

**Қазақстан Республикасы
Денсаулық сақтау министрлігінің
Фармация комитеті төрағасының
2019 жылғы «25» қыркүйек
№ N023810 бұйрығымен
БЕКІТІЛГЕН**

**Медициналық мақсаттағы бұйымды
медицинада қолдану жөніндегі
нұсқаулық**

Медициналық мақсаттағы бұйымның атауы

Клиникалық материалда адамның 1 типті иммунтапшылығы вирусының (АИТВ-1) РНҚ полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен сандық анықтауға арналған «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағы

Бұйымның құрамы мен сипаттамасы

Тағайындалуы

«АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағы адамның 1 типті иммунтапшылығы вирусының (АИТВ-1) РНҚ ПТР әдісімен гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен сандық анықтауға арналған. ПТР жүргізуге арналған материал рөлін қан плазмасынан бөліп алынған РНҚ сынамалары атқарады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! ПТР-зерттеуінің нәтижелері аурудың кешенді диагностикасында ескеріледі¹.

Әдістің принципі

Тестілеу принципі қан плазмасынан ішкі бақылау үлгісімен (ІБҮ) бірге РНҚ экстракциялауға, нақты уақыт» режимінде (FRT форматы) гибридизациялық-флуоресценттідетекциялаумен РНҚ кері транскрипциялау және жДНҚ амплификациялау реакциясын жүргізуге «негізделеді. FAM флуорофорына сәйкес келетін арна бойынша, ІБҮ амплификациялау өнімі детекцияланады, ол әр үлгі үшін зерттеу емшарасының орындалуын бақылауға алуға мүмкіндік береді. JOE флуорофорына сәйкес келетін арна бойынша, АИТВ-1жДНҚ амплификациялау өнімі детекцияланады. ОБҮ-1-АИТВ және ОБҮ-2-АИТВ экстракциялау сатысының оң бақылау үлгілері

¹ Еуропа Одағының 98/79/ЕО Директивасына сәйкес.

ҒАМ (ІБҮ) және JOE (АИТВ-1). флуорофорларына сәйкес келетін арналар бойынша детекцияланады. Амплификациялауға арналған бақылау үлгілері (ДНҚ-калибраторлар) – KB1 АИТВ және KB2 АИТВ, сондай-ақ, *HIV-Q* калибраторы (жиынтықталымының 5 түрімен жұмыс жасағанда), осы сияқты, ҒАМ (ІБҮ) және JOE (АИТВ-1) флуорофорларына сәйкес келетін арналар бойынша детекцияланады.

Талдамалық сипаттамалары

Талдамалық сезімталдығы

- Қан плазмасы - 500-10.000.000 копий/мл (экстракция көлемі 100 мкл болғанда); 250-10.000.000 копий/мл (экстракция көлемі 200 мкл болғанда); 50-10.000.000 (экстракция көлемі - 1000 мкл болғанда);
- Алдын ала ультрацентрифугаланған қан плазмасы – 50-10.000.000 копий/мл

Талдамалық спецификалылығы

Реагенттер жинағының талдамалық спецификалылығын бағалау реакцияға келесі организмдер мен вирустардың: А гепатиті вирусы, В гепатиті вирусы, С гепатиті вирусы, D гепатиті вирусы, цитомегаловирус, Эпштейн-Барр вирусы, 1, 2 типті қарапайым герпес вирусы, желшешек вирусы, адамның 6, 8 типті герпесі вирусы, парвовирус В19, кене энцефалиті вирусы, батыс Ніл қызбасы вирусы, 2, 3, 7 типті аденовирус, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Homo sapiens* геномдық ДНҚ/РНҚ қосу арқылы жүргізілді.

Аталған организмдер мен вирустарға айқаспалы реакциялар тіркелмеген.

Жинақтың құрамы

FRТ нұсқасы

«РИБО-сорб-12» реагенттер жиынтығы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистейтін ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық ²	5,8	4 пробирка
АИТВ жуып-шаюға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық ²	8,0	4 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 3	Мөлдір түссіз сұйықтық	15,0	4 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 7	Мөлдір түссіз сұйықтық	6,0	4 құты
Сорбент	Ақ түсті суспензия	0,4	4 пробирка

² Лизистейтін ерітіндіні, лизиске арналған ерітіндіні және АИТВ жуып-шаюға арналған ерітіндіні от 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтағанда кристалдар түріндегі тұнба түзілуі мүмкін.

Элюциялауға арналған буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	4 пробирка
----------------------------	------------------------	-----	------------

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 48 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген. Жиынтықталымның 1 түрінің құрамына кіреді.

«РИБО-преп» реагенттер жиынтығы 50 нұсқасы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистеуге арналған ерітінді	Көгілдір түсті мөлдір сұйықтық ²	15	1 құты
Преципитациялауға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 3	Мөлдір түссіз сұйықтық	25	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 4	Мөлдір түссіз сұйықтық	10	1 құты
РНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	4 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 50 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген. Жиынтықталымның 2 түрінің құрамына кіреді.

Нуклеин қышқылдарын бөліп алуға арналған NucliSENS easyMAG автоматты станциясы 288 нұсқасына арналған реагенттер жиынтығы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистеуге арналған буфер (NucliSens easyMAG Lysis Buffer)	Мөлдір түссіз сұйықтық	1000	1 құты
Экстракциялауға арналған 1 буфер (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 1)	Мөлдір түссіз сұйықтық	1000	2 құты
Экстракциялауға арналған 2 буфер (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 2)	Мөлдір түссіз сұйықтық	1000	2 құты
Экстракциялауға арналған 3 буфер (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 3)	Мөлдір түссіз сұйықтық	1000	2 құты
Магнитті силика (NucliSens easyMAG Magnetic Silica)	Қара түсті суспензия	0,6	6 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 288 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген. Жиынтықталымның 3 түрінің құрамына кіреді.

«МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығы 100-1000 нұсқасы – комплект клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі	Мөлдір түссіз сұйықтық ³	70	4 құты
А компоненті	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,6	4 пробирка
Жуып-шаюға арналған ерітінді 5	Мөлдір түссіз сұйықтық ³	60	4 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 6	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	4 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 7	Мөлдір түссіз сұйықтық	6,0	4 құты
Магнеттелген силика	Қара түсті суспензия	0,9	4 пробирка
Элюциялауға арналған буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	12 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, көлемі 1000 мкл 100 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген. Жиынтықталымның 4 түрінің құрамына кіреді.

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT нұсқасы – адамның 1 (АИТВ-1) типті иммунтапшылығы вирусының РНҚ транскрипциялау және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясын жүргізуге арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>	
Лиофилизацияланған DTT	Ақ түсті ұнтақ	---	4 пробирка	
КТ-ПТР-қоспа-1-FRT АИТВ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	4 пробирка	
КТ-ПТР-қоспа-2-FEP/FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	4 пробирка	
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,02	4 пробирка	
ТМ-Ревертаза (MMV)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,01	4 пробирка	
ДНҚ-калибраторы	KB1 АИТВ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	4 пробирка
	KB2 АИТВ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	4 пробирка
Элюциялауға арналған буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	2 пробирка	

Реагенттер жиынтығы бақылаулар мен калибраторларды қоса,

³ Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі мен жуып-шаюға арналған 5 ерітіндіні 20 °С-ден төмен температурада сақтағанда, кристалдар түріндегі тұнба түзілуі мүмкін.

80 амплификациялау реакциясын жүргізуге есептелген. Жиынтықталымның 1, 2, 5 және 6 (1 дана мөлшерінде) түрлерінің, 3 түрінің (4 дана мөлшерінде) және 4 түрінің (2 дана мөлшерінде) құрамына кіреді

Реагенттер жиынтығына экстракциялау сатысының бақылау үлгілері қоса беріледі:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ТБҮ	Ақшыл-сарғыш түсті мөлдір сұйықтық	1,2	4 пробирка
ОБҮ-1-АИТВ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,06	4 пробирка
ОБҮ-2-АИТВ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,06	4 пробирка
АИТВ-М-FRT ІБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,28	4 пробирка

«HIV-Q калибровкалауға арналған жиынтық» реагенттер жиынтығының құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
HIV-Q калибраторы	Сары түсті ұнтақ	---	1 пробирка
Q еріткіші	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	3 пробирка

Реагенттер жиынтығы 1 калибровка жүргізуге есептелген. Жиынтықталымның 5 түрінің құрамына кіреді.

Реагенттер жинағына мәліметтерді өңдеуге және нәтижелерді алуға арналған AmpliSens Soft Monitor FRT бағдарламасы (Microsoft Excel форматындағы) жазылған диск қоса беріледі.

Қолданылу саласы

Клиникалық зертханалық диагностикада.

Жиынтықталымы

Реагенттер жинағы 1 форматта шығарылады.

FRT форматы

Реагенттер жинағы жиынтықталымының 6 түрімен шығарылады:

1 түріне «РИБО-сорб-12», реагенттер жиынтығы, «ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы кіреді.

2 түріне «РИБО-преп» реагенттер жиынтықтары 50 нұсқасы, «ПТР-комплект» вариант FRT нұсқасы кіреді.

3 түріне Нуклеин қышқылдарын бөліп алуға арналған NucliSENS easyMAG автоматты станциясына арналған реагенттер жиынтығы 288 нұсқасы (bioMérieux, Франция), «ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы кіреді – 4 дана.

4 түріне «МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығы 100-1000 нұсқасы, «ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы кіреді – 2 дана.

5 түріне «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT нұсқасы және «*HIV-Q* калибровкалауға арналған жиынтық» кіреді.

6 түріне комплект «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығының FRT нұсқасы кіреді.

Жиынтықталымының 1 түрі клиникалық материалдан силикагельге сіндіру әдісімен РНҚ экстракциялаудан, РНҚ кері транскрипциялау және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясынан тұратын толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 2 түрі клиникалық материалдан преципитациялау әдісімен РНҚ экстракциялаудан, РНҚ кері транскрипциялау және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясынан тұратын толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 3 түрі, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) автоматты станциясын пайдаланып клиникалық материалдан РНҚ автоматты түрде экстракциялаудан, РНҚ кері транскрипциялау және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясынан тұратын толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 4 түрі клиникалық материалдан магниттік сепарациялау арқылы РНҚ экстракциялаудан, РНҚ кері транскрипциясы және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясынан тұратын толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 5 және 6 түрлері РНҚ кері транскрипциялау және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясын жүргізуге арналған. Толық ПТР-зерттеуін жүргізу үшін қосымша, РНҚ/ДНҚ экстракциялауға арналған, Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жиынтығын пайдалану қажет.

