatorii calitative sunt utilizate pentru un scop specific, și anume pentru a evalua dacă două eșantioane pot fi considerate diferite cu niveluri de probabilitate statistice predeterminate. Întrebarea care se pune de fapt degustătorilor este de tipul „care este proba diferită?” „Care este cea mai bună probă ...” sau „care este proba preferată?”

Produsele care urmează să fie evaluate cu aceste metode trebuie să difere numai în ceea ce privește prima caracteristică luată în considerare. Dacă două probe, de exemplu, trebuie evaluate pe bază de consistență, acestea trebuie să aibă același aspect, aceeași formă, aceeași culoare etc. și trebuie prezentate în aceeași cantitate.

Testele discriminatorii calitative sunt utilizate atât în faza de selecție și instruire a grupului, cât și în evaluarea produselor. Cele trei metode principale discriminatorii calitative sunt:

1. Test de diferență pereche
2. Test triunghiular (test triunghi)
3. Test duo-trio (test duo-trio).

7.4.1.1. Test de diferență pereche

Pregătirea și executarea testului

Scopul testului de comparație în perechi este de a evalua existența sau lipsa diferențelor dintre două probe și/sau de a stabili o preferință, pe baza unei evaluări globale sau în raport cu un atribut senzorial specific. Acest test este, de asemenea, utilizat pentru a selecta și instrui degustătorii.

În practică, se prepară un număr egal de probe din cele două produse (produsul A și produsul B) pentru a fi comparate. Fiecare probă este identificată printr-un cod. Codificarea poate fi diferită pentru cele două produse (de exemplu produsul A: 376 și produsul B: 914) și aceeași pentru toți degustătorii sau, mai bine, diferită pentru cele două produse și pentru degustători. În acest caz este indispensabil, pentru pregătirea probelor, să se utilizeze un card de tipul prezentat în figura 2 pe care să fie apoi înregistrate răspunsurile degustătorilor. În card este indicat, pe lângă identificarea progresivă numărul degustatorului, ordinea în care vor fi servite cele două probe. De fapt, este important să vă asigurați că jumătate din grup evaluează prima probă A și cealaltă jumătate evaluează prima probă B. În cazul repetării testului, ordinea trebuie inversată, astfel încât fiecare degustător să fi evaluat ambele proba A și proba B mai întâi.

TEST DE DIFERENȚĂ PERECHE					
Produs:			Data:		
Proba A:					
Proba B:					
Ordinea de degustare					
Degustator		Coduri	Răspuns corect	Răspuns furnizat	Răspuns exact
1	A B	/.....			
2	B A	/.....			
3	A B	/.....			
4	B A	/.....			
5	A B	/.....			
6	B A	/.....			
7	B A	/.....			
8	B A	/.....			
9	B A	/.....			
10	B A	/.....			
11	A B	/.....			
12	B A	/.....			
13	A B	/.....			
14	B A	/.....			
15	A B	/.....			
16	B A	/.....			
17	A B	/.....			
18	B A	/.....			
19	A B	/.....			
20	B A	/.....			
21	A B	/.....			
22	B A	/.....			
23	A B	/.....			
24	B A	/.....			

Numărul de răspunsuri exacte:

Rezultat:

Figura 2 Cardul general al unui test pereche la diferență

Pentru a simplifica pregătirea probelor și a evita posibilele erori, este recomandabil, în primul rând, codificarea containerelor în care vor fi prezentate probele. Alegerea secvenței celor trei cifre care alcătuiesc codul poate avea loc prin tabelul numerelor aleatorii începând dintr-o poziție aleatorie și apoi procedând într-o anumită direcție (stânga, dreapta, sus sau jos) și compunând numere din 3 cifre (tabelul 5). Recipientele codificate sunt apoi împărțite în două grupe egale: primul grup va primi proba A, al doilea proba B. Probele codificate sunt distribuite degustătorilor în felul următor: probele A sunt distribuite inițial și apoi probele B sunt date în ordinea de degustare indicată, pentru fiecare degustator, în fila generală a testului (figura 2). În același timp, codurile atribuite fiecărei probe pentru diferenții degustători sunt înregistrate în a treia coloană. În aceeași filă, sunt furnizate alte trei coloane, prima pentru indicarea răspunsului corect, a doua pentru indicarea răspunsului furnizat și a treia pentru identificarea gustatorilor care au oferit un răspuns corect.

TABELUL NUMERELOR ALEATORII

2217686584	6895239235	8702225751	6109439606	5824820347
1936275946	1379933755	3977327709	8552053062	4783516274
1677230277	0961872521	2806242593	1671135978	2305474725
7843767161	2044903264	9767639961	4638039322	6981219021
0328282608	7337320405	6930160905	8869582899	3507447547
9322536439	0710637635	8703047988	0813138551	5534577269
7876585474	9238709692	5206797945	8263182744	6966921909
2368352600	9953936128	5270054834	5665056186	9092107080
1539257099	9386527765	1533590528	2287260747	8696982906
5871963024	1846233427	8513992444	4918097949	7416322302
5735273372	2453639409	4110764791	4404954966	3960045981
4850865448	2206347252	8221156520	3329947111	1591291203
6196489503	0716393366	9856105679	7721302712	9049222362
3693894126	2970836351	9974205236	8709411509	9860160303
1887004231	5790120207	2347371731	5408018863	3941889210
8856532759	3335726747	7734554570	0818273890	1695867075
0972958429	4941310670	4238064518	6484733165	5253379715
1296881731	6519690283	6075869068	2464193551	5661873912
8594572416	9209843876	2200276985	2981947870	2194479012
3864435998	9877876807	9151676244	4098059378	2332654118
5344094272	0041867979	6847220020	3555315151	0083632255
4076662684	5799999037	3663320858	3740136897	8764810783
0217791805	1259525702	2207904703	2814113079	2069224098
9517820653	3151109646	9206880777	5611508169	4023725139
3576224292	9611834480	3468354877	3342409060	7396539786
2629135641	8547046608	3472575913	8243804615	3826617004
7780207582	7282329990	6395737663	8973449905	4867264318
4640664452	9136744353	3082135400	7845639835	5503366768
3756081809	7753844647	3191189558	2416741153	4410138557
6165616866	3727473919	8483700748	5321400671	9506798854
9343696407	3418045235	5627092486	6185538345	1990709900
2196601299	1120994518	4813935534	1837794990	6597382046
9520479797	2737832871	0006414174	4589093984	5157115249
9786217873	1065819259	5876171497	0476621617	1795704580
6992063413	5971741732	2755102419	2371821374	6352520141
0431172156	3373991987	2672392767	5377576893	6061972261
6106980391	8714774396	4300659850	4560330107	9899465047
8593858688	7287086240	1606108920	2321347497	7638032963
2174324745	7396079452	0965907747	2576161933	5305705330
1569538280	7996235310	6539071629	4533024370	0287404145
0289080449	2021146886	8763939517	1129019580	3514973533
8718158979	8543017273	0861745169	8974398215	9451334167
9883719422	5997509952	6852850840	8780616531	9151803244
1008582166	7268492931	8985844606	5973198523	6509297563
4790561008	8802842783	4229722319	6656456579	2071532025
2285616890	4964928544	1640128988	5014498106	0182774512
6780437933	1283114116	2558196870	7702540052	5343371526
2762509672	7944614015	1453406539	2731585028	1139033425
3378808715	3830063821	1447470726	5496875332	4036409676
1313926699	4724495774	3225436117	1097116984	9963223298

Tabelul 1 Tabelul numerelor aleatorii

Fiecare degustator este prezentat, împreună cu cele două probe care urmează să fie evaluate, un card cu instrucțiuni pentru efectuarea testului la care vor fi raportate răspunsurile și orice carduri sunt prezentate în exemplele de aplicare ale testului (figura 3).

