

**Қазақстан Республикасы**  
**Денсаулық сақтау министрлігі**  
**Фармация комитеті**  
**Төрағасының**  
**2018 жылғы “11” мамыр**  
**№ N014940 бұйрығымен**  
**БЕКІТІЛГЕН**

**Медициналық мақсаттағы бұйымды**  
**медициналық қолдану жөніндегі**  
**нұсқаулық**

**Медициналық мақсаттағы бұйымның атауы**

Клиникалық материалдағы *Ascaris spp.* ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалы тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® Аскаридозы-FL» реагенттер жинағы

**Бұйымның құрамы мен сипаттамасы**

**Тағайындалуы**

Клиникалық материалда (нәжіс үлгілері мен қақырықта) *Ascaris spp.* ДНҚ амплификация өнімдерін гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен жүргізілетін ПТР әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® Аскаридозы-FL» реагенттер жинағы.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** ПТР-зерттеу нәтижелері аурудың кешенді диагностикасында ескеріледі.

**Әдістің принципі**

*Ascaris spp.* ДНҚ гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен жүргізілетін полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтау үш сатыдан тұрады: клиникалық материал үлгілерінен ДНҚ экстракциялау, сол организмнің ДНҚ бөлігін амплификациялау және тікелей ПТР барысында (FRT форматы) немесе ол аяқталғаннан кейін (FER форматы) жүргізілетін гибридизациялық-флуоресценттік детекциялау. Клиникалық материалдан ДНҚ экстракциялау ішкі бақылау үлгісінің (ІБҮ-FL) қатысуымен жүргізіледі, ол әр үлгі үшін зерттеу емшарасының орындалуын бақылауға мүмкіндік береді. ДНҚ сынамалары *Ascaris spp.* ДНҚ бөлігін ДНҚ осы бөлігіне спецификалық праймерлер мен Тақ-полимераза ферментінің көмегімен амплификациялау үшін пайдаланылады. Реакция қоспасының құрамында флуоресцентті-таңбалы олигонуклеотидтік зондтар болады, олар амплификацияланатын ДНҚ-нысанасының комплементарлық бөлігімен гибридизацияланады, соның нәтижесінде флуоресценция қарқындылығының үдеуі орын алады. Бұл спецификалық амплификация өнімінің жинақталуын

флуоресценттік сигнал қарқындылығын өлшеу арқылы тіркеуге мүмкіндік береді. FEP форматын пайдалана отырып флуоресценттік сигналды детекциялау флуоресценттік ПТР-детектордың көмегімен ПТР аяқталғаннан кейін, ал FRT форматы пайдаланылғанда – тікелей ПТР барысында флуоресценттік сигналды детекциялау жүйесімен амплификатордың көмегімен, «нақты уақыт» режимінде жүзеге асырылады.

### Талдамалық сипаттамалар

#### Талдамалық сезімталдық

Клиникалық материалдың түрі	ДНҚ экстракциясына арналған жиынтық	Амплификация мен детекцияға арналған жиынтық	Талдамалық сезімталдық <sup>1</sup> , ГБ/мл
Нәжіс	«РИБО-преп»	«ПТР-жиынтық» FEP/FRT-50 F нұсқасы	5x10 <sup>3</sup>
Қақырық	«РИБО-преп»	«ПТР-жиынтық» FEP/FRT-50 F нұсқасы	1x10 <sup>3</sup>

#### Талдамалық спецификалығы

Реагенттер жинағының спецификалығы келесі микроорганизмдер штамдарында тексерілді:

*Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* ГИСК 29212, *Escherichia coli* NCTC 9001, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ГИСК 11137, *Salmonella typhi* Central Public Health Laboratory (London) 5715, *Shigella flexneri* 2a ГИСК 1270, *Shigella sonnei* ГИСК 9090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptococcus sp.*, *Streptococcus oralis*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis* 27294 105, *Neisseria flavida*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* CWL 029.

Тестілеудің спецификалығы геномның детекцияланатын бөліктерін секвенациялау әдісімен расталды.

Осы панельге, сондай-ақ, адамның ДНҚ үлгілеріне тестілеу жүргізген кезде спецификалық емес реакциялар анықталған жоқ.

#### Жинақ құрамы

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FEP/FRT-50 F нұсқасына – *Ascaris spp.* ДНҚ фрагментін гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығына – мыналар кіреді:

<sup>1</sup> Клиникалық материалдың 1 мл үлгісіндегі микроорганизмнің геномдық баламаларының (ГБ) саны.

Реактив	Сипаттамасы	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Ascaris</i> / STI	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,6	1 пробирка
ПТР-қоспа-2-FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,03	1 пробирка
ДНҚ <i>Ascaris</i> / STI ОЮУ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка
ПТР-ға арналған минералды май <sup>2</sup>	Түссіз тұтқыр сұйықтық	2,0	1 пробирка

Реагенттер жинағы бақылауларды қоса, 55 амплификациялау реакциясын жүргізуге есептелген.

Реагенттер жиынтығына экстракциялау сатысының бақылау үлгілері қоса беріледі:

Реактив	Сипаттамасы	Көлемі, мл	Саны
ІБУ-FL	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,0	1 пробирка
ТБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка

### Қолданылу саласы

Клиникалық зертханалық диагностика үшін.