Сақтық шаралары

Жұмыс биологиялық материалда инфекциялық аурулар қоздырғыштарының бар-жоқтығын анықтайтын молекулалық-биологиялық (ПТР) зерттеуді жүргізетін зертханада, СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III–IV тобына жататын микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздік» санитариялық-эпидемиологиялық ережелерін, СанЕжН 2.1.7.2790-10 «Медициналық қалдықтармен жұмыс жасауға қойылатын санитариялық-эпидемиологиялық талаптар» және ӘН 1.3.2569-09 «Құрамында патогенділіктің I–IV топтарына жататын микроорганизмдер бар материалмен жұмыс жасауда нуклеин қышқылдарын амплификациялау әдістерін пайдаланатын зертханалардың жұмысын ұйымдастыру» әдістемелік нұсқауларын сақтай отырып жүргізілуі тиіс.

Жұмыс жасағанда әрдайым келесі талаптарды сақтау қажет:

- Зерттелетін үлгілерді инфекциялық-қауіпті ретінде қарастыру, жұмыс жасау мен сақтауды СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III–IV тобына жататын микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздікке» сәйкес ұйымдастыру керек.
- Төгілген үлгілерді СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III–IV тобына жататын микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздікке» сәйкес дезинфекциялайтын құралдарды пайдаланып тазалау және дезинфекциялау керек.
- Зертханалық үдеріс бір бағытта жүргізілуі тиіс. талдау бөлек орынжайларда (аймақтарда) жүргізіледі. Жұмысты Экстракциялау Аймағында бастап, Амплификациялау және Детекциялау Аймағында жалғастыру керек. Үлгілерді, жабдықтар мен реагенттерді үдерістің алдыңғы сатысы жүргізілген аймаққа қайта әкелуге болмайды.
- Пайдаланылмаған реагенттерді, жарамдылық мерзімі өтіп кеткен реагенттерді, сондай-ақ пайдаланылған реагенттерді, қаптамасын⁴, биологиялық материал жұққан материалдарды, құралдар мен заттарды қоса, биологиялық материалды, СанЕжН 2.1.7.2790-10 «Медициналық қалдықтармен жұмыс жасауға қойылатын санитариялық-эпидемиологиялық талаптар» талаптарына сәйкес кетіру керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Амплификациялаудан кейінгі қалдықтарды (ішінде ПТР өнімдері бар пробиркаларды) жою кезінде пробиркаларды ашуға және ішіндегісін шашыратуға болмайды, өйткені бұл зертханалық аймақтың, жабдықтар мен реагенттердің ПТР өнімдерімен контаминациялануына алып келуі мүмкін.

- Әрбір операция кезінде сүзгісі бар автоматты дозаторларға арналған бір реттік ұштықтарды пайдалану және ауыстырып отыру керек⁵. Бір реттік пластик ыдысты (пробиркаларды, ұштықтарды) ішінде медициналық қалдықтарды залалсыздандыру үшін пайдалануға болатын дезинфекциялайтын құрал бар арнайы контейнерге тастау қажет.
- Үстелдердің беттеріне, сондай-ақ, ПТР қойылымы жүргізілетін орынжайларға жұмыс жасау басталғанға дейін және аяқталғаннан кейін 30 минут бойы ультракүлгін сәуле түсіру қажет.
- Реагенттер жинағы сынамалардың көрсетілген санына ПТР-зерттеуін жүргізу үшін бір рет қолдануға арналған («Құрамы» бөлмін қараңыз).
- Реагенттер жинағы осы нұсқаулыққа сәйкес қолдануға дайын. Реагенттер жинағын қатаң түрде тағайындалуы бойынша қолдану керек.
- Реагенттер жинағымен жұмыс жасауға тек, молекулалық диагностика әдістерін мен клиникалық-диагностикалық зертханада белгіленген

⁴ Пайдаланылмаған реагенттер, жарамдылық мерзімі өтіп кеткен реагенттер, пайдаланылған реагенттер, қаптамасы медициналық қалдықтардың қауіптілігінің Г класына жатқызылады.

⁵ Экстракциялау үдерісінде тұнбаустық сұйықтықты кетіру үшін сүзгісіз бір реттік ұштықтар пайдаланылады.

тәртіппен жұмыс жасау ережелерін үйренген маманға ғана рұқсат беріледі (СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III–IV тобына жататын микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздік»).

- Егер ішкі қаптамасы бүлінген болса немесе реагенттың сыртқы түрі сипатталғанға сәйкес келмесе, реагенттер жинағын пайдалануға болмайды.
- Егер нұсқаулыққа сәйкес тасымалдау және сақтау шарттары сақталмаса, реагенттер жинағын пайдалануға болмайды.
- Реагенттер жинағын жарамдылық мерзімі өткеннен кейін пайдалануға болмайды.
- Үлгілермен және реагенттермен жұмыс жасау кезінде бір реттік опаланбаған қолғаптарды, зертханалық халаттарды пайдалану, көзді қорғау керек. Жұмыс аяқталғаннан кейін қолды әбден жуу керек. Адам организмімен жанасуын болдырмас үшін, барлық операциялар тек қолғаптармен жүргізіледі.
- Буларының деммен ішке тартылуын, теріге, көзге және шырышты қабыққа тиюін болдырмау керек. Жұтып қойған жағдайда зиянды. Тиіп кеткен жағдайда, зақымданған жерді дереу сумен жуып тастау, қажет болған жағдайда медициналық көмекке жүгіну керек.
- Реагенттердің қауіпсіздігі жөніндегі парақтарды (SDS –safety data sheet) сұрату бойынша алдыруға болады.

Басталуының нәтижесінде адам организмі үшін теріс салдарлары орын алуы ықтимал оқиғаларды бағалау.

Тағайындалуы бойынша пайдаланғанда және жоғарыда атап келтірілген сақтық шаралары сақталған жағдайда, жинақ қауіпсіз.

Тағайындалуы бойынша пайдаланғанда және жоғарыда атап келтірілген сақтық шаралары сақталған жағдайда, адам организмімен жанаспайды. Апатты жағдайларда келесілер орын алуы мүмкін:

- сезімтал адамдарда көздің шырышты қабығының тітіркенуі,
- сезімтал адамдарда терінің тітіркенуі,
- аллергиялық реакция,
- деммен жұтылған жағдайда зиянды,
- ішке қабылданған жағдайда зиянды.

Реагенттер жиынтығының адам организміне спецификалық әсері:

- Канцерогендік әсері жоқ.
- Мутагендік әсері жоқ.
- Репродуктивтік уыттылығы жоқ.

Қосымша материалдар және жабдықтар

1 АЙМАҚ. Клиникалық материалдан РНҚ экстракциялау

1. РНҚ/ДНК бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп» (ТШ 9398-071-01897593-08), «МАГНО-сорб» (ТШ 9398-

106-01897593-2012), РНҚ/ДНҚ экстракциялауға арналған NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)автоматты станциясына арналған реагенттер жиынтығы) немесе Роспотребнадзор Эпидемиология ФБФМ ОҒЗИ ұсынған басқалары – жиынтықталымының 5, 6 түрдерімен жұмыс жасағанда.

2. Бактериясыз ауа ортасы боксы (ПТР-бокс).
3. Центрифуга/вортекс.
4. Көлемдері айнымалы автоматты дозаторлар.
5. Сүзгісі бар, 200 мкл дейінгі және 1000 мкл дейінгі бір реттік ұштықтар.
6. Полипропиленнен жасалған, бұралатын немесе тығыз жабылатын, көлемі 1,5 мл бір реттік пробиркалар.
7. Ұштықтар мен көлемі 1,5 мл пробиркаларға арналған штативтер.
8. Бөліп алынған РНҚ сынамаларына арналған минус 16 °С-ден аспайтын мұздатқыш камерасымен 2-ден 8 °С-ге дейінгі тоңазытқыш.
9. ӘН 1.3.2569-09 бойынша бөлек халат, қалпақ, аяқ киім және бір реттік қолғаптар.
10. Ұштықтарды тастауға арналған ыдыс.

«РИБО-сорб-12» немесе «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланғанда:

1. «Эппендорф» типті пробиркаларға арналған 25-тен 100 °С-ге дейінгі термостат.
2. «Эппендорф» типті пробиркаларға арналған 12 мың g дейінгі микроцентрифуга.
3. Тұнбаүстілік сұйықтықты шығарып тастауға арналған қармағыш колбасы бар медициналық вакуумдық сорғыш.
4. Бір реттік 10-20 мл құты.

«МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланғанда:

1. Көлемі 5 мл, диаметрі 12 мм пробиркаларға арналған, 25-тен 100 °С-ге дейінгі термостат.
2. «Эппендорф» типті пробиркаларға арналған 25-тен 100 °С-ге дейінгі термостат.
3. «Эппендорф» типті 1,5 мл пробиркаларға арналған магнитті штатив.
4. Көлемі 5 мл, диаметрі 12 мм пробиркаларға арналған магнитті штатив.
5. Тұнбаүстілік сұйықтықты шығарып тастауға арналған қармағыш колбасы бар медициналық вакуумдық сорғыш.
6. Полипропиленнен жасалған, бұралатын немесе тығыз жабылатын, көлемі 1,5 мл бір реттік пробиркалар.
7. Полипропиленнен немесе полистиролдан жасалған, бұралатын немесе тығыз жабылатын, көлемі 5 мл дейінгі, диаметрі 12 мм, түбі дөңес бір реттік пробиркалар.
8. Көлемі 5 мл дейінгі, диаметрі 12 мм пробиркаларға арналған полипропиленнен жасалған қақпақтар.
9. Көлемі айнымалы, 1000-нан 5000 мкл дейін дозалау мүмкіндігімен электронды немесе механикалық дозатор.
10. 200 мкл дейінгі, 1000 мкл дейінгі және 5000 мкл дейінгі айнымалы

көлемдегі дозаторларға арналған бір реттік ұштықтар.

11. Нуклеин қышқылдарын автоматты станцияның көмегімен экстракциялаған жағдайда – сұйықтықтарды дозалауға арналған Xiril (Xiril AG, Швейцария) роботтандырылған станциясы.

Нуклеин қышқылдарын бөліп алуға арналған автоматты станцияларды пайдаланғанда:

1. РНК/ДНК экстракциялауға арналған автоматты станция (мысалы NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция), QIA Symphony SP(QIAGEN, Германия)).
2. Автоматты станцияға арналған реактивтер мен шығын материалдарының жинағы (мысалы NucliSENS easyMAG (экстракциялауға арналған NucliSens буфері 1, экстракциялауға арналған NucliSens буфері 2, экстракциялауға арналған NucliSens буфері 3, лизиске арналған NucliSens буфері, NucliSens магнеттелген силикасы) (bioMérieux, Франция), QIA Symphony Virus/Bacteria Midi Kit (QIAGEN, Германия)).