TEST PERECHE DE DIFERENȚĂ	
Produs: biscuit uscat Nume: Mario Rossi	Data: 3 mai 1990 Număr de identificare [1]
Sunt prezentate 2 probe, identificate cu următoarele coduri: 319 118 Gustă cele 2 probe și indică care probă este mai dulce. Clățiți din nou gura cu grijă între probe. Am identificat că este cea mai dulce probă.	

Figura 3 Card pentru efectuarea testului

Este util ca liderul grupului să specifice verbal modalitățile de executare a testului, de exemplu:

- evaluați mai întâi aspectul probei, apoi mirosiți-l și în final gustați-l;
- eliminați sau înghițiți proba și clățiți din nou gura bine după gustare. Dacă este necesar, mestecați o bucată mică de biscuit sau măr sau altceva pentru a elimina senzațiile lăsate de prima probă, clățiți din nou gura și, numai după eliminarea gustului probei anterioare, gustați a doua probă;
- gustați ambele probe o dată sau de un număr limitat de ori, indicați răspunsul pe cartelă evitând să gustați probele în mod repetat: această procedură determină, mai ales cu unele probe, o oboseală rapidă a simțurilor și deci o capacitate mai mică de discriminare;
- oferiți în mod egal un răspuns chiar dacă nu puteți identifica o diferență sau exprima o preferință;
- nu ezitați să scrieți comentarii pe fișă.

De asemenea, este important să nu informați membrii comisiei despre problema care a făcut necesară degustarea sau să îi informați într-un mod care să nu le afecteze răspunsul.

La sfârșitul sesiunii, este o regulă bună să informați degustătorii cu privire la motivul pentru care a fost efectuat testul, cu privire la natura diferențelor dintre probe și, de asemenea, cu privire la validitatea sau nu a răspunsurilor acestora, acest lucru se va face pentru a le motiva munca. Dacă cunoașterea acestor informații poate influența, într-un fel sau altul, răspunsurile la testele care vor fi efectuate ulterior, este bine să nu prezentați rezultatele, ci să asigurați degustătorii care vor fi informați cât mai curând posibil.

Prelucrarea rezultatelor

După colectarea fișelor, răspunsurile fiecărui degustător sunt afișate în fila generală a testului (figura 2). Numărul de persoane care au oferit răspunsul corect este apoi calculat în cazul evaluării diferențelor dintre probe sau numărul de degustători care au indicat proba A sau proba B, în cazul evaluării preferințelor sau în identificarea probei care are un anumit atribut cu intensitate mai mare sau mai mică.

Tabelul 2 vă permite să evaluați dacă diferențele dintre cele două probe au fost evidențiate la întâmplare sau dacă, dimpotrivă, pot fi considerate semnificative. Tabelul, care se referă doar la teste unilaterale, prezintă trei coloane distincte pentru trei niveluri diferite de semnificație.

Număr de răspunsuri	Numărul minim de răspunsuri corecte pentru a stabili o diferență semnificativă			Număr de răspunsuri	Numărul minim de răspunsuri corecte pentru a stabili o diferență semnificativă		
	$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)		$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)
7	7	7	—	53	33	36	39
8	7	8	—	54	34	36	39
9	8	9	—	55	35	37	40
10	9	10	10	56	35	38	40
11	9	10	11	57	36	38	41
12	10	11	12	58	36	39	42
13	10	12	13	59	37	39	42
14	11	12	13	60	37	40	43
15	12	13	14	61	38	41	43
16	12	14	15	62	38	41	44
17	13	14	16	63	39	42	45
18	13	15	16	64	40	42	45
19	14	15	17	65	40	43	46
20	15	16	18	66	41	43	46
21	15	17	18	67	41	44	47
22	16	17	19	68	42	45	48
23	16	18	20	69	42	45	48
24	17	19	20	70	43	46	49
25	18	19	21	71	43	46	49
26	18	20	22	72	44	47	50
27	19	20	22	73	45	47	51
28	19	21	23	74	45	48	51
29	20	22	24	75	46	49	52
30	20	22	24	76	46	49	52
31	21	23	25	77	47	50	53
32	22	24	26	78	47	50	54
33	22	24	26	79	48	51	54
34	23	25	27	80	48	51	55
35	23	25	27	81	49	52	55
36	24	26	28	82	49	52	56
37	24	27	29	83	50	53	56
38	25	27	29	84	51	54	57
39	26	28	30	85	51	54	58
40	26	28	31	86	52	55	58
41	27	29	31	87	52	55	59
42	27	29	32	88	53	56	59
43	28	30	32	89	53	56	60
44	28	31	33	90	54	57	61
45	29	31	34	91	54	58	61
46	30	32	34	92	55	58	62
47	30	32	35	93	55	59	62
48	31	33	36	94	56	59	63
49	31	34	36	95	57	60	63
50	32	34	37	96	57	60	64
51	32	35	37	97	58	61	65
52	33	35	38	98	58	61	65

Tabel 1 Semnificația testului de diferență pereche ($p = 1/2$) (test unilateral)

O eroare de 5% ($\alpha = 0,05$) înseamnă că cele două probe comparate au fost identificate corect ca urmare a cazului o dată din douăzeci (există o probabilitate de 5% de a refuza fără nicio justificare

statistică ipoteza nulă care afirmă o egalitate dintre cele două probe). Acest concept este exprimat spunând că cineva este încrezător, cu 95% probabilitate ($P = 95\%$), că cele două probe sunt diferite. În cazul unui nivel de eroare de 1%, există probabilitatea ca 1% să obțină un răspuns corect numai datorită cazului.

Utilizarea tabelelor este foarte simplă. Pe baza numărului de răspunsuri sau a numărului de judecăți (numărul de degustători înmulțit cu numărul de răspunsuri) se raportează numărul minim de răspunsuri exacte (sau concordante) pentru a stabili o diferență semnificativă statistic (sau preferință) între cele două probe. Dacă numărul de răspunsuri corecte sau concordante obținute în test este egal sau mai mare decât valoarea tabelată, este corect să se afirme că există diferențe semnificative între cele două produse sau că unul dintre cele două produse are o caracteristică cu o valoare statistică mai mare (sau mai mică) la un anumit nivel de semnificație (respingând astfel ipoteza nulă).