### Жиынтықталымы

«АмплиСенс<sup>®</sup> Аскаридозы-FL» реагенттер жинағы бір FEP/FRT форматында шығарылады

Жиынтықталым түрлері	FEP/FRT форматы
1 түрі	«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы, FEP/FRT-50 F нұсқасы
2 түрі	«АмплиСенс <sup>®</sup> Аскаридозы-FL» жинағы жиынтықтауға арналған реагенттер топталымы

Жиынтықталымның 1 түрі *Ascaris* spp. фрагменті ДНҚ «ақырғы нүкте» бойынша және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен амплификациялауды жүргізуге арналған. Толық ПТР-зерттеуін жүргізу үшін ДНҚ экстракциялауға арналған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет, Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған.

Жиынтықталымның 2 түрі тапсырыс берушінің тілінде ары қарай таңбалау және жинақтар бойынша жиынтықтау үшін, өндірістік мақсаттарға арналған.

<sup>2</sup> Реагент термостаттайтын қақпақсыз амплификаторларды (мысалы, «Терцик», «ДНК-Технология», Ресей) қолданған кезде пайдаланылады.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Жиынтықталымның 2 түрі тек Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ бекіткен регламентке сәйкес пайдаланылады.

### **Сақтық шаралары**

Жұмыс клиникалық материалда инфекциялық аурулар қоздырғыштардың бар-жоқтығына молекулалық-биологиялық (ПТР) зерттеулер жүргізетін зертханада, СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III – IV тобындағы микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздік», СЕ 2.1.7.728-99 «Емдеу-профилактика мекемелерінің қалдықтарын жинау, сақтау және жою ережелері» МУ 1.3.1888-04 санитариялық-эпидемиялық ережелерін және «Патогенділіктің III – IV топтарындағы патогендік биологиялық агенттермен инфекцияланған материалды ПТР әдісімен зерттеулер кезіндегі жұмыстарды ұйымдастыру» әдістемелік ұсынымдарын сақтай отырып жүргізілуі тиіс.

Жұмыс жасау кезінде үнемі келесі талаптарды орындау керек:

- Автоматты дозаторларға арналған сүзгілері бар ұштықтарды пайдалану керек. Әр емшара үшін жаңа ұштықты пайдаланыңыз.
- Үлгілерді инфекция туғызуы ықтимал материалдар ретінде қарастыру және «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III–IV тобындағы микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздік» СЕ 1.3.2322-08 сәйкес биологиялық кабинетте сақтау керек.
- Төгілген үлгілерді немесе реактивтерді, «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III – IV тобындағы микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздік» СЕ 1.3.2322-08 сәйкес дезинфекциялайтын заттарды пайдалана отырып жинап алу және дезинфекциялау керек.
- Үлгілер мен пайдаланылмаған реактивтерді СЕ 2.1.7.728-99 «Емдеу-профилактика мекемелерінің қалдықтарын жинау, сақтау және жою ережелері» талаптарына сәйкес жою керек.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Амплификациялау мен детекциялаудан кейінгі қалдықтарды – ішінде ПТР өнімдері бар пробиркаларды жою кезінде пробиркаларды ашуға және ішіндегісінің шашырауына жол беруге болмайды, өйткені бұл зертхана аумағының, жабдықтар мен реагенттердің амплификация өнімдерімен контаминациялануына алып келуі мүмкін.

- Жинақты қатаң түрде осы нұсқаулыққа сәйкес тағайындалуына қарай қолдану керек.
- Жинақпен жұмыс жасауға тек арнайы үйретілген маманға ғана рұқсат етілуі тиіс.
- Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін жинақты пайдалануға болмайды.

- Үлгілермен және реактивтермен жұмыс жасау кезінде бір реттік қолғаптарды, зертханалық халаттарды пайдалану, көзді қорғау керек. Жұмыс аяқталған кезде қолды мұқият жуу керек.
- Теріге, көзге және шырышты қабықтарға тиюін болдырмау керек. Тиіп кеткен жағдайда зақымданған жерді дереу сумен жуып тастау және медициналық жәрдемге жүгіну керек.
- Материалдардың қауіпсіздігі жөніндегі спецификацияны (MSDS – material safety data sheet) сұрату арқылы алдыруға болады.

#### **Қосымша материалдар мен құрал-жабдықтар**

1. ДНҚ бөліп алуға арналған – «ДНҚ-сорб-В» (ТШ 9398-003-01897593-2009), «РИБО-преп» (ТШ 9398-071-01897593-2008) немесе басқа Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жиынтықтары.
2. ДНҚ экстракциялауға арналған қосымша материалдар мен жабдықтар – ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығына берілген нұсқаулыққа сәйкес.
3. Бактериясыз ауа ортасының боксы (ПТР-бокс).
4. Центрифуга/вортекс.
5. Көлемдері әр түрлі (5-тен 20 мкл дейін, 20-дан 200 мкл дейін) автоматты дозаторлар.
6. Штативтердегі 100 мкл дейінгі сүзгісі бар бір реттік ұштықтар.
7. Көлемі 0,2 мл немесе 0,5 мл пробиркаларға арналған штативтер (пайдаланылып отырған реагенттер жиынтықтарына сәйкес).
8. Минус 16 °С-ден аспайтын мұздатқыш камерасы бар, ДНҚ сынамаларын бөліп алуға арналған, 2-ден 8 °С-ге дейінгі тоңазытқыш.
9. МУ 1.3.2569-09 бойынша жеке халат, қалпақтар, аяқ киім және бір реттік қолғаптар.
10. Ұштықтарды тастауға арналған ыдыс.