2 АЙМАҚ. Амплификация өнімдерін кері транскрипциялау, ПТР және гибридизациялық-флуоресцентті детекциялау реакциясын жүргізу

1. Ауа ортасы бактериясыз бокс (ПТР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Көлемдері айнымалы автоматты дозаторлар.
4. Сүзгісі бар, 200 мкл дейінгі, штативтердегі бір реттік ұштықтар.
5. Көлемі 0,2 мл пробиркаларға арналған штативтер.
6. Минус 16 °С-ден аспайтын мұздатқыш камерасымен 2-ден 8 °С-ге дейінгі тоңазытқыш.
7. ЭН 1.3.2569-09 бойынша бөлек халат, қалпақ, аяқ киім және бір реттік қолғаптар.
8. Ұштықтарды тастауға арналған ыдыс.
9. Флуоресцентті сигналды «нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесімен, роторлық типті (мысалы, Rotor-Gene 3000/ 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)) немесе планшеттік типті (мысалы, iCycler iQ5 (Bio-Rad, АҚШ), Mx3000P (Stratagene, АҚШ), «ДТ-96» және «ДТ-322» («ДНК-Технология», Ресей)) және Роспотребнадзор Эпидемиология ФБФМ ОҒЗИ осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда ұсынған бағдарламаланатын амплификатор.
10. ПТР-ға арналған, полипропиленнен жасалған, көлемі 0,2 мл бір реттік пробиркалар:
 - а) ПТР-ға арналған, көлемі 0,2 мл, қақпағы дөнес, жұқа қабырғалы пробиркалар – планшеттік типтегі аспапты пайдаланғанда;
 - б) ПТР-ға арналған, жұқа қабырғалы, көлемі 0,2 мл, жайпақ қақпағы бар пробиркалар – роторлық типтегі аспапты пайдаланғанда.

Зерттелетін материалды алу, тасымалдау және сақтау

Жұмысты бастар алдында Роспотребнадзор Эпидемиология ФБФМ ОҒЗИ әзірлеген «ПТР-диагностикаға арналған клиникалық материалды алу,

тасымалдау және сақтау» Мәскеу, 2008 ж. әдістемелік ұсынымдарымен танысып шығу керек.

Талдау жүргізу үшін шеткері қанның плазмасы пайдаланылады. Қан таңертеңгілік аш қарында, ішінде 3 % ЭДТА ерітіндісі бар из 1:20 есебімен пробиркаға алынады. Қан құйылған жабық пробирканы бірнеше рет аударып-төңкереді. Қан алған сәттен бастап 6 сағат ішінде плазмасын алу және жаңа пробиркаға ауыстырып құю керек. Ол үшін қан құйылған пробирканы 800-1600 g кезінде 20 минут центрифугалайды. Плазманы 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 3 тәуліктен асырмай және – минус 68 °С-ден аспайтын температурада ұзағырақ сақтауға болады.

Жекелеген жағдайларда, қан сарысуын пайдалануға жол беріледі. Бұл материал үшін реагенттер жинағының талдамалық сезімталдығы сақталады, алайда, ұйындыны ретракциялау кезінде вирус бөлшектерінің бірге тұнуына байланысты, клиникалық сезімталдығы айтарлықтай төмендеуі мүмкін. Сарысуды 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 3 тәуліктен асырмай және – минус 68 °С-ден аспайтын температурада ұзағырақ сақтауға болады.

FRT нұсқасы

ПТР-зерттеуі келесі сатылардан тұрады:

- Зерттелетін үлгілерден РНҚ экстракциялау.
- Кері транскрипциялау және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен амплификациялау реакциясын жүргізу.
- Нәтижелерді талдау және интерпретациялау.

Зерттелетін үлгілерден РНҚ экстракциялау

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! РНҚ-мен жұмыс жасау үшін тек пластиктен жасалған бір реттік стерильді, арнайы «RNase-free», «DNase-free» таңбалары бар шығын материалдарын пайдалану қажет.

РНҚ экстракциялау үшін Роспотребнадзор Эпидемиология ФБГМ ОҒЗИ пайдаланылып отырған жинаққа берілген нұсқаулыққа сәйкес ұсынған реагенттер жиынтықтары пайдаланылады:

- **«РИБО-сорб-12»** реагенттер жиынтығын пайдаланғанда жұмыс тәртібін **А қосымшасынан** «РИБО-сорб-12» реагенттер жиынтығын пайдалана отырып РНҚ экстракциялауды» қараңыз.
- **«РИБО-преп»** реагенттер жиынтығын пайдаланғанда жұмыс тәртібін **Б қосымшасынан** «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялаудан» қараңыз.
- нуклеин қышқылдарын NucliSENS экстракциялауға арналған easyMAG (bioMerieux, Франция) автоматты станцияларын пайдаланғандағы жұмыс тәртібін **В қосымшасынан** «Нуклеин қышқылдарын бөліп алуға арналған NucliSENS easyMAG автоматты станцияларын пайдаланып РНҚ экстракциялаудан» қараңыз.
- **«МАГНО-сорб»** реагенттер жиынтығын пайдаланғанда жұмыс тәртібін **Г қосымшасынан** ««МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялаудан» қараңыз.

– РНҚ экстракциялауға арналған, осы реагенттер жинағының құрамына кірмейтін реагенттер жиынтықтарын пайдаланғандағы жұмыс тәртібін Д қосымшасынан «РНҚ экстракциялауға арналған, осы реагенттер жинағының құрамына кірмейтін жиынтықтарды пайдаланған кездегі жұмыс тәртібі, (жиынтықталымының 5 түрімен жұмыс жасағанда)».

Сонымен қатар, Роспотребнадзор Эпидемиология ФБФМ ОҒЗИ «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдары.

РНҚ КЕРІ ТРАНСКРИПЦИЯЛАУДЫ және «нақты уақыт» режимінде детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды ЖҮРГІЗУ

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! РНҚ-мен жұмыс жасағанда тек пластиктен жасалған бір реттік стерильді, арнайы «RNase-free», «DNase-free» таңбалары бар шығын материалдарын пайдалану қажет.

Амплификациялауға арналған пробиркалардың таңдалуы пайдаланылып отырған, «нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесі бар амплификаторға тәуелді.

А. Амплификациялауға арналған пробиркаларды дайындау

Реакция қоспасының жалпы көлемі – РНҚ сынамасының 25 мкл көлемін қоса 50 мкл.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! реакция қоспасының компоненттерін тура талдау жүргізер алдында араластыру керек. Реагенттерді зерттелетін және бақылау үлгілерін тестілеуден тұратын реакциялардың қажетті санына есептеп араластыру керек.

1. Жұмысты бастағанға дейін жинақтың барлық реагенттерін ерітіп, вортексте мұқият араластырыңыз және пробиркалардың қақпақтарындағы тамшыларды тұндырыңыз.
2. Зерттеудегі, бақылау үлгілері мен калибраторлардың санын ескере отырып, амплификациялауға арналған пробиркалардың қажетті санын алыңыз.
3. **Реакция қоспасын дайындау үшін ішінде лиофилизацияланған DTT бар пробиркаға ішінде КТ-ПТР-қоспаю-2-FER/FRT бар пробирканың ішіндегісін түгел қосу қажет. Қоспаны вортексте мұқият араластырыңыз және пробирканың қақпағындағы тамшыларды қысқа мерзімде центрифугалау арқылы тұндырыңыз. Дайындалған қоспаны 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 1 апта бойы сақтауға болады. Реакция қоспасын дайындау үшін бөлек бір реттік пробиркада реагенттерді 1 реакцияға есептеп: 15 мкл КТ-ПТР-қоспа-1-FRT АИТВ, КТ-ПТР-смеси-2-FER/FRT және лиофилизацияланған DTT 10 мкл қоспасы, 1,0 мкл полимераза (TaqF) және 0,5 мкл ТМ-Ревертаза (MMIV) араластыру қажет. Қоспаны вортексте мұқият араластырыңыз және пробирканың қақпағындағы тамшыларды қысқа мерзімде центрифугалау арқылы тұндырыңыз. 12 («РИБО-сорб-12» реагенттер жиынтығымен экстракциялауға арналған стандартты панель) – 16 (екі easyMAG**

картриджін пайдаланып экстракциялау) үлгі үшін экстракциялаудан кейін 20 реакцияға арналған реакция қоспасын дайындау ұсынылады, ол үшін ішінде **лиофилизацияланған DTT** бар пробиркаға ішінде **КТ-ПТР-қоспаю-2-FEP/FRT** бар пробирканың ішіндегісін түгел, ішінде **КТ-ПТР-қоспа-1-FRT** АИТВ бар пробирканың ішіндегісін түгел, ішінде **полимераза (TaqF)** бар пробирканың ішіндегісін түгел және ішінде **ТМ-Ревертаза (MMIV)** бар пробирканың ішіндегісін түгел қосу керек. Дайындалған қоспаны сақтауға болмайды.

4. Пробиркаларға **25 мкл-ден** дайын реакция қоспасын енгізіңіз. Реакция қоспасының пайдаланылмаған қалдықтарын лақтырып тастау керек.
5. Сүзгісі бар ұштықты пайдалана отырып, ішінде реакция қоспасы бар пробиркаларға зерттелетін немесе бақылау үлгілерінен экстракциялау нәтижесінде алынған **25 мкл РНҚ сынамасын** енгізіңіз. **Пробиркалардың ішіндегісін, ауа көпіршіктерінің пайда болуына жол бермей, тамыза отырып мұқият араластыру қажет.**
НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» және «NucliSENS easyMAG» реагенттер жиынтығының көмегімен бөліп алынған РНҚ сынамаларын қосқан кезде сорбенттің реакция қоспасына түсіп кетуін болдырмау қажет.
6. Бақылау реакцияларын қойыңыз:
 - а) **оң экстракция бақылауы (ОБ-1)** – пробиркаға ОБУ-1-АИТВ үлгісінен бөліп алынған **25 мкл РНҚ сынамасын** енгізіңіз.
 - б) **оң экстракция бақылауы (ОБ-2)** – пробиркаға ОБУ-2-АИТВ үлгісінен бөліп алынған **25 мкл РНҚ сынамасын** енгізіңіз.
 - в) **теріс экстракция бақылауы (ТБ)** – пробиркаға **25 мкл пробы РНҚ, ТБУ** үлгісінен бөліп алынған **25 мкл РНҚ сынамасын** енгізіңіз.
 - г) **ПТР оң бақылауы (Б+₁)** – екі пробиркаға **25 мкл-ден ДНҚ-калибратор KB1 АИТВ** енгізіңіз,
 - д) **ПТР оң бақылауы (Б+₂)** – екі пробиркаға **25 мкл-ден ДНҚ-калибратора KB2 АИТВ** енгізіңіз.