7.4.1.2. Test triunghiular

Pregătirea și executarea testului

Testul triunghiular este cea mai utilizată metodă calitativă discriminatorie atât în timpul selecției și instruirii degustătorilor grupului, cât și pentru evaluarea produselor alimentare. Pentru efectuarea acestui test, sunt prezentate fiecărui membru al comisiei trei probe codificate diferit, două identice și una diferită. Degustatorul va trebui să identifice probele diferite. Pentru pregătirea probelor care urmează să fie supuse testului, în mod similar cu cel raportat anterior pentru testul de comparație în perechi, va fi posibil să se utilizeze un card de tipul prezentat în figura 4.

TEST TRIANGULAR					
Produs:		Data:			
Proba A:					
Proba B:					
Degustat	Ordinea	Coduri	Răspuns corect	Răspuns prezentat	Răspu ns
1	A A B	/...../.....			
2	B A A	/...../.....			
3	A B A	/...../.....			
4	B B A	/...../.....			
5	A B B	/...../.....			
6	B A B	/...../.....			
7	A A B	/...../.....			
8	B A B	/...../.....			
9	A B A	/...../.....			
10	B B A	/...../.....			
11	B A A	/...../.....			
12	A B A	/...../.....			
13	A B B	/...../.....			
14	A A B	/...../.....			
15	A B B	/...../.....			
16	B B A	/...../.....			
17	B A A	/...../.....			
18	A B A	/...../.....			
19	A B B	/...../.....			
20	B B A	/...../.....			
Numărul de răspunsuri exacte: Rezultat					

Figura 4 Fișa generală a unui test triunghiular

Pe lângă numărul de identificare al degustatorului, fișa indică ordinea în care cele trei probe vor fi servite fiecărui membru al grupului. De fapt, este important ca degustătorii să evalueze cele trei probe cu o ordine diferită și că jumătate din comisie să primească proba A ca o singură probă, în timp ce cealaltă jumătate să primească proba B ca singură. Dacă testul urmează să fie repetat cu aceiași degustători, este recomandabil să se inverseze ordinea în care probele sunt prezentate în al doilea test. Această ordine derivă, după cum se indică în foaie, dintr-o succesiune de combinații aleatorii. Alegerea codurilor pentru fiecare probă poate fi făcută pe baza tabelului numerelor aleatorii, după cum s-a raportat anterior.

Pentru a evita erorile în distribuția celor două produse (proba A și proba B) în recipientele codificate anterior, este necesar să le completați separat, să formați triade de degustare și să raportați în a treia coloană a fișei generale de test codurile probelor furnizate la fiecare degustator. Cele trei probe vor fi supuse judecății comisiei însoțite de un formular de tipul prezentat în figura 3, dar cu 3 coduri și acest tip de propoziție: „2 dintre aceste probe sunt aceleași și unul este diferit; indicați care este diferit.”.

De asemenea, în acest caz este util să specificați verbal metodele de executare a testului, similar cu ceea ce a fost raportat pentru testul de comparație în perechi la care se face trimitere pentru mai multe detalii.

Prelucrarea rezultatelor

După colectarea fișelor, răspunsurile fiecărui degustător sunt afișate în fișa generală a testului (coloana a cincea) și, din comparația dintre răspunsurile corecte și cele furnizate, se evaluează numărul de răspunsuri corecte furnizate la nivel global de către degustători. Acest număr este comparat cu valoarea raportată în **Tabelul 3** în raport cu numărul de degustători care au efectuat testul sau cu numărul de judecăți (numărul de degustători pentru numărul de răspunsuri) pentru diferitele niveluri de semnificație. Dacă numărul total de răspunsuri corecte este egal sau mai mare decât valoarea prezentată în tabel, se poate afirma că cele două produse examinate sunt statistic diferite. **Tabelul 3** diferă de cel referitor la testul de comparație în perechi, deoarece, în testul triunghiular, probabilitatea de a obține un răspuns corect la întâmplare este de 33,3% ($p = 1/3$).

Număr de răspunsuri	Numărul minim de răspunsuri corecte pentru a stabili o diferență semnificativă			Număr de răspunsuri	Numărul minim de răspunsuri corecte pentru a stabili o diferență semnificativă		
	$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)		$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)
5	4	5	—	53	24	27	29
6	5	6	—	54	25	27	30
7	5	6	7	55	25	27	30
8	6	7	8	56	25	28	31
9	6	7	8	57	26	28	31
10	7	8	9	58	26	29	31
11	7	8	9	59	27	29	32
12	8	9	10	60	27	29	32
13	8	9	11	61	27	30	33
14	9	10	11	62	28	30	33
15	9	10	12	63	28	31	34
16	9	11	12	64	29	31	34
17	10	11	13	65	29	32	34
18	10	12	13	66	29	32	35
19	11	12	14	67	30	32	35
20	11	13	14	68	30	33	36
21	12	13	15	69	30	33	36
22	12	13	15	70	31	34	37
23	12	14	16	71	31	34	37
24	13	14	16	72	32	34	37
25	13	15	17	73	32	35	38
26	14	15	17	74	32	35	38
27	14	16	18	75	33	35	39
28	14	16	18	76	33	36	39
29	15	17	19	77	33	36	39
30	15	17	19	78	34	37	40
31	16	17	19	79	34	37	40
32	16	18	20	80	35	37	40
33	16	18	20	81	35	38	41
34	17	19	21	82	35	38	42
35	17	19	21	83	36	39	42
36	18	20	22	84	36	39	42
37	18	20	22	85	36	39	43
38	18	20	23	86	37	40	43
39	19	21	23	87	37	40	44
40	19	21	24	88	38	41	44
41	20	22	24	89	38	41	44
42	20	22	24	90	38	41	45
43	20	23	25	91	39	42	45
44	21	23	25	92	39	42	46
45	21	23	26	93	39	43	46
46	22	24	26	94	40	43	46
47	22	24	27	95	40	43	47
48	22	25	27	96	41	44	47
49	23	25	28	97	41	44	47
50	23	25	28	98	41	45	48
51	24	26	28	99	42	45	48
52	24	26	29	100	42	45	49

Tabel 2 Semnificația testului triunghiular ($p = 1/3$)

Extinderea testului triunghiular

De multe ori nu este suficient să se stabilească existența sau nu a unei diferențe între două probe, dar este necesar să se obțină, cu același test, informații referitoare la entitatea diferenței sau a opiniilor de preferință. În acest caz, este urmată întrebarea legată de identificarea probei, altele decât o serie de alte întrebări. Pentru elaborarea statistică a celei de-a doua părți a testului sunt luate în considerare doar

răspunsurile degustătorilor care au identificat corect probele diferite. De asemenea, în acest caz, comparăm numărul de răspunsuri care indică o probă ca favorită sau ca cel care prezintă o anumită caracteristică cu o intensitate mai mare (sau mai mică), cu valoarea minimă a răspunsurilor necesare pentru a obține o diferență semnificativă între două probe.

Se utilizează aceleași tabele (**tabelele 2 și 4**) raportate anterior pentru testul de comparație în perechi, calculate pe probabilitatea $1/2$, deoarece în a doua parte a testului alegerea sau comparația se face între două probe. Tot în acest caz trebuie făcută distincția între testele unilaterale și testele bilaterale. În evaluarea unei preferințe, testul este de obicei bilateral: ambele probe pot fi de fapt preferate de degustători. În alegerea unui produs pe baza intensității unei anumite caracteristici, testul apare ca unilateral atunci când există o diferență cunoscută între cele două probe comparate, cum ar fi, de exemplu, în cazul soluțiilor cu concentrații diferite utilizate pentru selecție de degustatori. Dimpotrivă, testul va fi bilateral dacă nu se cunoaște diferența dintre cele două produse; testul în sine va fi cel care ne va oferi informații despre diferențe.