#### **«Ақырғы нүкте» бойынша детекциялау кезінде:**

11. Бағдарламаланатын амплификатор (мысалы, «Терцик» («ДНҚ-Технология», Ресей), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, АҚШ), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, АҚШ)).
12. Флуоресценттік ПТР-детектор (мысалы, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНҚ-Технология», Ресей)).
13. ПТР-ға арналған бір реттік көлемі 0,2 немесе 0,5 мл (қақпағы жалпақ, стриптелмеген) полипропилен пробиркалар:
  - а) ПТР-ға арналған, қабырғасы жұқа, көлемі 0,2 мл пробиркалар (мысалы, Ахуген, АҚШ) – көлемі 0,2 мл (Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, АҚШ), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, АҚШ) және т.б.) пробиркаларға бейімделген амплификаторлар үшін.
  - б) ПТР-ға арналған, қабырғасы жұқа, көлемі 0,5 мл пробиркалар (мысалы, Ахуген, АҚШ) – көлемі 0,5 мл пробиркаларға («Терцик» («ДНҚ-Технология», Ресей және т.б.) бейімделген амплификаторлар үшін.

### **«Нақты уақыт» режимінде детекциялау кезінде:**

14. Флуоресценттік сигналды «нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесімен бағдарламаланатын амплификатор (мысалы, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, АҚШ), Mx3000P (Stratagene, АҚШ), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) және осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған әдістемелік ұсынымдарын).
15. ПТР-ға арналған бір реттік полипропилен пробиркалар:
- а) ПТР-ға арналған, қабырғасы жұқа, көлемі 0,2 мл, дөңгелек немесе жалпақ оптикалық мөлдір қақпағы бар пробиркалар немесе көлемі 0,2 мл, стриптерде 8 данадан, мөлдір қақпақтары бар пробиркалар (мысалы, Ахуген, АҚШ) – планшеттік типтегі аспапты пайдаланғанда;
  - б) ПТР-ға арналған, қабырғасы жұқа, көлемі 0,2 мл, қақпағы жалпақ пробиркалар (мысалы, Ахуген, АҚШ) немесе Rotor-Gene ПТР-ға арналған, көлемі 0,1 мл стриптерде 4 данадан, қақпақтары бар пробиркалар (мысалы, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – роторлық типтегі аспапты пайдаланғанда.

### **Зерттелетін материалды алу, тасымалдау және сақтау**

Жұмысты бастар алдында Ресейдің тұтынушыларды қадағалау ЭОҒЗИ ФМҒУ әзірлеген «ПТР-диагностикаға арналған клиникалық материалды алу, тасымалдау, сақтау», Мәскеу, 2008 ж. әдістемелік ұсынымдарымен танысып шығу керек.

Зерттеуге арналған материал қызметін нәжіс, қақырық үлгілері атқарады.

### **Зерттелетін материалды ДНҚ экстракциялауға дайындау**

Нәжіс үлгілерін дайындау Ресейдің тұтынушыларды қадағалау ЭОҒЗИ ФМҒУ әзірлеген «ПТР-диагностикаға арналған клиникалық материалды алу, тасымалдау, сақтау», Мәскеу, 2008 ж. әдістемелік ұсынымдарына сәйкес жүргізіледі

### **ФЕР нұсқасы**

#### **ПТР-зерттеуін жүргізу**

ПТР-зерттеуі келесі сатылардан тұрады:

- Зерттелетін (клиникалық) үлгілерден ДНҚ экстракциялау (бөліп алу).
- Амплификациялауды жүргізу.
- Амплификациялау өнімдерін «ақырғы нүкте» бойынша флуоресценттік детекциялау.
- Нәтижелерді интерпретациялау.

Пайдаланылып отырған жабдыққа байланысты ПТР-зерттеуі емшарасын жүргізу жөніндегі егжей-тегжейлі ақпарат Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ әзірлеген, клиникалық материалда *Ascaris spp.*

ДНҚ гибридациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® Аскардозы-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда келтірілген.

### **Зерттелетін үлгілерден ДНҚ экстракциялау**

ДНҚ экстракциялау үшін «ДНҚ-сорб-В», «РИБО-преп» және пайдаланылып отырған жиынтыққа берілген нұсқаулыққа сәйкес Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жиынтықтары пайдаланылады.

Әрбір клиникалық үлгіден ДНҚ экстракциялау ішкі бақылау үлгісінің (ІБҮ-FL) қатысуымен жүргізіледі. Экстракцияның теріс бақылауы (Ба–) ретінде ТБҮ реагенті пайдаланылады.

