

Қазақстан Республикасы
Денсаулық сақтау министрлігі
Фармация комитеті Төрағасының
2018 жылғы “11” мамыр
№ N014935 бұйрығымен
БЕКІТІЛГЕН

Медициналық мақсаттағы бұйымды
медицинада қолдану жөніндегі нұсқаулық

Медициналық мақсаттағы бұйымның атауы

Клиникалық материалдағы Ureaplasma (U.parvum және U.urealyticum) текті микроорганизмдер ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалы тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® Ureaplasma spp.-FL» реагенттер жинағы

Бұйымның құрамы мен сипаттамасы

Тағайындалуы

«АмплиСенс® Ureaplasma spp.-FL» реагенттер жинағы амплификация өнімдерінің гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен ПТР әдісімен берілген микроорганизм ДНҚ спецификалық фрагментін амплификациялау жолымен Ureaplasma (U.parvum және U.urealyticum) текті микроорганизмдер ДНҚ анықтауға арналған. ПТР жүргізуге арналған материал ретінде урогенитальді жолдың шырышты қабаттарының қырынды бөлінділерінен, несеп үлгілерінен, адамның қуық асты безінің сөлінісінен ДНҚ экстракциялау жолымен алынған ДНҚ сынамалары пайдаланылады. ДНҚ бөліп алу үшін Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жинақтары пайдаланылады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! ПТР-зерттеулер нәтижелері ауруды кешенді диагностикалауда пайдаланылады.

Әдістің принципі

Гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен Ureaplasma (U.parvum және U.urealyticum) текті микроорганизмдерді анықтау үш сатыны: клиникалық материалдар үлгілерінен ДНҚ экстракциялауды (бөліп алуды), берілген микроорганизмнің ДНҚ фрагментін амплификациялау мен тікелей ПТР жүргізу барысында (FRT нұсқасы) немесе оны аяқтағаннан кейін (FER нұсқасы) жүргізілетін гибридизациялық-флуоресценттік детекциялауды қамтиды.

Клиникалық материалдан ДНҚ экстракциялау әрбір үлгіге арналған зерттеу ісшарасының орындалуын бақылауға мүмкіндік беретін ішкі бақылау үлгісінің (ІБҮ-FL) қатыстырылуымен жүргізіледі. Бұдан кейін ДНҚ алынған сынамаларымен оған спецификалы праймерлер мен Тақ-полимераза ферменті көмегімен U.parvum және U.urealyticum ДНҚ фрагментін амплификациялау

реакциясы жүргізіледі. Реакциялық қоспаның құрамында флуоресцентті-таңбаланған олигонуклеотидті зондтар болады, бұлар амплификацияланатын ДНҚ-нысананың комплементарлы учаскесімен гибридизацияланады, осының нәтижесінде флуоресценцияның қарқыны арта түседі. Бұл флуоресцентті сигналдың қарқындылығын өлшеу жолымен амплификацияның спецификалық өнімінің жинақталуын тіркеуге мүмкіндік береді. FEP нұсқасын пайдалану кезіндегі флуоресцентті сигналдың детекциясы ПТР аяқталғаннан кейін флуоресцентті ПТР-детектордың, ал FRT нұсқасын пайдаланғанда - тікелей ПТР барысында флуоресцентті сигналды «нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесі бар амплификатордың көмегімен жүзеге асырылады.

Талдамалық сипаттамалар

Талдамалық сезімталдық

Клиникалық материалдың түрі	Тасымалдау ортасы	ДНҚ экстракциялауға арналған жинақ	Амплификация мен детекцияға арналған жиынтық	Талдамалық сезімталдық
Урогенитальді жолдың шырышты қабаттарының қырынды бөлінділері	«Жағындыларға арналған тасымалдау ортасы» немесе «Муколитигі бар тасымалдау ортасы (МТО)»	«ДНҚ-сорб-АМ»	«ПТР-жиынтық» FEP және FRT нұсқалары	1×10^3 ГЭ/мл ¹
Несеп ²	—	«ДНҚ-сорб-АМ»	«ПТР-жиынтық» FEP және FRT нұсқалары	2×10^3 ГЭ/мл

Талдамалық ерекшелігі

Адам ДНҚ үлгілері мен келесі микроорганизмдер: *Gardnerella vaginalis*; *Lactobacillus* spp.; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus agalactiae*; *Mycoplasma hominis*; *Mycoplasma genitalium*; *Candida albicans*; *Neisseria flava*; *Neisseria subflava*; *Neisseria sicca*; *Neisseria mucosa*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Chlamydia trachomatis*; *Trichomonas vaginalis*; *Treponema pallidum*; *Toxoplasma gondii*; 1 және 2 типті HSV; CMV; HPV ДНҚ үлгілерінің панелін тестілеу кезінде спецификалық емес реакциялар болмаған.