Бақылау үлгілері қосылған пробиркалардың ішіндегісін, ауа көпіршіктерінің пайда болуына жол бермей, тамыза отырып мұқият араластыру қажет.

Контаминациялануы мүмкіндігіне күдіктенгенде де ПТР теріс бақылауын (Б–) қою қажет. Ол үшін, ішінде дайын реакция қоспасы бар пробиркаға элюциялауға арналған **25 мкл буферді** енгізіңіз.

Қойылым алдында планшеттік типтегі амплификаторда пробиркалардың қабырғаларындағы тамшыларды вортексте азғантай уақыт (1-3 с) центрифугалау арқылы тұндыру ұсынылады.

Б. «Нақты уақыт» режимінде детекциялаумен амплификациялауды жүргізу

1. Аспапты («нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесі бар амплификатор) сәйкесінше амплификациялау және флуоресценттік сигналды детекциялауға арналған «АИТВ-Монитор-FRT» бағдарламасын орындау үшін бағдарламалаңыз (1, 2, 3 кестелерді қараңыз).

1 кесте

Роторлық типтегі аспаптарға арналған «АИТВ-Монитор-FRT» бағдарламасы

<i>Цикл</i>	<i>Температура, °C</i>	<i>Уақыт</i>	<i>Флуоресценцияны өлшеу</i>	<i>Циклдар саны</i>
Hold/ Температураны ұстап тұруы	50	30 мин	–	1
Hold/ Температураны ұстап тұруы	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклдеу	95	20 с	–	5
	52	30 с	–	
	72	30 с	–	
Cycling 2/ Циклдеу 2	95	20 с	–	40
	55	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	30 с	–	

2 кесте

**Планшеттік типтегі аспаптарға арналған «АИТВ-Монитор-FRT» бағдарламасы
(«ДНК-Технология» фирмасының аспаптарынан басқа)**

<i>Цикл</i>	<i>Температура, °C</i>	<i>Уақыт</i>	<i>Флуоресценцияны өлшеу</i>	<i>Циклдар саны</i>
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	5
	52	30 с	–	
	72	30 с	–	
4	95	20 с	–	42
	55	40 с	FAM, HEX	
	72	30 с	–	

«ДНҚ-Технология» фирмасының аспаптарына арналған «АИТВ-Монитор-FRT» бағдарламасы

<i>Цикл</i>	<i>Температура, °C</i>	<i>Уақыт</i>	<i>Флуоресценцияны өлшеу</i>	<i>Циклдар саны</i>
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	5
	52	30 с	–	
	72	30 с	–	
4	95	5 с	–	42
	60	30 с	-	
	55	40 с	FAM, HEX	

2. Пробиркаларды аспаптың реакция модулінің ұяшықтарына орнатыңыз.
3. Флуоресцентті сигналды детекциялаумен амплификациялау бағдарламасын орындауды іске қосыңыз.
4. Бағдарламаны орындау аяқталғаннан кейін нәтижелерді талдауға және интерпретациялауға кірісіңіз.

Нәтижелерді талдау және интерпретациялау

Нәтижелерді талдау «нақты уақыт» режимінде детекциялаумен ПТР жүргізу үшін пайдаланылып отырған аспаптың бағдарламалық жасақтамасының көмегімен жүргізіледі. Флуоресценттік сигналдың екі арна бойынша жинақталған қисықтары талданады:

- флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша ІБҮ жДНҚ амплификациялау өнімінің жинақталғанын көрсететін сигнал тіркеледі,
- флуорофорға арналған JOE арнасы бойынша АИТВ жДНҚ фрагментін амплификациялау өнімінің жинақталғанын көрсететін сигнал тіркеледі.

Нәтижелер флуоресценция қисығының шектік сызықпен қиылысуының болуы (немесе болмауы) негізінде интерпретацияланады (логарифмдік шкалада оң бақылаудың флуоресценция өрлеуінің сызықтық бөлігінің ортасына орнатылады), бұл нәтижелер кестесіндегі сәйкесінше бағанда шектік цикл *Ct* мәнінің болуына (немесе болмауына) сәйкес келеді.

Шектік цикл *Ct* мәндерінің (флуоресценция қисығының сәйкесінше деңгейде орнатылған шектік сызықпен қиылысуы) негізінде және KB1 және KB2 калибраторларының берілген мәндері бойынша калибровкалау кестесінің құрылуы және ПТР сынамасындағы ОБҮ (JOE/HEX арнасы бойынша) және ІБҮ (FAM арнасы бойынша) ДНҚ копий мәндерін есептеу автоматты түрде орын алады. Алынған мәндер зерттеудегі және бақылау үлгілеріндегі АИТВ РНҚ концентрациясын келесі формула бойынша есептеу үшін пайдаланылады:

ПТР сынамасындағы АИТВ

жДНҚ копий саны

ПТР сынамасындағы ІБҮ жДНҚ
копий саны

$\frac{\text{жДНҚ копий саны}}{\text{ІБҮ жДНҚ копий саны}} \times A \text{ коэффициенті} \times B \text{ коэффициенті} = \text{АИТВ РНҚ копий /мл плазмы}$

$$A \text{ коэффициенті} = \frac{\text{экстракциялау көлемі,}}{\text{мкл}}$$

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Оң бақылаулар (ОБ-1 және ОБ-2) үшін концентрациясын есептеу А коэффициентін ескерусіз жүргізіледі.

В коэффициенті (мл плазмадағы ІБҮкопий саны) реагенттер жинағының осы сериясына берілген қосымша парақта көрсетіледі және басқа серияларының реагенттерін пайдаланып талдау кезінде алынған нәтижелерді есептеу үшін пайдалануға болмайды. Жиынтықталымының **5 түрі** үшін В коэффициенті осы серия жинағының бірінші қойылымы кезіндегі калибровкалануы бойынша есептеп шығарылады (**Д қосымшасын** «РНҚ экстракциялауға арналған, осы реагенттер жинағының құрамына кірмейтін жиынтықтарды пайдаланғандағы (жиынтықталымының 5 түрімен жұмыс жасағанда) жұмыс тәртібін» қараңыз).

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Егер нәтиже 10.000.000 копий/мл-ден көп болса, онда ол **АИТВ РНҚ 10.000.000 копий /мл-ден артық нәтижесі** ретінде беріледі. Сызықтық ауқымнан жоғары мән алынған жағдайда, үлгіні 10 есе сұйылтудан кейін қайта тестілеуге болады; алынған нәтижені 10-ға көбейтеді. Егер нәтиже 100 мкл үлгіні экстракциялаған кезде 500 копий/мл-ден, 200 мкл үлгіні экстракциялаған кезде 250 копий/мл-ден және 1 мл үлгіні экстракциялаған кезде 50 копий/мл-ден аз болса, онда ол сәйкесінше **АИТВ РНҚ 500/250/50 копий /мл-ден аз нәтижесі** ретінде беріледі.

Ескертпе – Өшеу нәтижелерін Халықаралық бірліктермен (ХБ/мл) алу қажет болған жағдайда, копий/мл бірліктерімен өлшенген нәтижелерді, 1,75-ке көбейту қажет (яғни 1 копий =1,75 ХБ, 1 ХБ=0,57 копий).

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! ІБҮ концентрациясының шектік мәндері реагенттер жинағына қоса берілген қосымша парақта көрсетілген. Сонымен қатар, нақты уақыттағы ПТР-ға арналған сәйкесінше аспаптарға берілген нұсқаулықтарды және «Амплиценс[®] АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарды қараңыз.

Бақылау үлгілеріндегі нәтижелерді интерпретациялау

Егер бақылау реакцияларының нәтижелерін бағалау кестесіне сәйкес бақылау үлгілері үшін дұрыс нәтижелер алынса, ПТР-зерттеуінің нәтижесі дұрыс деп есептеледі (4 кестені қараңыз).

4 кесте

ПТР-зерттеуінің түрлі сатыларының бақылауларына арналған нәтижелер

Бақылау	ПТР-зерттеуінің бақыланатын сатысы	Арна бойынша амплификациялау нәтижесі	
		FAM/Green	JOE/Yellow/HEX
ОК	РНҚ экстракциялау, ПТР	оң (ІБҮ концентрациясы шектік мәннен жоғары)	<i>St</i> мәні жоқ Teric
ОБ-1	РНҚ экстракциялау, ПТР	оң (ІБҮ концентрациясы шектік мәннен жоғары)	оң Қосымша парақтағы ІБҮ копий/мл арқылы есептеулер

			нәтижелері бойынша бірілген ауқымына сай келуі тиіс
ОБ-2	РНҚ экстракциялау, ПТР	оң (ІБҮ концентрациясы шектік мәннен жоғары)	оң Қосымша парақтағы ІБҮ копий/мл арқылы есептеулер нәтижелері бойынша бірілген ауқымына сай келуі тиіс
Б+ ₁	ПТР	оң	оң
Б+ ₂	ПТР	оң	оң
Б-	ПТР	Теріс <i>Ct</i> мәні жоқ	Теріс <i>Ct</i> мәні жоқ

Бақылау үлгілері үшін ІБҮ концентрациясының шектік (жол берілетін ең төменгі) мәндері, осы сериядағы «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағына қоса берілген қосымша парақта көрсетілген.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!

- Егер РНҚ экстракциясының теріс бақылауы (ТБ) үшін каналу JOE/Yellow/HEX арнасы бойында және/немесе ПТР теріс бақылауы (Б-) үшін FAM/Green және JOE/Yellow/HEX арналары бойынша шектік цикл мәні *Ct* алынса, АИТВ РНҚ анықталған үлгілердің барлығы үшін зерттеуді РНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау қажет.
- Егер нәтижелер кестесінде сәйкесінше арна бойынша ІБҮ концентрациясы қосымша парақта көрсетілген шектік мәннен төмен болса, бұл сынаманы талдаудың бірінші сатысынан бастап қайтадан қою қажет.
- Егер калибровкалау түзуін құрудағы R^2 корреляциясы коэффициенті 0.98-ден кіші болса, барлық сынамалар үшін ПТР қайта қою қажет.
- Егер есептеп шығарылған ОБҮ-1-АИТВ және ОБҮ-2-АИТВ концентрациялары қосымша парақта көрсетілген ауқымға сай келмесе, барлық сынамаларды талдаудың бірінші (РНҚ экстракциялау) сатысынан бастап қайтадан қою қажет.