### **Амплификация жүргізу**

**Амплификациялауға арналған пробиркаларды таңдап алу пайдаланылатын амплификаторға байланысты.**

**Пробиркаларға реагенттерді, ДНҚ сынамалары мен бақылау үлгілерін енгізу үшін сүзгілері бар бір реттік ұштықтар пайдаланылады.**

#### **А. Амплификациялауға арналған пробиркаларды дайындау**

**Реакция қоспасының жалпы көлемі – 25 мкл, ДНҚ сынамасының көлемін қосқанда – 10 мкл.**

Реагенттер жиынтығында реакция қоспасын 15 минут бойы 95 °С температурада қыздырған кезде белсенділенетін химиялық модификацияланған Тақ-полимеразаны (полимераза (ТақF)) пайдаланумен қамтамасыз етілетін «ыстық старт» қолданылады.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** реакция қоспасының компоненттерін тікелей талдау жүргізер алдында араластыру керек. Реагенттерді есептеу кестесіне сәйкес зерттелетін және бақылау үлгілерін тестілеуді қоса, реакциялардың қажетті санына есептеп араластыру қажет (1 кестені қараңыз). **Тіпті, зерттелетін бір ғана ДНҚ үлгісін тестілеу үшін де ПТР сатысының барлық бақылауларын (оң бақылау (Б+), теріс бақылау (Б–) және екі «Фон» пробиркасын) қою қажет екендігін ескеру керек.** Дәлірек дозалау мақсатында реагенттерді реакциялардың жұп саны үшін араластыру ұсынылады.

1. Жұмысты бастағанға дейін жинақтың минус 16 °С-ден аспайтын температурада сақталған реагенттерін жібітіңіз. Жинақтың барлық реагенттерін вортексте мұқият араластырыңыз және пробиркалардың қақпақтарындағы тамшыларды тұндырыңыз.

2. Зерттелетін, бақылауға арналған үлгілердің мөлшері мен «Фон» пробиркаларын ескере отырып, ДНҚ амплификациялауға арналған пробиркалардың қажетті мөлшерін алыңыз.
  3. Реакция қоспасын және «Фон» пробиркаларына арналған қоспаны дайындау үшін, бөлек пробиркада **ПТР-қоспа-1-FEP/FRT *Ascaris* / STI** мен **ПТР-қоспа-2-FRT** 1 кестеге сәйкес араластыру қажет. Қоспаны вортексте мұқият араластырыңыз және пробиркалардың қақпақтарындағы тамшыларды тұндырыңыз.
  4. 2 «Фон» пробиркасын дайындаңыз. Ол үшін **15 мкл-ден** дайындалған қоспаны (**полимеразасыз (TaqF)**) екі «Фон» пробиркасына енгізіп, **10 мкл ДНҚ-буфер** қосыңыз, тамыза отырып араластырыңыз. Үстінен **1 тамшыдан ПТР-ға арналған минералды май** (шамамен **25 мкл**) тамызыңыз (термостаттайтын қақпақсыз амплификаторды пайдаланғанда).
- 1 кесте

**«Ақырғы нүкте» бойынша детекциялаумен ПТР-ға арналған реакция қоспаларын дайындау кестесі**

		Көрсетілген реакциялары санына арналған реагенттердің көлемі, мкл		
Бір реакцияға арналған реагент көлемі, мкл		10,0	5,0	0,5
Клиникалық үлгілер саны	Реакциялар саны <sup>3</sup>	ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Ascaris</i> / STI	ПТР-қоспа-2-FRT	Полимераза (TaqF)
2	8	80	40	3,0
4	10	100	50	4,0
6	12	120	60	5,0
8	14	140	70	6,0
10	16	160	80	7,0
12	18	180	90	8,0
14	20	200	100	9,0
16	22	220	110	10,0
18	24	240	120	11,0
20	26	260	130	12,0
22	28	280	140	13,0
24	30	300	150	14,0
26	32	320	160	15,0
28	34	340	170	16,0

5. Реакция қоспасының қалған бөлігіне **полимеразаны (TaqF)** 1 кестеде көрсетілген мөлшерде қосыңыз. Қоспаны вортексте мұқият араластырыңыз және пробирка қақпағындағы тамшыларды тұндырыңыз.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Реакция қоспасына қосылатын полимераза ферментінің (TaqF) 1 кестеде көрсетілген мөлшері, осыған дейін екі «Фон»

<sup>3</sup> Клиникалық үлгілер саны + ДНҚ экстракциялау сатысының бақылауы + ПТР сатысының 2 бақылауы + 2 «Фон» пробиркасы + бір үлгі қоры (N+1+2+2+1, мұнда N- клиникалық үлгілердің саны).



пробиркасы үшін алынған 30 мкл реакция қоспасын ескере отырып ( «Фон» екі пробиркасын шегере отырып) келтірілген.

6. Қалған пробиркаларға **15 мкл-ден** дайын реакция қоспаларын енгізіңіз. Үстінен **1 тамшыдан ПТР арналған минералды май** (шамамен **25 мкл**) тамызыңыз (термостаттайтын қақпақсыз амплификаторды пайдаланғанда).

7. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін үлгілерден экстракциялау нәтижесінде алынған **10 мкл ДНҚ сынамаларын** енгізіңіз. Реакция қоспасының пайдаланылмаған қалдықтарын лақтырып тастаңыз.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығының көмегімен бөліп алынған сынамаларын қосқан кезде, сорбенттің реакция қоспасына түсіп кетуін болдырмау қажет.

8. Бақылау реакцияларын қойыңыз:

а) **ПТР теріс бақылауы (Б–)** – пробиркаға **10 мкл ДНҚ-буферді** енгізіңіз;

б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **10 мкл ПКО ДНҚ *Ascaris* / STI** енгізіңіз;

в) **экстракция теріс бақылауы (Ба–)** – пробиркаға ТБҮ-нен бөліп алынған **10 мкл** сынаманы енгізіңіз.