¹Көрсетілген тасымалдау ортасына орналастырылған, клиникалық материалдың 1 мл үлгісіндегі микроорганизмнің гендік эквивалентінің (ГЭ) саны.

² Несеп үлгілерін алдын ала өңдеу талап етіледі.

Жинақ құрамы

FER НҰСҚАСЫ

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FER нұсқасы – «соңғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар ДНҚ *Ureaplasma spp.* амплификациялық фрагментіне арналған реагенттер жиынтығында мыналар бар:

Реактив	Сипаты	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FL <i>Ureaplasma spp.</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,01	Көлемі 0,5 немесе 0,2 мл 110 пробирка
ПТР-қоспа-2-FL-red	Қызыл түсті мөлдір сұйықтық	1,1	1 пробирка
ПТР-қоспа -Фон-red ³	Қызыл түсті мөлдір сұйықтық	0,6	1 пробирка
ПТР ⁴ арналған минералды майлар	Түссіз тұтқыр сұйықтық	4,0	1 құты
ОБУ кешенді	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген.

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FER-1000 нұсқасы – «соңғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен *Ureaplasma spp.* ДНҚ фрагментін амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығында мыналар бар:

Реактив	Сипаты	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FL <i>Ureaplasma spp.</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,01	Көлемі 0,5 мл 1100 пробирка
ПТР -қоспа-2-FL-red	Қызыл түсті мөлдір сұйықтық	5,5	2 құты
ПТР-қоспа-Фон-red	Қызыл түсті мөлдір сұйықтық	2,5	1 құты
ПТР арналған минералды май	Түссіз тұтқыр сұйықтық	40	1 құты
ОБУ кешенді	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,0	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 1100 реакциясын жүргізуге есептелген.

FRT НҰСҚАСЫ

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT нұсқасы – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар *Ureaplasma spp.* ДНҚ фрагментін амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығында мыналар бар:

³ Реагент «ДНҚ-сорб-АМ» немесе «ДНҚ-сорб-В» жинақтарының көмегімен бөлініп алынған ДНҚ сынамаларын зерттеген кезде пайдаланылады.

⁴ Реагент термостаттайтын қақпақсыз амплификаторларды қолданған кезде пайдаланылады (мысалы, «Терцик», «ДНҚ-Технология», Ресей).

Реактив	Сипаты	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FL Ureaplasma spp.	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,01	Көлемі 0,2 мл 110 пробирка
ПТР-қоспа-2-FL-red	Қызыл түсті мөлдір сұйықтық	1,1	1 пробирка
ОБУ кешенді	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген.

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT-100 F нұсқасы – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар *Ureaplasma spp.* ДНҚ фрагментін амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

Реактив	Сипаты	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FL Ureaplasma spp.	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка
ПТР-қоспа-2-FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	2 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,03	2 пробирка
ОБУ кешенді	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT-1000 F нұсқасы – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар *Ureaplasma spp.* ДНҚ фрагментін амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

Реактив	Сипаты	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FL Ureaplasma spp.	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	10 пробирка
ПТР-қоспа-2-FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	5 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,12	5 пробирка
ОБУ кешенді	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,0	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 1100 реакциясын жүргізуге есептелген.

Қолданылу саласы

Клиникалық зертханалық диагностика.

Жиынтықталымы

«АмплиСенс® Ureaplasma spp.-FL» реагенттер жинағы FER және FRT екі нұсқасында, жиынтықталымның келесі формасында шығарылады:

Жиынтықталым түрі	FER формат	FRT формат
1 түрі	«ПТР-жиынтық» FER нұсқадағы (0,5 мл пробиркалар) реагенттер жиынтығы.	«ПТР-жиынтық» FRT нұсқадағы реагенттер жиынтығы
2 түрі	«ПТР-жиынтық» FER нұсқадағы (0,2 мл пробиркалар) реагенттер жиынтығы.	«ПТР-жиынтық» FRT-100F нұсқадағы реагенттер жиынтығы.
3 түрі	«ПТР-жиынтық» FER-1000 нұсқадағы (0,5 мл пробиркалар) реагенттер жиынтығы.	«ПТР-жиынтық» FRT-1000F нұсқадағы реагенттер жиынтығы.

FER нұсқасы

Жиынтықтаудың 1, 2 және 3 түрлері «соңғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен Ureaplasma spp. ДНҚ амплификациясын жүргізуге арналған. Толық ПТР-зерттеу жүргізу үшін Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған ДНҚ экстракциялауға арналған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет.

FRT нұсқасы

Жиынтықтаудың 1, 2 және 3 түрлері «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен Ureaplasma spp. ДНҚ ПТР-амплификациясын жүргізуге арналған. Толық ПТР-зерттеу жүргізу үшін Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған ДНҚ экстракциялауға арналған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет.