Қысқартылған сөздердің тізімі

Осы нұсқаулықта келесі қысқартулар мен белгілер қолданылады:

АИТВ-1	- адамның 1 типті иммунтапшылығы вирусы
ІБҮ	- ішкі бақылау үлгісі
Б-	- ПТР теріс бақылауы
Б+	- ПТР оң бақылауы
ОК	- теріс экстракция бақылауы
ТБҮ	- теріс бақылау үлгісі
КТ	- кері транскрипция
ПК	- оң экстракция бақылауы
ОБҮ	- оң бақылау үлгісі
ПТР	- полимеразалық тізбекті реакция
Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ	- Тұтынушылардың құқығы мен адамның әл-ауқатын қорғау саласындағы Федералдық қызметтің «Эпидемиология Орталық ғылым-зерттеу институты» Федералдық бюджеттік ғылым

	мекемесі
FRT	- «нақты уақыт» режимінде флуоресцентті детекциялау

Сақтау шарттары

Нуклеин қышқылдарын бөліп алуға арналған NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) автоматты станциясына арналған реагенттер жиынтығын өндірушінің нұсқаулығына сәйкес сақтау керек. «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп» реагенттер жиынтықтарын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. «МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығын 2-ден 25 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. «ПТР-жиынтық» пен «Калибровкалауға арнаған *HIV-Q* жиынтығын» минус 16 °С-ден аспайтын температурада сақтау керек. KB1 АИТВ, KB2 АИТВ, ОБУ-1-АИТВ, ОБУ-2-АИТВ және ІБҮ АИТВ-М-FRT екі реттен артық мұздатып қатыруға / ерітуге жол берілмейді, еріткеннен кейін KB1 АИТВ, KB2 АИТВ, ОБУ-1-АИТВ, ОБУ-2-АИТВ және ІБҮ АИТВ-М-FRT 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 6 айдан асырмай температурада сақтау керек. КТ-ПТР-коспа-1-FRT АИТВ жарықтан қорғалған жерде сақтау керек.

Тасымалдау

Реагенттер жинағын ішінде салқындатқыш элементтер бар термоконтейнерлерде 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 5 тәуліктен асырмай, жабық көлік құралдарының барлық түрлерімен тасымалдау керек. Алған кезде жиынтығын көрсетілген сақтау температураларына сәйкес ашу керек.

Босатылу шарттары

Емдеу-профилактика мекемелері және санитариялық-профилактикалық мекемелер үшін.

Жарамдылық мерзімі

Сақтау мерзімі - 12 ай. Ашылған реагенттердің жарамдылық мерзімі, егер нұсқаулықта басқаша көрсетілмесе, ашылмаған реагенттерге арналған заттаңбаларда көрсетілген жарамдылық мерзіміне сәйкес келеді.

Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін қолдануға болмайды

Баспа өнімінде пайдаланылатын символдар



Каталогтағы нөмірі












Сақ болыңыз! Ілеспе құжаттаманы қараңыз



Партиясының коды



Тестілердің ең көп саны

	In vitro диагностикаға арналған бұйым		Жарамдылық мерзімі
	Өзгертілген күні		Пайдалану жөніндегі нұсқаулықты қараңыз
	Температура шектелімі		Күн сәулесінің түсуіне жол бермеу керек
	Температураның жоғарғы шегі		Дайындалған күні
	Өндіруші		

Медициналық мақсаттағы бұйым осыған сәйкес өндірілген нормативтік құжат

Клиникалық материалда адамның 1 типті иммунтапшылығы вирусының (АИТВ-1) РНҚ полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен сандық анықтауға арналған «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағы. Техникалық шарттар ТШ 9398-008-01897593-2012

Өндіруші

Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ (111123, Мәскеу қ., Новогиреевск к-сі, 3а үй, тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru)

Реагенттер жинағының сапасына білдірілген наразылықтарды дайындаушы кәсіпорын Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ (111123, Мәскеу қ., Новогиреевск к-сі, 3а үй) наразылықтармен жұмыс және оқытуды ұйымдастыру бөліміне жіберу керек (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

«АмплиСенс» өнімі туралы пікірлер мен ұсыныстарды www.amplisens.ru сайтында тұтынушы анкетасын толтыру арқылы қалдыруға болады.

Қазақстан Республикасы аумағында тұтынушылардан медициналық мақсаттағы бұйымның сапасына қатысты шағымдарды қабылдайтын ұйымның мекенжайы

«КБ Диагностик» ЖШС, Алматы обл., Іле ауданы, Боралдай кенті, (Аэропорт), тел./факс 8 (727) 331-31-47
E-mail info@kb-diagnostic.kz

Өтінім беруші:

«КБ Диагностик» ЖШС
директоры

Калимбаев К.А.

А ҚОСЫМШАСЫ. «РИБО-сорб-12» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялау

Сезімталдығын арттыру үшін алдын ала 1 мл плазманы 1 сағат бойы центрифуганың кемінде 24000 g жылдамдығымен 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада ультрацентрифугалауды жүргізу ұсынылады. Содан соң 900 мкл тұнбаүстілік сұйықтық алу және тұнбамен (100 мкл) төменде сипатталғандай жұмыс жасау керек. Ультрацентрифугалау бұралатын қақпақтары бар 1,5 мл пробиркаларда жүргізіледі.

Жұмыс тәртібі

1. **Лизистейтін ерітіндіні және АИТВ жуып-шаюға арналған ерітіндіні** (егер олар 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақталса) 60 °С температурада кристалдары толық ерігенге дейін қыздыру керек.
2. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын алыңыз (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса). Пробиркаларды таңбалаңыз.
3. Әр пробирканың түбіне **10 мкл-ден АИТВ-М-FRT ІБҮ** енгізіңіз.
4. Пробиркаларға **450 мкл-ден лизистейтін ерітінді** енгізіңіз.
Үлгілердің көлемі көп болған жағдайда, экстракциялау емиарасын жеңілдету үшін, лизистейтін ерітінді мен ІБҮ бөлек бір реттік құтыда (бір үлгіге 450 мкл лизистейтін ерітінді және 10 мкл ІБҮ есебінен) араластырып, ары қарай алдын ала дайындалған 1,5 мл пробиркаларға қоспаны 450 мкл-ден енгізуге жол беріледі.
Бақылауларды қоса 12 сынамадан РНҚ экстракциялау кезінде, ішінде лизистейтін ерітінді бар құтыға 130 мкл ІБҮ АИТВ-М-FRT қосуға жол беріледі. Мұқият араластырғаннан кейін алдын ала дайындалған 1,5 мл пробиркаларға 450 мкл қоспаны енгізіңіз. Лизистейтін ерітіндінің АИТВ-М-FRT ІБҮ-мен қоспасын 2 сағаттан асырмай сақтау керек.
5. Сүзгісі бар ұштықтарды пайдалана отырып, пробиркаларға **зерттелетін үлгілерді 100 мкл-ден** енгізіңіз. Қақпақтарын жабыңыз және вортексте араластырыңыз. Қақпағындағы сұйықтық тамшыларын кетіру үшін центрифугада тұндырыңыз.
6. Әрбір панель үшін **оң бақылауларды (ОБ-1, ОБ-2)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітінді бар дайындалған ОБҮ-1 пробиркасына **90 мкл ТБҮ мен 10 мкл ОБҮ-1-АИТВ** қосыңыз, ал ішінде лизистейтін ерітінді бар дайындалған ОБҮ-2 пробиркасына **90 мкл ОКО және 10 мкл ОБҮ-2-АИТВ** қосып, пробиркалардың ішіндегісін вортексте араластырыңыз және қақпақтарындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз.
7. Әрбір панель үшін **теріс бақылау (ТБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітінді бар пробиркаға **100 мкл ТБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз және қақпағындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз.
8. Сорбентті вортексте қатты араластыра отырып қайта суспензиялаңыз. Әр пробиркаға бөлек ұштықпен **қайта суспензияланған сорбентті 25 мкл-ден** қосыңыз.
9. Пробиркалардың ішіндегісін вортексте араластырыңыз және әр 2 минут сайын мұқият араластыра отырып, бөлме температурасында 10 минутқа

қалдырыңыз.

10. Пробиркаларды микроцентрифугада 7 мың g кезінде (*мысалы, MiniSpin, Eppendorf центрифугасы үшін минутына 10 мың айналыммен*) 1 минут бойы центрифугалаңыз.
11. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, әр пробиркадағы тұнбаүстілік сұйықтықты бөлек ұштықпен шығарып тастаңыз.
12. Пробиркаларға **500 мкл-ден АИТВ жуып-шаюға арналған ерітіндіні** қосыңыз. Вортексте сорбент толығымен қайта суспензияланғанға дейін араластырыңыз. Пробиркаларды микроцентрифугада 7 мың g кезінде 1 минут бойы центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, әр пробиркадағы тұнбаүстілік сұйықтықты бөлек ұштықпен шығарып тастаңыз.
13. Пробиркаларға **500 мкл-ден жуып-шаюға арналған 3 ерітіндіні** қосыңыз. Вортексте сорбент толығымен қайта суспензияланғанға дейін араластырыңыз. Пробиркаларды микроцентрифугада 7 мың g кезінде 1 минут бойы центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, әр пробиркадағы жуып-шаюға арналған 3 ерітіндіні түгелімен бөлек ұштықпен шығарып тастаңыз.
14. **Жуып-шаюға арналған 3 ерітіндімен** жуып-шаюды қайталаңыз.
15. Пробиркаларға **500 мкл-ден жуып-шаюға арналған 7 ерітіндіні** қосыңыз. Вортексте сорбент толығымен қайта суспензияланғанға дейін араластырыңыз. Пробиркаларды микроцентрифугада 7 мың g кезінде 1 минут бойы центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, әр пробиркадағы жуып-шаюға арналған 7 ерітіндіні түгелімен бөлек ұштықпен шығарып тастаңыз.
16. Пробиркалардың қақпағын ашып 60 °C температурадағы термостатқа 10 минутқа сала отырып, сорбентті кептіріңіз.
17. Әрбір пробиркаға **50 мкл-ден элюцияға арналған буферді** қосыңыз және сорбентті қайта суспензиялаңыз. Термостатта 60 °C температурада 5 минут қыздырыңыз, вортексте араластырыңыз және сорбентті центрифугада 12 мың g кезінде (*мысалы, MiniSpin, Eppendorf центрифугасы үшін минутына 13 400 айналыммен*) 1 минут бойы тұндырыңыз.

РНҚ-сынамалары КТ-ПТР реакциясын қоюға дайын, оны тазартылған РНҚ алғаннан кейін бірден жүргізу ұсынылады.

Ескертпе – Сорбенттің лайлану белгілер пайда болған жағдайда, сорбентті центрифугада 12 мың g кезінде 1 минут бойы қайтадан тұндыру керек.