Амплификаторда қояр алдында пробиркалар қабырғаларындағы тамшыларды центрифугада/вортексте азғантай уақыт центрифугалау (1-3 с) арқылы тұндыру ұсынылады.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Сынамаларды реакция қоспасы мен ДНҚ сынамаларын және бақылауларды біріктіргеннен кейін бірден амплификациялау керек.

## Б. Амплификация жүргізу

1. Амплификаторда амплификациялау бағдарламасын іске қосыңыз (2 кестені қараңыз).

2. Ұяшықтардағы температура 95 °С-ге жеткен кезде (үзіліс режимі), пробиркаларды амплификатор ұяшықтарына салыңыз және бағдарламаны жалғастыру түймесін басыңыз.

2 кесте

### ДНҚ амплификация бағдарламасы

	Температурасы белсенді түрде реттелетін амплификаторлар (пробиркадағы ерітінді бойынша):						Температурасы матрицалық жолмен реттелетін амплификаторлар: Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research)		
	GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНҚ-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cycler (Corbett Research)			темпе- ратура	уақыт	циклдар саны
цикл	темпе- ратура	уақыт	циклдар саны	темпе- ратура	уақыт	циклдар саны			
0	95 °С	үзіліс		95 °С	Үзіліс		95 °С	үзіліс	
1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	1 мин	42
	60 °С	10 с		60 °С	25 с		60 °С	1 мин	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	1 мин	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	сақтау		10 °С	сақтау		10 °С	сақтау	

3. Бағдарламаны орындау аяқтала келе флуоресценттік детекциялауға кірісіңіз.

### Амплификация өнімдерін «ақырғы нүкте» бойынша флуоресценттік детекциялау

Детекциялау флуоресценттік ПТР-детектордың көмегімен (пайдаланылып отырған аспапқа берілген нұсқаулыққа сәйкес) екі арна бойынша флуоресценттік сигнал қарқындылығын өлшеу арқылы жүргізіледі.

3 кесте

#### Тестіленетін нысаналар мен флуоресценттік детекциялау арналарының сәйкестік кестесі

Детекциялау арнасы	ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Ascaris</i> / STI
FAM	ІБҮ-FL ДНҚ
HEX	<i>Ascaris</i> spp. ДНҚ

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Детекция жүргізілгенге дейін ПТР-детектордың бағдарламалық жасақтамасына сәйкесінше реттелімдер енгізілуі және сақталуы тиіс – реагенттер жинағына қоса берілетін қосымша бетті, сондай-ақ, Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ әзірлеген, клиникалық материалдан *Ascaris* spp. ДНҚ гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) көмегімен анықтауға арналған «АмплиСенс® Аскаридозы-FL»реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарды қараңыз.

#### Нәтижелерді интерпретациялау

Алынған нәтижелер бақылау үлгілері мен клиникалық үлгілерден бөліп алынған ДНҚ сынамалары үшін сәйкесінше арналары бойынша фонына қатысты флуоресценттік сигнал деңгейі туралы мәліметтердің негізінде интерпретацияланады. Интерпретациялау пайдаланылып отырған аспаптың бағдарламалық жасақтамасының көмегімен автоматты түрде жүргізіледі (4 кестені және реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарды қараңыз).

4 кесте

#### Клиникалық үлгілердің ПТР-зерттеуі нәтижелерін интерпретациялау

Арна бойынша сигнал		Нәтиже
FAM	HEX	
Шектік мәннен <u>жоғары</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	Сынамада <i>Ascaris</i> spp. ДНҚ <b>анықталған жоқ</b>
Шектік мәннен <u>жоғары</u> немесе <u>төмен</u>	Оң нәтиженің шектік мәнінен <u>жоғары</u>	Сынамада <i>Ascaris</i> spp. ДНҚ <b>анықталды</b>
Шектік мәннен <u>төмен</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	Нәтиже <b>дұрыс емес</b> - сынама қайтадан экстракциялау мен амплификациялауды қажет етеді

Егер сынама үшін флуоресценция деңгейінің мәні оң және теріс нәтиженің шектік мәндері арасында тұрса, ол **күмәнді** деп бағаланады және сәйкесінше зерттелетін үлгінің ПТР-зерттеуін қайталауды қажет етеді.

Егер амплификацияның оң және теріс бақылаулары және ДНҚ экстракциялаудың теріс бақылауы үшін 5 кестеге сәйкес дұрыс нәтижелер алынса, ПТР-зерттеуінің нәтижесі сенімді деп есептеледі.