Număr de răspunsuri	Numărul minim de răspunsuri corecte pentru a stabili o diferență semnificativă			Număr de răspunsuri	Numărul minim de răspunsuri corecte pentru a stabili o diferență semnificativă		
	$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)		$\alpha = 0,05$ (*)	$\alpha = 0,01$ (**)	$\alpha = 0,001$ (***)
7	7	—	—	53	35	37	39
8	8	8	—	54	35	37	40
9	8	9	—	55	36	38	41
10	9	10	—	56	36	39	41
11	10	11	11	57	37	39	42
12	10	11	12	58	37	40	42
13	11	12	13	59	38	40	43
14	12	13	14	60	39	41	44
15	12	13	14	61	39	41	44
16	13	14	15	62	40	42	45
17	13	15	16	63	40	43	45
18	14	15	17	64	41	43	46
19	15	16	17	65	41	44	47
20	15	17	18	66	42	44	47
21	16	17	19	67	42	45	48
22	17	18	19	68	43	46	48
23	17	19	20	69	44	46	49
24	18	19	21	70	44	47	50
25	18	20	21	71	45	47	50
26	19	20	22	72	45	48	51
27	20	21	23	73	46	48	51
28	20	22	23	74	46	49	52
29	21	22	24	75	47	50	53
30	21	23	25	76	48	50	53
31	22	24	25	77	48	51	54
32	23	24	26	78	49	51	54
33	23	25	27	79	49	52	55
34	24	25	27	80	50	52	56
35	24	26	28	81	50	53	56
36	25	27	29	82	51	54	57
37	25	27	29	83	51	54	57
38	26	28	30	84	52	55	58
39	27	28	31	85	53	55	59
40	27	29	31	86	53	56	59
41	28	30	32	87	54	56	60
42	28	30	32	88	54	57	60
43	29	31	33	89	55	58	61
44	29	31	34	90	55	58	61
45	30	32	34	91	56	59	62
46	31	33	35	92	56	59	63
47	31	33	36	93	57	60	63
48	32	34	36	94	57	60	64
49	32	34	37	95	58	61	64
50	33	35	37	96	59	62	65
51	33	36	38	97	59	62	66
52	34	36	39	98	60	63	66

Tabel 4 Semnificația testului de diferență în perechi ($p = 1/2$) (test bilateral)

7.4.1.3 Test duo-trio

Testul duo-trio este utilizat atât în faza de selecție și instruire a grupului, cât și la analiza produselor alimentare. Este indicat în special în evaluarea alimentelor care au un gust înțepător sau un gust neplăcut, deoarece acest test necesită un număr mai limitat de degustări decât testul triunghiular.

În testul duo-trio, fiecare degustator trebuie să evalueze trei probe, două egale și una diferită: una dintre cele două probe identice este identificată cu litera R și reprezintă proba de referință. Degustatorul trebuie să identifice care dintre cele două probe codificate este același cu probă de referință.

Pentru pregătirea și codificarea probelor care urmează să fie supuse unui test duo-trio se poate utiliza o formă generală, așa cum sa raportat pentru testele anterioare.

Pentru procesarea statistică a rezultatelor, se face referință la **tabelul 2**, deoarece, în mod similar testului de comparare a perechilor, probabilitatea identificării probei la întâmplare ca cea de referință este de 50%.

De asemenea, în acest caz, pe lângă identificarea probei ca fiind cea de referință, este posibil să îi adresăm degustatorului și alte întrebări referitoare atât la preferință, cât și la existența într-o probă a unor caracteristici prezente cu intensitate mai mare sau mai mică. **Tabelele 2 sau 4** sunt utilizate pentru prelucrarea statistică a acestei a doua părți a testului, în funcție de faptul dacă testul este unilateral sau bilateral.

7.4.2. Discriminarea testelor calitative și a cantităților

Unele metode de analiză senzorială permit estimarea uneia sau mai multor caracteristici ale unui produs alimentar cu referire la o scară de măsurare. Principalele scale sunt: scale ordinale, scale la intervale și scale de relații. Dacă produsele care urmează să fie evaluate sunt comandate pe baza intensității crescătoare sau descrescătoare a unui atribut specific (test de sortare) se folosesc scale ordinale. Când decizia degustatorului este formulată pe o scară caracterizată de unul sau mai multe puncte de referință, se utilizează celelalte două tipuri de scale. În testul de clasificare pe intervale, scala este alcătuită dintr-o serie de categorii, fiecare dintre acestea identificând o intensitate specifică a caracteristicii luate în considerare sau nivelul de apreciere pe care îl determină un anumit produs. Testul de perforare, care utilizează o scară de relații, prevede în schimb măsurarea caracteristicilor unui produs în raport cu unul sau mai multe produse de referință.

7.4.2.1. Testul de sortare

Cu acest test, membrii grupului trebuie să ordoneze un anumit număr de probe pe baza intensității crescătoare sau descrescătoare a unui atribut specific (culoare, consistență, intensitate a aromei etc.). Diferitele probe pot fi, de asemenea, ordonate în funcție de gradul lor de acceptabilitate (preferință). Printre probele de testat este posibil să fie inclusă una de control sau un standard, pentru a obține o ordonare a celorlalte probe cu referire la cea cu caracteristici cunoscute. Spre deosebire de testele descrise mai sus, mai mult de două probe sunt comparate la un moment dat în testul de sortare.

Această procedură senzorială rapidă permite evaluarea mai multor probe în același timp, iar rezultatele obținute sunt ușor de elaborat, dar oferă informații cu privire la ordinea intensității unui atribut specific, fără a permite nici o cuantificare a entității diferențelor existente între probe. Testul de sortare este utilizat pentru selectarea grupului (teste efectuate cu cele patru arome de bază), în faza preliminară de selecție, de către un grup mai mare, a unor probe care urmează să fie supuse unor teste mai aprofundate și în cele din urmă în teste de preferință efectuate cu un grup mare de degustători sau consumatori.

Pentru executarea testului, grupul este obligat să ordoneze un anumit număr de probe pe baza intensității crescătoare sau descrescătoare a unei caracteristici **date** (figura 5). Testul poate fi organizat cu ajutorul unei fișe care arată ordinea în care produsele sunt servite diferiților degustători și codurile atribuite fiecărei probe (figura 6). Următoarele exemple arată câteva fișe de evaluare, utilizate pentru sortarea probelor.