РНҚ-сынамаларын 2-ден 8 °C-ге дейінгі температурада 30 минуттан ұзақ сақтау ұсынылмайды. Препаратты ұзағырақ сақтау үшін, сорбентке тиіп кетпей, тұнбаүстілік сұйықтықты стерильді пробиркаға ауыстыру және минус 16 °C-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °C- ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау қажет.

Б ҚОСЫМШАСЫ. «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдалана отырып РНҚ экстракциялау

Сезімталдығын арттыру үшін алдын ала 1 мл плазманы 1 сағат бойы центрифуганың кемінде 24000 g жылдамдығымен 2-ден 8 °C-ге дейінгі температурада ультрацентрифугалауды жүргізу ұсынылады. Содан соң 900 мкл тұнбаүстілік сұйықтық алу және тұнбамен (100 мкл) төменде сипатталғандай жұмыс жасау керек. Ультрацентрифугалау бұралатын қақпақтары бар 1,5 мл пробиркаларда жүргізіледі.

Жұмыс тәртібі

1. **Лизиске арналған ерітіндіні** (егер ол 2-ден 8 °C-ге дейінгі температурада сақталса) 65 °C-ге дейінгі температурада кристалдары толық ерігенге дейін қыздырыңыз.
2. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын алыңыз (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса). Пробиркаларды таңбалаңыз.
3. Әрбір пробирканың түбіне **10 мкл-ден АИТВ-М-FRT ІБҮ** енгізіңіз.
4. Пробиркаларға **300 мкл-ден лизиске арналған ерітіндіні** енгізіңіз.
Үлгілердің көлемі көп болған жағдайда, экстракциялау емиарасын жеңілдету үшін, бөлек бір реттік құтыда лизиске арналған ерітінді мен ІБҮ араластырып (бір үлгіге лизиске арналған 300 мкл ерітінді және 10 мкл ІБҮ есебінен), ары қарай алдын ала дайындалған 1,5 мл пробиркаларға қоспаны 300 мкл-ден енгізуге жол беріледі.
5. Сүзгісі бар ұштықтарды пайдалана отырып, пробиркаларға **зерттеудегі үлгілерді 100 мкл-ден** енгізіңіз. Қақпақтарын жабыңыз және вортексте араластырыңыз. қақпағындағы сұйықтық тамшыларын кетіру үшін, центрифугада тұндырыңыз.
6. Әрбір панель үшін **оң бақылауларды (ОБ-1, ОБ-2)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизиске арналған ерітінді бар дайындалған ОБҮ-1 пробиркасына **90 мкл ТБҮ мен 10 мкл ОБҮ-1-АИТВ** қосыңыз, ал ішінде лизиске арналған ерітінді бар дайындалған ОБҮ-2 пробиркасына **90 мкл ТБҮ мен 10 мкл ОБҮ-2-АИТВ** қосып, пробиркалардың ішіндегісін вортексте араластырыңыз.
7. Әрбір панель үшін **теріс бақылау (ТБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизиске арналған ерітіндісі бар пробиркаға **100 мкл ТБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз және қақпағындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз.
8. Пробиркалардың ішіндегісін термостатта **65 °C-де 5 минут** қыздырыңыз, вортексте араластырыңыз және қақпағындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз.
9. Пробиркаларға **400 мкл-ден преципитацияға арналған ерітінді** қосып, вортексте араластырыңыз.
10. Пробиркаларды микроцентрифугада **12 мың g** кезінде **5 минут** бойы центрифугалаңыз (*мысалы, MiniSpin, Eppendorf центрифугасы үшін минутына 13 400 айналыммен*).
11. Абайлап, тұнбаға тиіп кетпей, вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдалана отырып, тұнбаүстілік сұйықтықты алыңыз.

12. Пробиркаларға **500 мкл-ден жуып-шаюға арналған 3 ерітінді** қосып, қақпақтарын мықтап жабыңыз, пробиркаларды 3-5 рет аударып-төңкере отырып, тұнбаны абайлап жуып-шайыңыз.
13. Микроцентрифугада **12 мың g кезінде 1-2 минут бойы** центрифугалаңыз.
14. Абайлап, тұнбаға тиіп кетпей, вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдалана отырып, тұнбаүстілік сұйықтықты алыңыз.
15. Пробиркаларға **200 мкл-ден раствора жуып-шаюға арналған 4 ерітіндіні** қосып, қақпақтарын тығыз жабыңыз және пробиркаларды 3-5 рет аударып-төңкере отырып, тұнбаны абайлап жуып-шайыңыз.
16. Микроцентрифугада **12 мың g кезінде 2 минут бойы** центрифугалаңыз.
17. Абайлап, тұнбаға тиіп кетпей, вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдалана отырып, тұнбаүстілік сұйықтықты алыңыз.
18. Тұнбаны кептіру үшін, пробиркаларды 5 минутқа 65 °С температурадағы термостатқа салыңыз (бұл кезде пробиркалардың қақпақтары ашық тұруы тиіс).
19. Пробиркаларға **50 мкл-ден РНҚ-буфер** қосыңыз. Вортексте араластырыңыз. **65 °С** температурадағы термостатқа **5 минутқа** салып, вортексте жүйелі түрде араластырып отырыңыз.
20. Пробиркаларды микроцентрифугада **12 мың g кезінде 1 минут бойы** центрифугалаңыз. Тұнбаүстілік сұйықтықтың құрамында тазартылған РНҚ бар.

РНҚ-сынамалары КТ-ПТР реакциясын қоюға дайын, оны тазартылған РНҚ алғаннан кейін бірден жүргізу ұсынылады.

РНҚ-сынамаларын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 30 минуттан ұзақ сақтау ұсынылмайды. Ұзағырақ сақтау үшін, препаратты минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау қажет.

В ҚОСЫМШАСЫ. Нуклеин қышқылдарын экстракциялауға арналған NucliSENS easyMAG (bioMerieux, Франция) автоматты станциясын пайдалана отырып РНҚ экстракциялау

В1. 100 мкл үлгіден РНҚ экстракциялау, аспаптан тыс лизис

Жұмыс тәртібі

1. NucliSENS easyMAG аспабын қосыңыз және оны аспапқа берілген нұсқаулықты басшылыққа ала отырып РНҚ экстракциялауға дайындаңыз.
2. Зерттелетін үлгілері енгізуге арналған терезеде әр үлгі үшін келесі параметрлерді енгізіңіз: үлгінің атауы, РНҚ экстракциялауға арналған материал (*Matrix*) – плазма (*Plasma*), үлгінің көлемі (*Volume*) – **0,1 ml**, элюция көлемі (*Eluate*) – **55 mkl**, үлгінің типі (*Type*) – **Lysed**, үлгілердегі РНҚ экстракциялау кезектілігі (*Priority*) – **normal**.
3. РНҚ экстракциялаудың жаңа хаттамасын жасаңыз және оны сақтап қойыңыз. Хаттамада, үлгілерді лизистеу мен инкубациялау аспаптан тыс жүретіндігін көрсетіңіз: ***On-board Lysis Buffer Dispensing-No, On-board Lysis Incubation-No***.
4. Бағдарламаланған үлгілерді жасалған хаттамаға көшіріңіз.
5. NucliSENS easyMAG аспабындағы РНҚ экстракциялауға арналған easyMAG картриджінің ұяшықтарына **450 мкл-ден лизиске арналған NucliSens буферін** енгізіңіз.
6. Әрбір ұяшыққа сүзгісі бар бөлек ұштықпен зерттеліп отырған **100 мкл плазманы** қосып, тамыза отырып мұқият араластырыңыз.
7. Әрбір панель үшін **оң бақылаулар (ОБ-1, ОБ-2)** қою қажет. Ол үшін ОБУ-1 картриджінің ішінде лизиске арналған NucliSens буфері бар дайындалған ұяшығына **90 мкл ТБҮ мен 10 мкл ОБУ-1-АИТВ** қосыңыз, ал ОБУ-2 картриджінің ішінде лизиске арналған NucliSens буфері бар дайындалған ұяшығына **90 мкл ТБҮ мен 10 мкл ОБУ-2-АИТВ** қосып, тамыза отырып мұқият араластырыңыз.
8. Әрбір панель үшін **теріс бақылау (ТБ)** қою қажет. Ол үшін лизиске арналған NucliSens буфері бар картридждің ұяшығына **100 мкл ТБҮ** қосып, тамыза отырып мұқият араластырыңыз.
9. Үлгілер салынған картридждерді лизисі жүруі үшін бөлме температурасында 10 минутқа қалдырыңыз.
10. Бөлек стерильді 1,5 мл пробиркада NucliSens магнитті силикасы мен ІБҮ сүзгісі бар стерильді ұштықтармен араластырыңыз (5 кестені қараңыз).

Магнитті силика мен ІБҮ қоспасын дайындау

РНҚ экстракциялауға арналған үлгілер саны	NucliSens магнитті силикасының мөлшері, (мкл)	ІБҮ саны, (мкл)
1	10	10
8	90	90
16	170	170
24 (аспап толық жүктеледі)	250 (қосымша 25 сынама қорымен)	250

11. Әрбір ұяшыққа бөлек ұштықпен **20 мкл NucliSens магнитті силикасы мен ІБҮ дайындалған қоспасын** қосыңыз. Әрбір ұяшықтағы сұйықтықты сүзгісі бар 1000 мкл ұштықтармен, дозатордың көмегімен тамыза отырып мұқият араластырыңыз.
12. Үлгілер салынған картридждерді аспапқа жүктеп, ұштықтарын орнатыңыз, үлгілерді аспаптан тыс лизистеумен РНҚ экстракциялау бағдарламасын іске қосыңыз (*Off board*).
13. РНҚ экстракциялау аяқталғаннан кейін, аспаптағы картридждерді шығарып алыңыз және **РНҚ экстракциялау емшарасы аяқталғаннан кейін 30 минуттан кешіктірмей КТ-ПТР реакциясын жүргізіңіз.**

Ұзақ уақыт сақтау үшін, препаратты бір реттік пробиркаға ауыстыру және минус 16 °С температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау керек.