5 кесте

**ПТР-зерттеуінің түрлі сатыларының бақылауларына арналған нәтижелер**

Бақылау	ПТР-зерттеуінің бақыланатын сатысы	Арна бойынша сигнал		Кейбір детекторлар бағдарламаларында нәтиженің белгіленуі
		FAM	HEX	
Ба–	ДНҚ экстракциялау	Шектік мәннен <u>жоғары</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	«–» немесе «ТБ»
Б–	ПТР	Шектік мәннен <u>төмен</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	«де»
Б+	ПТР	Шектік мәннен <u>жоғары</u>	Оң нәтиженің шектік мәнінен <u>жоғары</u>	«+» немесе «ТБ»

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!**

- Егер амплификацияның оң бақылауы (Б+) үшін HEX арнасы бойынша сигнал оң нәтиженің шектік мәнінен төмен болса, *Ascaris spp.* ДНҚ анықталмаған барлық үлгілер үшін амплификациялау мен детекциялауды қайталау қажет.
- Егер ДНҚ бөліп алудың теріс бақылауы (Ба–) және/немесе амплификацияның теріс бақылауы (Б–) үшін HEX арнасы бойынша сигнал оң нәтиженің шектік мәнінен жоғары болса, *Ascaris spp.* ДНҚ анықталған барлық үлгілер үшін ПТР-зерттеуін ДНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау қажет.

**FRT нұсқасы**

**ПТР-зерттеуін жүргізу**

ПТР-зерттеуі келесі сатылардан тұрады:

- Зерттелетін үлгілерден ДНҚ экстракциялау (бөліп алу).
- «Нақты уақыт» режимінде флуоресценттік детекциялаумен амплификациялауды жүргізу.
- Нәтижелерді талдау және интерпретациялау.

Пайдаланылып отырған жабдыққа байланысты ПТР-зерттеу емшарасын жүргізу туралы егжей-тегжейлі ақпарат Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ФБҒМ ОҒЗИ әзірлеген клиникалық материалдан *Ascaris spp.* ДНҚ гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық

тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® Аскардозы-FL». Реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда келтірілген

### **Зерттелетін үлгілерден ДНҚ экстракциялау**

ДНҚ экстракциялау үшін «ДНҚ-сорб-В», «РИБО-преп» немесе пайдаланылып отырған жиынтыққа сәйкес, Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған басқа реагенттер жиынтықтары пайдаланылады.

Әрбір клиникалық үлгіден ДНҚ экстракциялау ішкі бақылау үлгісінің (ІБҮ-FL) қатысуымен жүргізіледі. Экстракция теріс бақылауы (Ба–) ретінде ТБҮ реагенті пайдаланылады.

### **«Нақты уақыт» режимінде детекциялаумен амплификациялауды жүргізу**

Амплификацияға арналған пробиркаларды таңдап алу пайдаланылатын «нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесі бар амплификаторға байланысты.

Пробиркаларға реагенттерді, ДНҚ сынамалары мен бақылау үлгілерін енгізу үшін, сүзгілері бар бір реттік ұштықтар пайдаланылады.

#### **А. Амплификацияға арналған пробиркаларды дайындау**

Реакция қоспасының жалпы көлемі – 25 мкл, ДНҚ сынамасының көлемін қоса – 10 мкл.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Реакция қоспасының компоненттерін тікелей талдау жүргізер алдында араластыру керек. Реагенттерді зерттелетін және бақылау үлгілерін тестілеуді қоса, реакцияның қажетті санына есептеп есептеу кестесіне сәйкес араластыру қажет (6 кестені қараңыз). Тіпті зерттелетін бір ғана ДНҚ үлгісін тестілеу үшін де ПТР сатысының барлық бақылауларын (оң бақылау (Б+) және теріс бақылау (Б–)) қоюды жүргізу қажет екендігін ескеру керек. Дәлірек дозалау мақсатында, реагенттерді реакциялардың жұп саны үшін араластыру ұсынылады.

1. Жұмысты бастағанға дейін жинақтың минус 16 °С-ден аспайтын температурада сақталған реагенттерін жібітіңіз. Жинақтың барлық реагенттерін вортексте мұқият араластырыңыз және пробиркалардың қақпақтарындағы тамшыларды тұндырыңыз.
2. Зерттелетін және бақылау сынамаларының сандарын ескере отырып, ДНҚ амплификациялауға арналған пробиркалардың қажетті санын алыңыз.
3. Реакция қоспасын дайындау үшін бөлек пробиркада **ПТР-қоспа-1-FEP/FRT *Ascaris* / STI**, **ПТР-қоспа-2-FRT** мен **полимеразаны (TaqF)** 6 кестеде көрсетілген мөлшерде араластыру қажет. Қоспаны вортексте

мұқият араластырыңыз және пробиркалардың қақпақтарындағы тамшыларды тұндырыңыз.

4. Әр пробиркаға дайындалған **15 мкл** қоспаны енгізіңіз.

6 кесте

**«Нақты уақыт» режимінде детекциялаумен жүретін ПТР-ға арналған реакция қоспаларын дайындау кестесі**

		Көрсетілген реакциялар санына берілген реагенттердің көлемі, мкл		
Бір реакцияға арналған реагенттің көлемі, мкл		10,0	5,0	0,5
Клиникалық үлгілер саны	Реакциялар саны <sup>4</sup>	ПТР-қоспа-1- FEP/FRT <i>Ascaris</i> / STI	ПТР-қоспа-2- FRT	Полимераза (TaqF)
2	6	60	30	3,0
4	8	80	40	4,0
6	10	100	50	5,0
8	12	120	60	6,0
10	14	140	70	7,0
12	16	160	80	8,0
14	18	180	90	9,0
16	20	200	100	10,0
18	22	220	110	11,0
20	24	240	120	12,0
22	26	260	130	13,0
24	28	280	140	14,0
26	30	300	150	15,0
28	32	320	160	16,0

5. Ішінде реакция қоспасы бар пробиркаларға зерттелетін үлгілерден экстракциялау нәтижесінде алынған **10 мкл ДНҚ сынамаларын** енгізіңіз.