TEST DE ORDONARE
Produs: Data:
Nume: Codul degustatorului:

Sunt prezentate cinci probe identificate prin următoarele coduri: Ordonati cele cinci probe în funcție de preferința dvs. [sau de intensitatea crescătoare sau descrescătoare a unui anumit atribut]. Pentru a face acest lucru, scrieți codul probei pe care o preferați mai mult în caseta marcată cu „1” și abrevierea probei mai puțin preferată sau nu în caseta marcată cu „5”. Așezați celelalte probe în cutiile intermediare.
Ordinea preferințelor 1 2 3 4 5 [Ordinea de intensitate]
Cod

Figura 5 Card pentru efectuarea unui test de sortare

TEST DE COMANDĂ
Produs: Data: Proba A: Proba B: Proba C: Proba D: Proba E:
Exemplu de cod pentru diferite replici 1 2 3
A 937 B 130 C 725 D 418 E 512
Degustator, Ordinea degustării, Codul probei
1 BCDAE 2 CDAEB 3 BACDE

Figura 6 Fișa generală pentru pregătirea testului de ordonare.

O prelucrare rapidă a rezultatelor, chiar și incompletă, implică calcularea, pentru fiecare probă, a scorurilor totale (suma scorurilor oferite de toți degustătorii) și compararea acestora cu valorile obținute din tabelele dezvoltate de Kramer (tabele 5-6 99% nivel semnificativ și 7-8 95% nivel semnificativ).

Tabelia 9. Totale dei punteggi richiesti

Număr de răspunsuri	Număr de probe sau tratamente								
	2	3	4	5	6	7	8	9	
2	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— 3-19
3	— —	— —	— —	— 4-14	— 4-17	— 4-20	— 5-22	— 5-25	4-29 6-27
4	— —	— —	— 5-15	5-19 6-18	5-23 6-22	5-27 7-25	6-30 8-28	6-34 8-32	6-38 9-35
5	— —	— 6-14	6-19 7-18	7-23 8-22	7-28 9-26	8-32 10-30	8-37 11-34	9-41 12-38	9-46 13-42
6	— —	7-17 8-16	8-22 9-21	9-27 10-26	9-33 12-30	10-38 13-35	11-43 14-40	12-48 16-44	13-53 17-49
7	— 8-13	8-20 9-19	10-25 11-24	11-31 12-30	12-37 14-35	13-43 16-40	14-49 18-45	15-55 19-51	16-61 21-56
8	9-15 9-15	10-22 11-21	11-29 13-27	13-35 15-33	14-42 17-39	16-48 19-45	17-55 21-51	19-61 23-57	20-68 25-63
9	10-17 10-17	12-24 12-24	13-32 15-30	15-39 17-37	17-46 20-43	19-53 22-50	21-60 25-56	22-68 27-63	24-75 30-69
10	11-19 11-19	13-27 14-26	15-35 17-33	18-42 20-40	20-50 23-47	22-58 25-55	24-66 28-62	26-74 31-69	28-82 34-76
11	12-21 13-20	12-29 16-28	17-38 19-36	20-46 22-44	22-55 25-52	25-63 29-59	27-72 32-67	30-80 35-75	32-89 39-82
12	14-22 14-22	17-31 18-30	19-41 21-39	22-50 25-47	25-59 28-56	28-68 32-64	31-77 36-72	33-87 39-81	36-96 43-89
13	15-24 15-24	18-34 19-33	21-44 23-42	25-53 27-51	28-63 31-60	31-73 35-69	34-83 39-78	37-93 44-86	40-103 48-95
14	16-26 17-25	20-36 21-35	24-46 25-45	27-57 30-54	31-67 34-64	34-78 39-73	38-88 43-83	41-99 48-92	45-109 52-102
15	18-27 18-27	22-38 23-37	26-49 28-47	30-60 32-58	34-71 37-68	37-83 42-78	41-94 47-88	45-105 52-98	49-116 57-108
16	19-29 19-29	23-41 25-39	28-52 30-50	32-64 35-61	36-76 40-72	41-87 46-82	45-99 51-93	49-111 56-104	53-123 61-115
17	20-31 21-30	25-43 26-42	30-55 32-53	35-67 38-64	39-80 43-76	44-92 49-87	49-104 55-98	53-117 60-110	58-129 66-121
18	22-32 22-32	27-45 28-44	32-58 34-56	37-71 40-68	42-84 46-80	47-97 52-92	52-110 59-103	57-123 65-115	62-136 71-127
19	23-34 24-33	29-47 30-46	34-61 36-59	40-74 43-71	45-88 49-84	50-102 56-96	56-115 62-109	61-129 69-121	67-142 76-133
20	24-36 25-35	30-50 32-48	36-64 38-62	42-78 45-75	48-92 52-88	54-106 59-101	60-120 66-114	65-135 73-127	71-149 80-140

per una semnificativitate del 99%

Număr de răspunsuri	Număr de probe sau tratamente								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
21	26-37	32-52	38-67	45-81	51-96	57-111	63-126	69-141	75-156
	26-37	33-51	41-64	48-78	55-92	63-105	70-119	73-127	80-140
22	27-39	34-54	40-70	47-85	54-100	60-116	67-131	74-146	80-162
	28-38	35-53	43-67	51-81	58-96	66-110	74-124	82-138	90-152
23	28-41	36-56	43-72	50-88	57-104	64-120	71-136	78-152	85-168
	29-40	37-55	45-70	53-85	62-99	70-114	78-129	86-144	95-158
24	30-42	37-59	45-75	52-92	60-108	67-125	75-141	82-158	89-175
	30-42	39-57	47-73	56-88	65-103	73-119	82-134	91-149	99-165
25	31-44	39-61	47-78	55-95	63-112	71-129	78-147	86-164	94-181
	32-43	41-59	50-75	59-91	68-107	77-123	86-139	95-155	104-171
26	33-45	41-63	49-81	57-99	66-116	74-134	82-152	90-170	98-188
	33-45	42-62	52-78	61-95	71-111	80-128	90-144	100-160	109-177
27	34-47	43-65	51-84	60-102	69-120	77-139	86-157	94-176	103-194
	35-46	44-64	54-81	64-98	74-115	84-132	94-149	104-166	114-183
28	35-49	44-68	54-86	63-105	72-124	81-143	90-162	99-181	108-200
	36-48	46-66	56-84	67-101	77-119	88-136	98-154	108-172	119-189
29	37-50	46-70	56-89	65-109	75-128	84-148	94-167	103-187	112-207
	37-50	48-68	59-86	69-105	80-123	91-141	102-159	113-177	124-195
30	38-52	48-72	58-92	68-112	78-132	88-152	97-173	107-193	117-213
	39-51	50-70	61-89	72-108	83-127	95-145	106-164	117-183	129-201
31	39-54	50-74	60-95	71-115	81-136	91-157	101-178	112-198	122-219
	40-53	51-73	63-92	75-111	86-131	98-150	110-169	122-188	133-208
32	41-55	52-76	62-98	73-119	84-140	95-161	105-183	116-204	126-226
	41-55	53-75	65-95	77-115	90-134	102-154	114-174	126-194	138-214
33	42-57	53-79	65-100	76-122	87-144	98-166	109-188	120-210	131-232
	43-56	55-77	68-97	80-118	93-138	105-159	118-179	131-199	143-220
34	44-58	55-81	67-103	78-126	90-148	102-170	113-193	124-216	136-238
	44-58	57-79	70-100	83-121	96-142	109-163	122-184	135-205	148-226
35	45-60	57-83	69-106	81-129	93-152	105-175	117-198	129-221	141-244
	46-59	59-81	72-103	86-124	99-146	113-167	126-189	140-210	153-232
36	46-62	59-85	71-109	84-132	96-156	109-179	121-203	133-227	145-251
	47-61	61-83	74-106	88-128	102-150	116-172	130-194	144-216	158-238
37	48-63	61-87	74-111	86-136	99-160	112-184	125-208	137-233	150-257
	48-63	63-85	77-108	91-131	105-154	120-176	134-199	149-221	163-244
38	49-65	62-90	76-114	89-139	102-164	116-188	129-213	142-238	155-263
	50-64	64-88	79-111	94-134	109-157	123-181	138-204	153-227	168-250
39	51-66	64-92	78-117	92-142	105-168	119-193	133-218	146-244	160-269
	51-66	66-90	81-114	97-137	112-161	127-185	142-209	158-232	173-256
40	52-68	66-94	80-120	94-146	109-171	123-197	137-223	150-250	164-276
	53-67	68-92	84-116	99-141	115-165	131-189	146-214	162-238	178-262