В2. Аспаптағы автоматты лизистеумен 100 мкл немесе 1000 мкл үлгіден РНҚ экстракциялау

Жұмыс тәртібі

1. Үлгіні лизистеу NucliSENS easyMAG аспабында автоматты режимде жүзеге асады. NucliSENS easyMAG аспабындағы РНҚ экстракциялауға арналған easyMAG картриджінің әрбір ұяшығына, сүзгісі бар бөлек-бөлек ұштықпен зерттеліп отырған плазманың 100 мкл немесе 1 мл қосу қажет.
2. Әрбір панель үшін **оң бақылаулар (ОБ-1, ОБ-2)** қою қажет. Ол үшін картридждің ОБ-1 арналған ұяшығына **90 мкл ТБҮ және 10 мкл ОБҮ-1-АИТВ** қосыңыз, ал картридждің ОБ-2 арналған ұяшығына **90 мкл ТБҮ және 10 мкл ОБҮ-2-АИТВ** қосыңыз.
3. Әрбір панель үшін **теріс бақылау (ТБ)** қою керек. Ол үшін картридждің ТБ арналған ұяшығына **100 мкл ОКО** қосыңыз.
4. NucliSENS easyMAG аспабын қосыңыз және оны аспапқа берілген нұсқаулықты басшылыққа ала отырып РНҚ экстракциялауға дайындаңыз.
5. Зерттелетін үлгілерді енгізуге арналған терезеде әр үлгі үшін келесі параметрлерді енгізіңіз: үлгінің атауы, РНҚ экстракциялауға арналған материал (*Matrix*) – плазма (*Plasma*), үлгінің көлемі (*Volume*) – пайдаланылып отырған клиникалық материалдың көлеміне байланысты **100 mkl** немесе **1 ml**, элюция көлемі (*Eluate*) – **55 mkl**, үлгінің типі (*Type*) – *Primary*, үлгілердегі РНҚ экстракциялау кезектілігі (*Priority*) – *normal*.

6. РНҚ экстракциялаудың жаңа хаттамасын жасаңыз және оны сақтап қойыңыз. Хаттамада, үлгілерді лизистеу мен инкубациялау аспапта жүзеге асатындығын көрсетіңіз: ***On-board Lysis Buffer Dispensing –Yes, On-board Lysis Incubation – Yes.***
7. Бағдарламаланған үлгілерді құрылған хаттамаға көшіріңіз.
8. Үлгілері бар картридждерді аспапқа жүктеп, ұштықтарын орнатыңыз, аспапта үлгілерді лизистеумен РНҚ экстракциялау бағдарламасын іске қосыңыз (***On board***).
9. NucliSENS easyMAG автоматты станциясы ***Instrument State-Idle*** қалпында жұмысын тоқтатқанша күтіңіз (шамамен 15 минут).
10. Бөлек стерильді 1,5 мл пробиркада NucliSens магнитті силикасы мен ІБҮ, аэрозольді бөгеті бар стерильді ұштықтармен араластырыңыз (5 кестені қараңыз).
11. Аспаптың қақпағын ашыңыз және әрбір ұяшыққа бөлек ұштықпен **NucliSens магнитті силикасы мен ІБҮ дайындалған қоспасын 20 мкл-ден** қосыңыз. Әрбір ұяшықтағы сұйықтықты дозатордың көмегімен сүзгісі бар жеке-жеке 1000 мкл ұштықтармен тамыза отырып мұқият араластырыңыз.
12. Аспапта РНҚ экстракциялауды жалғастыру бағдарламасын іске қосыңыз.
13. РНҚ экстракциялау аяқталғаннан кейін, аспаптағы картриджтерді шығарып алыңыз және **РНҚ экстракциялау емшарасы аяқталғаннан кейін 30 минуттан кешіктірмей КТ-ПТР реакциясын жүргізіңіз.**

Ұзақ уақыт сақтау үшін, препаратты бір реттік пробиркаға ауыстырып салу қажет және минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау керек.

Г ҚОСЫМШАСЫ. «МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялау

Г1. 1000 мкл плазма үлгісінен экстракциялау

Жұмыс тәртібі

1. Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі мен жуып-шаюға арналған 5 ерітіндіні 60 °С температурада кристалдары толық ерігенге дейін қыздыру керек.
2. Бір реттік 5 мл пробиркалар мен бір реттік қақпақтардың қажетті санын (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса) дайындаңыз және оларды таңбалаңыз.
3. 24 үлгіден РНҚ экстракциялау кезінде:
 - ішінде лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі (70 мл) бар құтыға 280 мкл ІБҮ АИТВ-М-FRT, А компоненті бар (0,6 мл) пробирканың ішіндегісін түгел және магнеттелген силика (0,9 мл) бар пробирканың ішіндегісін түгел енгізіңіз;
 - құтының қақпағын жабыңыз және 5-7 рет аударып-төңкере отырып, көбік түзілуін болдырмай мұқият араластырыңыз;
 - 5 мл пробиркаға лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісінің, ІБҮ, А компоненті мен магнеттелген силиканың дайындалған қоспасын 2,6 мл-ден енгізіңіз.
4. 24-тен аз үлгіден РНҚ экстракциялау кезінде:
 - бөлек 1,5 мл стерильді пробиркада АИТВ-М-FRT ІБҮ, А компоненті мен магнеттелген силиканы бір нүктеге шаққанда есептеп араластырыңыз: 10 мкл ІБҮ АИТВ-М-FRT, 20 мкл А компоненті және 30 мкл магнеттелген силика. Есептеу кезінде артығымен ескеру –бір нүктеге көбірек есептеу қажет, мысалы:

РНҚ экстракциялауға арналған үлгілер саны	ІБҮ АИТВ-М-FRT (мкл)	А компоненті (мкл)	Магнеттелген силика (мкл)
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

- 5 мл пробиркаларға 60 мкл АИТВ-М-FRT ІБҮ, А компоненті және магнеттелген силиканың дайындалған қоспасын енгізіңіз;
 - 5 мл пробиркаларға лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісін 2,6 мл-ден енгізіңіз.
5. Ішінде лизистейтін ерітіндісі бар әрбір пробиркаға зерттеудегі 1 мл плазма үлгісін қосып, тамыза отырып араластырыңыз және қақпағын жабыңыз.
 6. Әрбір панель үшін оң бақылауларды (ОБ-1, ОБ-2) қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітінді бар дайындалған ОБҮ-1 пробиркасына 90 мкл ТБҮ және 10 мкл ОБҮ-1-АИТВ қосыңыз, ал ішінде лизистейтін ерітінді бар дайындалған ОБҮ-2 пробиркасына 90 мкл ТБҮ және 10 мкл ОБҮ-2-АИТВ қосып, тамыза отырып араластырыңыз және қақпағын жабыңыз.

7. Әрбір панель үшін **теріс бақылау (ТБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітінді бар пробиркаға **100 мкл ТБҮ** қосып, тамыза отырып араластырыңыз және қақпағын жабыңыз.
8. Пробиркаларды **60 °С** температурадағы термостатқа **10 минутқа** салыңыз.
9. Пробиркаларды **6 минутқа** магниттік штативке ауыстырып салыңыз.
10. Сүзгісіз 1000 мкл ұштықтарды пайдалана отырып, абайлап, вакуумды сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдалана отырып, пробирканың қабырғасы бойымен тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз. Пробиркаларды әдеттегі штативке ауыстырып салыңыз.
11. Пробиркаларға **700 мкл-ден жуып-шаюға арналған ерітінді 5** қосып, пробиркалардың қақпағын жабыңыз.
12. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын алыңыз (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса) және оларды таңбалаңыз.
13. Қабырғаларындағы магнитті тасымалдағышты абайлап вортекстей отырып, содан соң тамыза отырып қайта суспензиялаңыз, және сұйықтықты түгелімен дайындалған 1,5 мл пробиркаларға ауыстырып құйыңыз. Пробиркалардың қақпақтарындағы және қабырғаларындағы сұйықтық тамшыларын вортексте тұндырыңыз.
14. Пробиркаларды магниттік штативке ауыстырып қойыңыз және **2 минут** инкубациялаңыз.
15. Тұнбаүстілік сұйықтық алыңыз және пробиркаларды әдеттегі штативке ауыстырып салыңыз.
16. **700 мкл жуып-шаюға арналған 5 ерітіндіні**, магнитті тасымалдағышты қайта суспензиялаңыз, және 14-15 қосалқы бөлімдерді қайталаңыз.
17. Осы сияқты, **700 мкл жуып-шаюға арналған 6 ерітіндімен** бір жуып-шаюды жүргізіңіз.
18. **Жуып-шаюға арналған 7 ерітіндінің 200 мкл** қосып, араластырыңыз, содан соң тамшыларын вортексте азғантай уақыт тұндырыңыз.
19. Пробиркаларды магниттік штативке **1 минутқа** ауыстырып қойыңыз, содан соң тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз.
20. Сорбентті құрғатып, магниттік штативте пробиркалардың қақпақтарын **10 минут** бойы ашық қалдырыңыз.
21. **50 мкл элюцияға арналған буферді** қосыңыз және вортексте араластырыңыз.
22. Пробиркаларды **60 °С** температурадағы термостатқа **5 минутқа** салып, 2 минуттан соң вортексте араластырыңыз.
23. Тамшыларын вортексте азғантай уақыт тұндырыңыз және пробиркаларды магниттік штативке ауыстырып қойыңыз. **2 минут** инкубациялаңыз. Тұнбаүстілік сұйықтықтың құрамында тазартылған РНҚ бао.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! КТ-ПТР реакциясын жүргізу үшін тазартылған РНҚ алу пробиркаларды магниттік штативтен ағытпай-ақ жүзеге асырылады.

РНҚ-сынамаларын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 30 минуттан ұзақ сақтау ұсынылмайды. Препаратты ұзақ уақыт сақтау үшін сорбентке тиіп

кетпей, тұнбаустілік сұйықтықты стерильді пробиркаға ауыстырып құю қажет және минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы, немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау керек.