Реакция қоспасының падаланылмаған қалдықтарын лақтырып тастаңыз.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығының көмегімен бөліп алынған ДНҚ сынамаларын қосқан кезде, сорбенттің ПТР-ға арналған реакция қоспасына түсін кетуін болдырмау қажет.

6. Бақылау реакцияларын қойыңыз:

- а) ПТР теріс бақылауы (Б-) – пробиркаға **10 мкл ДНҚ-буфер** енгізіңіз;
- б) ПТР оң бақылауы (Б+) – пробиркаға **10 мкл *Ascaris* ДНҚ ОБУ / STI** енгізіңіз;
- в) экстракцияның теріс бақылауы (Ба-) – пробиркаға ТБҮ бөліп алынған **10 мкл** сынаманы енгізіңіз.

**Б. «Нақты уақыт» режимінде детекциялаумен амплификация жүргізу**

1. Аспапты («нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесімен амплификатор) флуоресценттік сигналды сәйкесінше амплификациялау және детекциялау бағдарламасына келтіріңіз (7 кестені қараңыз).

<sup>4</sup> Клиникалық үлгілер саны + ДНҚ экстракциялау сатысының бақылауы + ПТР сатысының 2 бақылауы + бір үлгі қоры (N+1+2+1, мұнда N- клиникалық үлгілердің саны).

## Роторлық типті<sup>5</sup> және планшеттік типті<sup>6</sup> аспаптар үшін амплификация бағдарламасы

Цикл	Температура, °С	Уақыт	Циклдар саны
1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45
	60	25 с флуоресц. сигналды детекциялау	
	72	10 с	

Флуоресценттік сигналды детекциялау флуорофорларға арналған FAM және JOE арналары бойынша (бірнеше тестіні бір мезгілде жүргізген кезде басқа да пайдаланылатын арналар бойынша детекциялау қолданылады) қолданылады.

2. Пробиркаларды аспаптың реакция модулінің ұяшықтарына орнатыңыз.
3. Флуоресценттік сигналды детекциялаумен амплификациялау бағдарламасын орындауды іске қосу керек.
4. Бағдарламаны орындау аяқтала келе нәтижелерді талдау мен интерпретациялауға кірісу керек.

### Нәтижелерді талдау және интерпретациялау

Нәтижелерді талдау «нақты уақыт» режимінде детекциялаумен ПТР жүргізу үшін пайдаланылатын бағдарламалық жасақтаманың көмегімен жүргізіледі. Флуоресценттік сигнал жинақталуының қисықтары екі арна бойынша талданады:

- флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша IBY-FL ДНҚ амплификациялау өнімінің жинақталғандығын білдіретін сигнал тіркеледі,
- флуорофорға арналған JOE арнасы бойынша *Ascaris* spp. ДНҚ фрагментін амплификациялау өнімінің жинақталғандығын білдіретін сигнал тіркеледі.

Нәтижелер флуоресценция қисығының сәйкесінше деңгейде белгіленген шектік сызықпен қиылысуы болуының (немесе болмауының) негізінде интерпретацияланады, бұл осы ДНҚ сынамасы үшін нәтижелер кестесіндегі сәйкесінше бағанда шектік циклдың *Ct* болуын (немесе болмауын) білдіреді.

Нәтижелер 8 кестеге және «АмплиСенс® Аскаридозы-FL» реагенттер жинағына қоса берілетін қосымша бетке сәйкес интерпретацияланады

8 кесте

### Клиникалық үлгілерді ПТР-зерттеуі нәтижелерін интерпретациялау

Шектік цикл мәні, <i>Ct</i>		Нәтиже
FAM/Green арнасы	JOE/Yellow/HEX арнасы	

<sup>5</sup> Мысалы, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q және осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған әдістемелік ұсынымдарда.

<sup>6</sup> Мысалы, iCycler, iQ5, Mx3000P, «ДТ-96» осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған әдістемелік ұсынымдарда.

Шектің мәннен <u>аз</u> мән анықталды	Мәні жоқ немесе шектік мәннен <u>көп</u>	Сынамада <i>Ascaris</i> spp. ДНҚ <b>анықталған жоқ</b>
Шектің мәннен <u>көп</u> немесе <u>аз</u> мән анықталды	Шектің мәннен <u>аз</u> мән анықталды	Сынамада <i>Ascaris</i> spp. ДНҚ <b>анықталды</b>
Мәні жоқ немесе шектік мәннен <u>көп</u>	Мәні жоқ немесе шектік мәннен <u>көп</u>	Нәтиже <b>дұрыс емес</b> – сынаманы қайтадан экстракциялау және амплификациялау қажет

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** *Ct* шектік мәндері реагенттер жинағына қоса берілетін қосымша бетте көрсетілген.

Егер амплификацияның оң және теріс бақылаулары үшін және ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы үшін дұрыс нәтижелер алынса, бақылау реакцияларының нәтижелерін бағалау кестесіне сәйкес, ПТР-зерттеудің нәтижесі сенімді болып есептеледі (9 кесте).