Tabel 6 Scorurile totale necesare pentru semnificația de 99% (pagina 2)

Tabella 10. Totale dei punteggi richiesti

Număr de răspunsuri	Număr de probe sau tratamente								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	— —	— —	— —	— 3-9	— 3-11	— 3-13	— 4-14	— 4-16	— 4-18
3	— —	— 4-8	— 4-11	4-14 5-13	4-17 6-15	4-20 6-18	4-23 7-20	5-25 8-22	5-28 8-25
4	— —	5-11 5-11	5-15 6-14	6-18 7-17	6-22 8-20	7-25 9-23	7-29 10-26	8-32 11-29	8-36 13-31
5	— 6-9	6-14 7-13	7-18 8-17	8-22 10-20	9-26 11-24	9-31 13-27	10-35 14-31	11-39 15-35	12-43 17-38
6	7-11 7-11	8-16 9-15	9-21 11-19	10-26 12-24	11-31 14-28	12-36 16-32	13-41 18-36	14-46 20-40	15-51 21-45
7	8-13 8-13	10-18 10-18	11-24 13-22	12-30 15-27	14-35 17-32	15-41 19-37	17-46 22-41	18-52 24-46	19-58 26-51
8	9-15 10-14	11-21 12-20	13-27 15-25	15-33 17-31	17-39 20-36	18-46 23-41	20-52 25-47	22-58 28-52	24-64 31-57
9	11-16 11-16	13-23 14-22	15-30 17-28	17-37 20-34	19-44 23-40	22-50 26-46	24-57 29-52	26-64 32-58	28-71 35-64
10	12-18 12-18	15-25 16-24	17-33 19-31	20-40 23-37	22-48 26-44	25-55 30-50	27-63 33-57	30-70 37-63	32-78 40-70
11	13-20 14-19	16-28 18-26	19-36 21-34	22-44 25-41	25-52 29-48	28-60 33-55	31-68 37-62	34-76 41-69	36-85 45-76
12	15-21 15-21	18-30 19-29	21-39 24-36	25-47 28-44	28-56 32-52	31-65 37-59	34-74 41-67	38-82 45-75	41-91 50-82
13	16-23 17-22	20-32 21-31	24-41 26-39	27-51 31-47	31-60 35-56	35-69 40-64	38-79 45-72	42-88 50-80	45-98 54-89
14	17-25 18-24	22-34 23-33	26-44 28-42	30-54 33-51	34-64 38-60	38-74 44-68	42-84 49-77	46-94 54-86	50-104 59-95
15	19-26 19-26	23-37 25-35	28-47 30-45	32-58 36-54	37-68 42-63	41-79 47-73	46-89 53-82	50-100 59-91	54-111 64-101
16	20-28 21-27	25-39 27-37	30-50 33-47	35-61 39-57	40-72 45-67	45-83 51-77	49-95 57-87	54-106 63-97	59-117 69-107
17	22-29 22-29	27-41 28-40	32-53 35-50	38-64 41-61	43-76 48-71	48-88 54-82	53-100 61-92	58-112 67-103	63-124 74-113
18	23-31 24-30	29-43 30-42	34-56 37-53	40-68 44-64	46-80 51-75	51-93 58-86	57-105 65-97	62-118 72-108	68-130 79-119
19	24-33 25-32	30-46 32-44	37-58 39-56	43-71 47-67	49-84 54-79	55-97 62-90	61-110 69-102	67-123 76-114	73-136 84-125
20	26-34 26-34	32-48 34-46	39-61 42-58	45-75 50-70	52-88 57-83	58-102 65-95	65-115 73-107	71-129 81-119	77-143 89-131

Tabel 4 Scorurile totale necesare pentru semnificația de 95% (pagina 1)

per una semnificativă del 95%

Număr de răspunsuri	Număr de probe sau tratamente								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
21	27-36 28-35	34-50 36-48	41-64 44-61	48-78 52-74	55-92 61-86	62-106 69-99	68-121 77-112	75-135 86-124	82-149 94-137
22	28-38 29-37	36-52 38-50	43-67 46-64	51-81 55-77	58-96 64-90	65-111 73-103	72-126 81-117	80-140 90-130	87-155 99-143
23	30-39 31-38	38-54 40-52	46-69 49-66	53-85 58-80	61-100 67-94	69-115 76-108	76-131 85-122	84-146 95-135	91-162 104-149
24	31-41 32-40	40-56 41-55	48-72 51-69	56-88 61-83	64-104 70-98	72-120 80-112	80-136 90-126	88-152 99-141	96-168 109-155
25	33-42 33-42	41-59 43-57	50-75 53-72	59-91 63-87	67-108 73-102	76-124 84-116	84-141 94-131	92-158 104-146	101-174 114-161
26	34-44 35-43	43-61 45-59	52-78 56-74	61-95 66-90	70-112 77-105	79-129 87-121	88-146 98-136	97-163 108-152	106-180 119-167
27	35-46 36-45	45-63 47-61	55-80 58-77	64-98 69-93	73-116 80-109	83-133 91-125	92-151 102-141	101-169 113-157	110-187 124-173
28	37-47 38-46	47-65 49-63	57-83 60-80	67-101 72-96	76-120 83-113	86-138 95-129	96-156 106-146	106-174 118-162	115-193 129-179
29	38-49 39-48	49-67 51-65	59-86 63-82	69-105 74-100	80-123 86-117	90-142 98-134	100-161 110-151	110-180 122-168	120-199 134-185
30	40-50 41-49	51-69 53-67	61-89 65-85	72-108 77-103	83-127 90-120	93-147 102-138	104-166 114-156	114-186 127-173	125-205 139-191
31	41-52 42-51	52-72 55-69	64-91 67-88	75-111 80-106	86-131 93-124	97-151 106-142	108-171 119-160	119-191 131-179	130-211 144-197
32	42-54 43-53	54-74 56-72	66-94 70-90	77-115 83-109	89-135 96-128	100-156 109-147	112-176 123-165	123-197 136-184	134-218 149-203
33	44-55 45-54	56-76 58-74	68-97 72-93	80-118 86-112	92-139 99-132	104-160 113-151	116-181 127-170	128-202 141-189	139-224 154-209
34	45-57 46-56	58-78 60-76	70-100 74-96	83-121 88-116	95-143 103-135	108-164 117-155	120-186 131-175	132-208 145-195	144-230 159-215
35	47-58 48-57	60-80 62-78	73-102 77-98	86-124 91-119	98-147 106-139	111-169 121-159	124-191 135-180	136-214 150-200	149-236 165-220
36	48-60 49-59	62-82 64-80	75-105 79-101	88-128 94-122	102-150 109-143	115-173 124-164	128-196 139-185	141-219 155-205	154-242 170-226
37	50-61 51-60	63-85 66-82	77-108 81-104	91-131 97-125	105-154 112-147	118-178 128-168	132-201 144-189	145-225 159-211	159-248 175-232
38	51-63 52-62	65-87 68-84	80-110 84-106	94-134 100-128	108-158 116-150	122-182 132-172	136-206 148-194	150-230 164-216	164-254 180-238
39	52-65 53-64	67-89 70-86	82-113 86-109	97-137 102-132	111-162 119-154	126-186 135-177	140-211 152-199	154-236 168-222	169-260 185-244
40	54-66 55-65	69-91 72-82	84-116 88-112	99-141 105-135	114-166 122-158	129-191 139-181	144-216 156-204	159-241 173-227	173-267 190-250