Г2. 200 мкл плазма үлгісінен экстракциялау

Жұмыс тәртібі

1. **Лизистейтін ерітінді МАГНО-сорб пен жуып-шаюға арналған 5 ерітіндіні 60 °С температурада кристалдары толық ерігенге дейін қыздырыңыз.**
2. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса) дайындаңыз және оларды таңбалаңыз.
3. Стерильді 1,5 мл бір пробиркада ІБҮ АИТВ-М-FRT, А компонентін және магнеттелген силиканы бір нүктеге есептеп араластырыңыз: **10 мкл ІБҮ АИТВ-М-FRT, 10 мкл А компоненті және 20 мкл магнеттелген силика.** Есептеген кезде артығымен ескеру – бір нүктеге көбірек есептеп бөлу қажет, мысалы:

РНҚ экстракциялауға арналған үлгілер саны	АИТВ-М-FRT ІБҮ (мкл)	А компоненті (мкл)	Магнеттелген силика (мкл)
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

4. Пробиркаларға **40 мкл АИТВ-М-FRT ІБҮ, А компонентін және магнеттелген силиканың дайындалған қоспасын** енгізіңіз.
5. Пробиркаларға **900 мкл лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісін** енгізіңіз.
6. Ішінде лизистейтін ерітіндісі бар әрбір пробиркаға зерттеудегі **200 мкл плазма үлгісін** қосыңыз және вортексте араластырыңыз.
7. Әрбір панель үшін **оң бақылаулар (ОБ-1 және ОБ-2)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар дайындалған ОБҮ-1 пробиркасына **90 мкл ТБҮ және 10 мкл ОБҮ-1-АИТВ** қосыңыз, ал ішінде лизистейтін ерітіндісі бар дайындалған ОБҮ-2 пробиркасына **90 мкл ТБҮ және 10 мкл ОБҮ-2-АИТВ** қосып, вортексте араластырыңыз.
8. Әрбір панель үшін **теріс бақылау (ТБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **100 мкл ТБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз.
9. Пробираларды **10 минутқа 60 °С** температурадағы термостатқа салыңыз.
10. Пробиркалардың қақпақтары мен қабырғаларындағы сұйықтық тамшыларын вортексте тұндырып, қақпақтарын ашыңыз және пробиркаларды **2 минутқа** магниттік штативке ауыстырып салыңыз.
11. Абайлап, вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдалана отырып, пробирканың ішкі қабырғасы бойымен тұнбаустілік сұйықтық алыңыз. Пробиркаларды әдеттегі штативке ауыстырып салыңыз.
12. Пробиркаларға **700 мкл-ден жуып-шаюға арналған 5 ерітіндіні** қосыңыз.

13. Магнеттелген силиканы вортекстей отырып араластырыңыз, содан соң тамшыларын вортексте қысқа уақыт (1-3 с) центрифугалай отырып тұндырыңыз.
14. Пробиркаларды әдеттегі штативке қойып, қақпақтарын ашыңыз және магниттік штативке ауыстырып қойыңыз. 2 минут инкубациялаңыз.
15. Тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз және пробиркаларды әдеттегі штативке ауыстырып салыңыз.
16. **Жуып-шаюға арналған 5 ерітіндімен** жуып-шаюды қайталаңыз (12-15 қосалқы тармақтар).
17. Осы сияқты, **700 мкл жуып-шаюға арналған 6 ерітіндімен** бір рет жуып-шаюды жүргізіңіз.
18. **200 мкл жуып-шаюға арналған 7 ерітіндіні** қосып, араластырыңыз, содан соң тамшыларын вортексте тұндырыңыз. Пробиркаларды әдеттегі штативке қойыңыз және қақпақтарын ашыңыз.
19. Пробиркаларды **1 минутқа** магниттік штативке ауыстырып қойыңыз, содан соң тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз.
20. Сорбентті құрғатып, магниттік штативте **10 минут** бойы пробиркалардың қақпақтарын ашық қалдырыңыз.
21. **Элюцияға арналған 50 мкл буферді** қосыңыз және вортексте араластырыңыз.
22. Пробиркаларды **60 °С** температурадағы термостатқа **5 минутқа** салып, 2 минуттан соң вортексте араластырыңыз.
23. Тамшыларын азғантай уақыт вортексте тұндырыңыз және пробиркаларды магниттік штативке ауыстырып қойыңыз. 2 минут инкубациялаңыз. Тұнбаүстілік сұйықтықтың құрамында тазартылған РНҚ бар.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! КТ-ПТР реакциясын жүргізу үшін тазартылған РНҚ алу пробиркаларды магниттік штативтен ағытпай-ақ жүзеге асырылады.

РНҚ-сынамаларын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 30 минуттан ұзақ сақтау ұсынылмайды. Препаратты ұзағырақ сақтау үшін, сорбентке тиіп кетпей, тұнбаүстілік сұйықтықты стерильді пробиркаға ауыстырып құю және минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау қажет.

Г3. Нуклеин қышқылдарын автоматты станцияның көмегімен (мысалы, сұйықтықтарды дозалауға арналған Xiril (Xiril AG, Швейцария) роботтандырылған станциясының көмегімен) экстракциялау

Комплект «МАГНО-сорб» реагентер жиынтығы нуклеин қышқылдарын бөліп алуға арналған, экстракциялау үдерісінде пайдаланылатын ерітінділерден сорбентті тиімді бөліп алу үшін оны магниттеу принципін пайдаланатын ашық автоматты станциялармен үйлесімді. Бұл жағдайда, экстракциялау хаттамасын бағдарламалау автоматты станцияны өндірушінің нұсқаулығы бойынша, сатыларының біріздігіне, реактивтердің көлемдеріне және «МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығы үшін жоғарыда Г1 және Г2

қосалқы тармақтарында сипатталған инкубациялаулардың ұзақтығына сәйкес жүзеге асырылады.

Д ҚОСЫМШАСЫ. РНҚ экстракциялауға арналған, осы реагенттер жинағының құрамына кірмейтін жиынтықтарды пайдаланған кездегі (5 түрімен жұмыс жасаған кездегі) жұмыс тәртібі

Жиынтықталымының 5 түрімен жұмыс жасағанда реагенттер жинағының мәлімденген талдамалық сипаттамаларына тек, Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБФМ ұсынған реагенттер жиынтықтарының көмегімен РНҚ экстракциялау жағдайында ғана кепілдік беріледі (сондай-ақ, «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі ұсынымдарды қараңыз).

Егер «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағына қоса берілген қосымша парақта пайдаланылып отырған, нуклеин қышқылдарын бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы/автоматты станция үшін В коэффициенті көрсетілмесе, калибровкалауды өз бетінше жүргізу қажет.

Калибровкалау В коэффициентін анықтау үшін қажет және осы сериядағы жинақтың бірінші қойылымында жүргізіледі. Калибровкалау «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағының әрбір жаңа сериясы үшін бір рет жүзеге асырылады және РНҚ экстракциялау үшін пайдаланылып отырған реагенттер жиынтығында/автоматты станцияда жүргізіледі.

Калибровкалауды жүргізу үшін осы сериядағы реагенттер жинағының бірінші қойылымында қосымша 5 нүктені талдау жүргізу қажет: ОБУ-1 қосымша қайталануы, ОБУ-2 қосымша қайталануы *HIV-Q* калибратордың үш қайталануы.

***HIV-Q* калибраторды жұмысқа дайындау**

1. ***HIV-Q* калибратор** пробиркасының ішіндегісін вортексте тұндырып, қақпағын абайлап ашыңыз, және ішіндегісінің шарышауын болдырмай, **400 мкл Q еріткішін** қосыңыз.
2. Пробирканы тығыз жабыңыз және оны 20 минутқа бөлме температурасында қалдырып, жүйелі түрде вортексте араластырып отырыңыз.
3. Тоық ерігеннен кейін, қақпағындағы тамшылар кетуі үшін ***HIV-Q* калибратор** пробиркасының ішіндегісін вортексте 3-5 с бойы тұндырыңыз.

Калибровкалауды РНҚ экстракциялау үшін пайдаланылып отырған реагенттер жиынтығында жүргізу қажет. РНҚ экстракциялау емшарасы нуклеин қышқылдарын бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығына/автоматты станцияға берілген нұсқаулыққа сәйкес жүргізіледі. Бір сынамада 10 мкл көлемінде экстракциялау басталғанға дейін үлгілерге немесе лизистейтін ерітіндіге ІБҮ енгізу міндетті шарт болып табылады.

Егер 100 мкл плазмадан РНҚ экстракциялау жүргізілсе – 100 мкл-ден ерітіген *HIV-Q* калибраторын нуклеин қышқылдарын экстракциялауға арналған үш пробиркаға енгізу керек.

Егер плазманың басқа да көлемдерінен (100-1000 мкл) РНҚ экстракциялау жүргізілсе – РНҚ экстракциялау үшін дайындалған үш пробиркаға 100 мкл-ден ерітілген *HIV-Q* калибраторын енгізу және үлгінің көлемін Q еріткішімен нуклеин қышқылдарын экстракциялауда пайдаланылатын көлемге дейін

жеткізу керек (мысалы: 1 мл-ден экстракциялаған кезде – 100 мкл ерітілген *HIV-Q* калибраторы мен 900 мкл Q еріткішін енгізу керек).

РНҚ экстракциялау аяқталғаннан кейін осы нұсқаулыққа сәйкес КТ-ПТР реакциясын жүргізу керек.

ФАМ және JOE/HEX арналары бойынша *HIV-Q* калибраторының үш қайталанымы үшін алынған орташа концентрация мәндерін В коэффициентін келесі формула бойынша анықтауға арналған сандық есептеулерде пайдалану керек:

$$\text{В коэффициенті} = \frac{\text{HIV-Q калибраторындағы ІБҮ жДНҚ копий саны (ФАМ арнасы)}}{\text{HIV-Q калибраторындағы АИТВ жДНҚ копий саны (JOE/HEX арнасы)}} \times \text{С коэффициенті}$$

С коэффициенті осы сериядағы «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағына қоса берілген қосымша парақта көрсетілген.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! В коэффициентінің есептеп шығарылған мәні осы сериядағы «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағына қоса берілген қосымша парақта көрсетілген ауқымға сәйкес келуі тиіс.

В коэффициентінің есептеп шығарылған мәнін «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағының осы сериясына арналған қосымша параққа жазып алу және зерттелетін және бақылау үлгілеріндегі АИТВ РНҚ концентрациясын есептеу үшін пайдалану керек («Нәтижелерді талдау және есепке алу» бөлімін, сондай-ақ, Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарын қараңыз).

ОБҮ-1 және ОБҮ-2 үшін есептеп шығарылған мәндерді, «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағының осы сериясына арналған қосымша параққа жазып алып, ОБҮ-1 үшін орташа мәні мен ОБҮ-2 үшін орташа мәнін табу керек. ОБҮ-1 және ОБҮ-2 үшін жол берілетін мәндер ауқымын анықтаңыз: «есептеп шығарылған орташа мәнінен»/3 «есептеп шығарылған орташа мәніне дейін» x 3. Мысалы: ОБҮ-1 екі қайталануы үшін есептеп шығарылған мәндер = 500000 копий/мл және 700000 копий/мл, ал ОБҮ-1 есептеп шығарылған орташа мәні = 600000 копий/мл, ал ОБҮ-1 үшін жол берілетін мәндер ауқымы = 200000-1800000 копий/мл. ОБҮ-1 және ОБҮ-2 үшін жол берілетін мәндер ауқымының есептеп шығарылған мәндерін қосымша параққа жазып алу және «АмплиСенс® АИТВ-Монитор-FRT» реагенттер жинағының осы сериясының келесі қойылымдарын бақылау үшін пайдалану керек («Нәтижелерді талдау және интерпретациялау» бөлімін қараңыз).