9 кесте

### ПТР-зерттеуінің түрлі сатылары бақылауларының нәтижелері

Бақылау	ПТР-зерттеуінің бақыланатын сатысы	Шектік цикл мәні, <i>Ct</i>	
		FAM/Green арнасы	JOE/Yellow/HEX арнасы
Ба–	ДНҚ экстракциялау	Шектің мәннен <u>аз</u> мән анықталды	Мәні жоқ немесе шектік мәннен <u>көп</u>
Б–	ПТР	Мәні жоқ немесе шектік мәннен <u>көп</u>	Мәні жоқ немесе шектік мәннен <u>көп</u>
Б+	ПТР	Шектің мәннен <u>аз</u> мән анықталды	Шектің мәннен <u>аз</u> мән анықталды

### НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!

- Егер ПТР оң бақылауы (Б+) үшін флуорофорға арналған JOE арнасы бойынша шектік цикл мәні *Ct* болмаса немесе шектік мәннен көп болса, *Ascaris* spp. ДНҚ анықталмаған барлық үлгілер үшін амплификациялау мен детекциялауды қайталау қажет.
- Егер ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы (Ба–) және/немесе ПТР теріс бақылауы (Б–) үшін флуорофорға арналған JOE арнасы бойынша шектік цикл мәні *Ct* шектік мәннен аз болса, *Ascaris* spp. ДНҚ анықталған барлық үлгілер үшін ПТР-зерттеуді ДНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау қажет.

### Қысқарту тізімі

Осы нұсқаулықта келесі қысқартулар мен белгілер қолданылады:

Ба–	- Теріс экстракция бақылауы
ІБҮ-FL	- Ішкі бақылау үлгісі
Б+	- ПТР оң бақылауы
Б–	- ПТР теріс бақылауы

ТБҮ	- Теріс бақылау үлгісі
ОБҮ	- Оң бақылау үлгісі
ПТР	- Полимеразалық тізбекті реакция
Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ	- Тұтынушылардың құқықтары мен адамның әл-ауқатын қорғау саласындағы Федералдық қадағалау қызметі «Эпидемиология Орталық ғылыми-зерттеу институты» Федералдық бюджеттік ғылыми мекемесі
FEP	- «Ақырғы нүкте» бойынша флуоресцентті детекция
FRT	- «Нақты уақыт» режиміндегі флуоресцентті детекция

### Сақтау шарттары

Реагенттер жинағын 2-ден 8°C-ге дейінгі температурада сақтау керек. ПТР-қоспа-1-FEP/FRT Ascaris / STI, ПТР-қоспа-2-FRT мен полимеразаны (TaqF) минус 16 °C-ден аспайтын температурада сақтау керек. ПТР-қоспа-1-FEP/FRT Ascaris / STI жарықтан қорғалған жерде сақтау керек.

### Тасымалдау

Реагенттер жинағын 2-ден 8°C-ге дейінгі температурада 5 тәуліктен асырмай тасымалдау керек. «ПТР-жиынтығының» FEP/FRT-50 F нұсқасын алған кезде көрсетілген сақтау температураларына сәйкес бөлшектеп жиынтықтау керек.

### Босатылу шарттары





Емдеу-профилактикалық және санитариялық-профилактикалық мекемелер үшін.

### Жарамдылық мерзімі







9 ай.

Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін қолдануға болмайды.

### Баспа өнімінде пайдаланылатын символдар

	Каталогтағы нөмірі		Сақ болыңыз! Ілеспе құжаттаманы қараңыз
	Партия коды		Тестілеудің ең көп саны



	Бұйым in vitro диагностикаға арналған		.... дейін пайдалану керек
	Өзгертілген күні		Пайдалану жөніндегі нұсқаулықты қараңыз
	Температура шектелімі		Күн сәулесінің түсуіне жол бермеңіз
	Өндіруші		Дайындалған күні

### **Осыған сәйкес медициналық мақсаттағы бұйым өндірілген нормативтік құжат**

Клиникалық материалдағы *Ascaris spp.* ДНК гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен жүргізілетін полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® Аскардозы-FL» реагенттер жинағы

Техникалық шарттар ТШ 9398-197-01897593-2012.

### **Өндіруші**

Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ (Ресей Федерациясы, 111123, Мәскеу қ., Новогиреевск к-сі, 3а үй, тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: [obtk@pcr.ru](mailto:obtk@pcr.ru))

Реагенттер жинағының сапасына наразылықтарды айындаушы кәсіпорын Ресейдің тұтынушыларды қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ (111123, Мәскеу қ., Новогиреевск к-сі, 3а үй) наразылықтармен жұмыс жасау және оқытуды ұйымдастыру бөліміне жолдаңыздар (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: [products@pcr.ru](mailto:products@pcr.ru)).

«АмплиСенс» өнімдері туралы пікірлер мен ұсыныстарды [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru) сайтында сауалнама толтыру арқылы қалдыруға болады.

### **Қазақстан Республикасы аумағында тұтынушылардан медициналық мақсаттағы бұйымның сапасы жөніндегі шағымдарды қабылдайтын ұйымның мекенжайы**

«КБ Диагностик» ЖШС Алматы обл., Іле ауданы, Боралдай кенті, (Әуежай), тел./факс 8 (727) 331-31-47

E-mail [info@kb-diagnostic.kz](mailto:info@kb-diagnostic.kz)