Tabel 5 Scorurile totale necesare pentru semnificația de 95% (pagina 2)

În tabele, pentru fiecare combinație, număr de probe și număr de răspunsuri, există două perechi de numere. Prima pereche indică intervalul în afara căruia trebuie găsit scorul global pentru cel puțin o probă pentru a concluziona că există o diferență semnificativă între probe. A doua pereche este utilizată pentru a

identifica ce probă (sau ce probe) diferă de celelalte. Odată stabilit, comparând scorurile diferitelor probe cu prima pereche de numere, care prezintă diferențe semnificative, comparăm fiecare scor cu a doua pereche de numere. Dacă scorul unei probe este mai mic decât primul număr al cuplului, înseamnă că proba este semnificativ diferită de celelalte (de exemplu pentru că este mai puțin dulce sau pentru că este mai puțin apreciat), dacă este mai mare decât al doilea număr al perechii, va exista un rezultat similar, dar în direcția opusă (de exemplu, deoarece este mai dulce sau mai plăcut). Cu această metodă este posibil să se clasifice probele în cel mult 3 categorii: cele care au un scor mai mic decât primul număr al perechii, cele al căror scor este situat în pereche și, în cele din urmă, acele probe care au un scor mai mare decât al doilea număr al cuplului. În cadrul fiecărui grup nu este posibil să aveți informații despre existența sau nu a diferențelor între diferitele probe. Cu metoda propusă de Nemenyi și Dunn-Runkin (metodă de comparație multiplă între sumele scorurilor) este posibil să se facă o comparație directă între scorurile totale ale fiecărei probe, calculând diferența între fiecare pereche de scoruri și compararea acestor diferențe cu valorile tabelate (**tabelul 9-10**), în funcție de numărul de probe comparate și de numărul de degustători. O altă metodă de procesare a rezultatelor implică utilizarea analizei varianței după transformarea pozițiilor fiecărei probe în scor prin intermediul unui tabel special.

Tabella 11. Differenze critiche per il

Număr de răspunsuri		Număr de probe sau tratamente												
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
5	0,01	9	12	16	19	23	26	29	33	37	40	44	47	51
	0,05	8	11	14	17	20	23	26	30	34	37	40	43	47
6	0,01	10	14	17	21	25	29	33	37	41	45	49	53	57
	0,05	9	12	15	19	22	26	29	33	37	41	43	48	52
7	0,01	11	15	19	23	27	31	36	40	44	49	53	58	62
	0,05	9	13	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56
8	0,01	12	16	20	25	29	34	38	43	47	52	57	62	67
	0,05	10	14	17	21	25	30	34	38	42	47	51	56	60
9	0,01	12	17	22	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71
	0,05	10	14	18	23	27	31	36	40	45	50	54	59	64
10	0,01	13	18	23	28	33	38	43	49	54	59	65	70	75
	0,05	11	15	19	24	28	33	38	43	47	52	57	62	67
11	0,01	14	19	24	29	35	40	46	51	57	62	68	74	78
	0,05	11	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	71
12	0,01	14	20	25	31	36	42	48	54	59	65	71	77	83
	0,05	12	16	21	26	31	36	41	47	52	58	63	68	74
13	0,01	15	21	26	32	38	44	50	56	62	68	74	80	87
	0,05	12	17	22	27	32	38	43	49	54	60	65	71	77
14	0,01	16	21	27	33	39	45	52	58	64	71	77	84	90
	0,05	13	17	23	28	34	39	45	50	56	62	68	74	80
15	0,01	16	22	28	34	41	47	54	60	67	73	80	87	94
	0,05	13	18	24	29	35	40	46	52	58	64	70	76	83
16	0,01	16	23	29	36	42	49	56	62	69	76	83	90	97
	0,05	13	18	24	30	36	42	48	54	60	67	73	79	86
17	0,01	17	23	30	37	43	50	57	64	71	79	86	93	100
	0,05	14	19	25	31	37	43	50	56	62	69	75	82	88
18	0,01	17	24	31	38	45	52	59	66	74	81	85	96	103
	0,05	14	20	26	32	38	45	51	57	64	71	77	84	91
19	0,01	18	25	32	39	46	53	61	68	76	83	91	98	106
	0,05	14	20	27	33	39	46	52	59	66	73	80	86	93
20	0,01	18	25	33	40	47	55	62	70	78	85	93	101	109
	0,05	15	21	27	34	40	47	54	61	68	75	82	89	96
21	0,01	19	26	33	41	48	56	64	72	79	87	95	104	112
	0,05	15	21	28	35	41	48	55	62	69	76	84	91	98
22	0,01	19	27	34	42	49	57	65	73	81	89	98	106	114
	0,05	16	22	29	35	42	49	56	64	71	78	86	93	101

confronto tra più coppie di campioni

Conținutul tabelului pentru cupluri de exemplare														
Număr de răspuns	Număr de probe sau tratamente													
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
23	0,01	20	27	35	43	51	59	67	75	83	91	100	108	117
	0,05	16	22	29	36	43	50	58	65	72	80	88	95	103
24	0,01	20	28	36	44	52	60	68	76	85	93	102	111	119
	0,05	16	23	30	37	44	51	59	66	74	82	89	97	105
25	0,01	21	28	36	44	53	61	70	78	87	95	104	113	122
	0,05	17	23	31	38	45	52	60	68	75	83	91	99	107
26	0,01	21	29	37	45	54	62	71	80	88	97	106	115	124
	0,05	17	24	31	38	46	54	61	69	77	85	93	101	109
27	0,01	21	30	38	46	55	63	72	81	90	99	108	117	127
	0,05	17	24	32	39	47	55	62	70	78	87	95	103	111
28	0,01	22	30	39	47	56	65	74	83	92	101	110	120	129
	0,05	18	25	32	40	48	56	64	72	80	88	97	105	113
29	0,01	22	31	39	48	57	66	75	84	93	103	112	122	131
	0,05	18	25	33	41	49	57	65	73	81	90	98	107	116
30	0,01	23	31	40	49	58	67	76	86	95	104	114	124	133
	0,05	18	26	33	41	49	58	66	74	83	91	100	109	117
31	0,01	23	32	41	50	59	68	77	87	97	106	116	126	136
	0,05	18	26	34	42	50	58	67	75	84	93	102	110	119
32	0,01	23	32	41	50	60	69	79	88	98	108	118	128	138
	0,05	19	27	35	43	51	59	68	77	85	94	103	112	121
33	0,01	24	33	42	51	61	70	80	90	100	110	120	130	140
	0,05	19	27	35	43	52	60	69	78	87	96	105	114	123
34	0,01	24	33	42	52	61	71	81	91	101	111	121	132	142
	0,05	19	27	36	44	53	61	70	79	88	97	106	116	125
35	0,01	24	34	43	53	62	72	82	92	103	113	123	134	144
	0,05	20	28	36	45	53	62	71	80	89	99	108	117	127
36	0,01	25	34	44	53	63	73	83	94	104	114	125	136	146
	0,05	20	28	37	45	54	63	72	81	91	100	109	119	129
37	0,01	25	35	44	54	64	74	85	95	105	116	127	137	148
	0,05	20	29	37	46	55	64	73	82	92	101	111	121	130
38	0,01	25	35	45	55	65	75	86	96	107	118	128	139	150
	0,05	20	29	38	46	56	65	74	84	93	103	112	122	132
39	0,01	26	35	45	56	66	76	87	98	108	119	130	141	152
	0,05	21	29	38	47	56	66	75	85	94	104	114	124	134
40	0,01	26	36	46	56	67	77	88	99	110	121	132	143	154
	0,05	21	30	39	48	57	66	76	86	95	105	115	125	136

Tabel 7 Diferențe critice la compararea mai multor perechi de probe (pagina 2)

7.4.2.2. Test de clasificare a intervalului

Este una dintre metodele cele mai frecvent utilizate pentru a evidenția și cuantifica diferențele dintre două sau mai multe produse alimentare sau pentru a stabili nivelul lor de satisfacție. Este un test care poate fi efectuat atât cu degustători selectați, cât și cu consumatori normali. Această metodă permite evaluarea intensității unei anumite caracteristici sau a acceptabilității unui produs alimentar, utilizând scale de intervale. Fiecare punct de pe scară identifică intensitatea unei anumite caracteristici sau nivelul de satisfacție exprimat față de diferitele produse evaluate (scări hedonist-verbale). Numerele pot fi asociate fiecărui interval al scalei pentru a favoriza alegerile degustatorilor și prelucrarea rezultatelor. Câteva exemple de scale de intervale sunt prezentate în **Figura 7**. În general, scalele sunt formate dintr-un număr de intervale variabile de la 5 la 11 (mai frecvent 7-9). Nu este recomandabil să folosiți scări cu un număr prea mic de intervale pentru a limita așa-numitul efect final sau denaturarea scorurilor la extremele scalei atribuite reticenței degustatorilor de a atribui scoruri prea mari sau prea mici. În evaluarea rezultatelor, se utilizează metode statistice standard, cum ar fi testul t-Student sau analiza varianței, pentru a evidenția dacă există diferențe semnificative între atribute sau scorurile atribuite diferitelor probe. Aceste proceduri de prelucrare presupun că punctele scalei o împart în intervale de amplitudine egale, adică, de exemplu, diferența de acceptabilitate între două produse listate 1 și 2 este aceeași cu cel existent între două produse listate 8 și 9. S-a demonstrat că acest lucru nu este întotdeauna adevărat atât pentru interpretarea diferită a cuvintelor de către degustători, cât și pentru reticența menționată mai sus a degustatorilor de a atribui scoruri extreme. În ciuda acestor aproximări, metoda de clasificare a intervalului este considerată una dintre cele mai fiabile metode pentru a măsura atât preferința, cât și acceptabilitatea produselor și pentru a cuantifica intensitatea unei anumite caracteristici a unui produs.

Intensitatea unei caracteristici	
☐	Foarte pronunțat
☐	Ușor pronunțat
☐	Perceptibil
☐	Greu de observat
☐	Imperceptibil

Scara facială hedonistă

Figura 7 Exemple de scale de intervale verbale și grafice

7.4.2.3. Test de scor (bareme de raportare)

Scalele de interval furnizează doar informații despre diferențele de intensitate dintre atributele a două sau mai multe produse alimentare, dar nu furnizează nicio informație cu privire la relațiile dintre atributele menționate anterior. De exemplu, o duritate evaluată 8 cu o scală de interval este de patru intervale față de o duritate evaluată 4, dar aceasta nu înseamnă că un produs evaluat 8 are o duritate dublă decât cea estimată.

Pe de altă parte, cu ajutorul scalelor de relație, evaluăm intensitatea unei anumite caracteristici în comparație cu o referință. Să presupunem că doriți să evaluați intensitatea gustului dulce al unui suc de portocale (proba A) în comparație cu cea a unui suc de referință (proba R). Întrebarea care va fi formulată degustătorilor va fi de tipul: „de câte ori mai mult (sau mai puțin) dulce este proba A comparativ cu proba R?” Pentru a răspunde la o întrebare de acest tip, degustatorul trebuie să fie instruit în mod corespunzător cu privire la utilizarea scalelor de relații.

Exemplul anterior folosește o scală deschisă; alternativ, este posibil să delimitați scala cu două referințe având intensitatea minimă și maximă a caracteristicii de evaluat. Din comparația cu cele două probe de referință, se evaluează intensitatea relativă a caracteristicii organoleptice a probei necunoscute. Răspunsul este dat pe un segment de linie dreaptă (scară de măsurare) trasând o linie perpendiculară pe scară în punctul care, în ceea ce privește distanța față de capete, reprezintă estimarea oferită de reglatorul intensității caracteristicii necunoscute cu privire la cea a regiunilor de referință. În acest caz, degustatorul primește, pe lângă proba care urmează să fie evaluată, două referințe: una dintre acestea, căreia i se atribuie scorul 1, are o intensitate minimă a caracteristicii de evaluat, cealaltă, căreia i se atribuie scorul 9,

prezintă caracteristica cu intensitate maximă. Degustatorul trebuie să stabilească în ce punct de pe scară, secțiunea verticală trebuie utilizată, folosind o procedură de comparație simultană cu cele două referințe. Se va pune următoarea întrebare: "intensitatea caracteristicii probei trebuie evaluată la jumătatea distanței dintre cea a celorlalte două?" Dacă da, va pune linia verticală la valoarea 5 și așa mai departe. Scările utilizate pot fi împărțite într-o serie de intervale egale (scale structurate) sau pot fi nestructurate atunci când sunt definite doar extremele.

Rezultatele sunt procesate cu testul t-Student sau, atunci când sunt mai mult de două probe necunoscute, analizând varianța și testul Duncan.