Сақтық шаралары

Жұмыс клиникалық материалда инфекциялық аурулар қоздырғыштарының бар екендігін анықтайтын молекулалық-биологиялық (ПТР) зерттеулерді орындайтын зертханада СЕ 1.3.2322-08 «Патогендігі (қауіптілігі) III–IV топтағы микроорганиздермен және паразитарлық аурулар қоздырғыштарымен жұмыс істеу қауіпсіздігі», СЕ 2.1.7.728-99 «Емдеу-профилактикалық мекемелерінің қалдықтарын жинау, сақтау және жою ережелері» санитарлық-эпидемиялық ережелері және ӘН 1.3.1888-04 «Патогендігі III–IV топтағы патогенді биологиялық агенттер инфекциясын жұқтырған материалды ПТР әдісімен зерттеу кезінде жұмысты ұйымдастыру» әдістемелік нұсқаулары талаптары сақтала отырып жүргізілуі тиіс.

Жұмыс істеу кезінде әрқашан келесі талаптарды орындау керек:

- Автоматты дозаторларға арналған сүзгісі бар ұштықтарды пайдалану, әрбір емшара үшін жаңа ұштықты пайдалану;
- Үлгілерді инфекция туғызатын зат ретінде қарастыру және биологиялық кабинетте СЕ 1.3.2322-08 «Патогендігі (қауіптілігі) III–IV топтағы микроорганиздермен және паразитарлық аурулар қоздырғыштарымен жұмыс істеу қауіпсіздігі» ережесіне сәйкес сақтау;
- Төгілген үлгілер мен реактивтерді дезинфекциялайтын заттарды

пайдалана отырып, СЕ 1.3.2322-08 «Патогендігі (қауіптілігі) III–IV топтағы микроорганиздермен және паразитарлық аурулар қоздырғыштарымен жұмыс істеу қауіпсіздігі» ережесіне сәйкес жинап алу және дезинфекциялау;

- Үлгілер мен пайдаланылмаған реактивтерді СЕ 2.1.7.728-99 «Емдеу-профилактикалық мекемелерінің қалдықтарын жинау, сақтау және жою ережелеріне» сәйкес жою керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Амплификациялау мен детекциялаудан кейін қалдықтарды – ішінде ПТР өнімдері бар пробиркаларды жою кезінде пробиркаларды ашуға және ішіндегісін төгуге жол берілмейді, өйткені бұл зертхана аумағының, жабдықтар мен реагенттердің амплификация өнімдерімен ластануын туындатады.

- Жинақты осы нұсқаулыққа сәйкес қатаң түрде тағайындалуы бойынша қолдану керек.
- Жинақпен жұмыс істеуге тек арнайы оқытылған қызметкерлер жіберіледі.
- Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін жинақты пайдалануға болмайды.
- Бір реттік қолғаптарды, зертханалық халаттарды пайдалану, үлгілермен және реактивтермен жұмыс кезінде көзді қорғау керек. Жұмыс аяқталған соң қолды мұқият жуу керек.
- Терімен, көзбен және шырышты қабатпен жанасудан аулақ болыңыз. Жанасу болғанда зақымданған жерді дереу сумен жуу және медициналық жәрдем алу керек.
- Материалдардың қауіпсіздігі жөніндегі спецификация (MSDS – material safety data sheet) сұраныс бойынша қол жетімді.
- Зертханада тамақ жеуге, су ішуге, шылым шегуге, косметиканы пайдалануға, жанаспалы линзаларды шешуге немесе киюге болмайды.

Қосымша материалдар мен құрал-жабдықтар

1. Тасымалдау ортасы - «Муколитигі бар тасымалдау ортасы (TCM)» (ТШ 9398-098-01897593-2009) немесе «Жағындыларға арналған тасымалдау ортасы» (ТШ 9398-088-01897593-2009), немесе Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған басқа – 1–3 жиынтықталым түрлерімен жұмыс істегенде (FER нұсқасы және FRT нұсқасы).
2. ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы - «ДНҚ-сорб-АМ» (ТШ 9398-036-01897593-2009) немесе Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған басқа – 1–3 жиынтықталым түрлерімен жұмыс істегенде (FER нұсқасы және FRT нұсқасы).
3. ДНҚ экстракциясына арналған қосымша материалдар мен құрал-жабдықтар - ДНҚ экстракциясына арналған реагенттер жиынтығы нұсқаулығына сәйкес.
4. Бактериясыз ауа ортасының боксы (ПТР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Ауыспалы көлемнің автоматты дозаторы (5-тен 20 мкл-ге дейін, «ПТР-жиынтық» FRT-100 F нұсқасы жұмысында – 5-тен 20 мкл-ге дейін және 20-дан 200 мкл-ге дейін).
7. Бір реттік ұштықтар 100 мкл дейінгі сүзгісімен штативтерде.

8. Көлемі 0,2 мл немесе 0,5 мл микропробиркаларға арналған штативтер (реагенттердің пайдаланылатын жиынтықтарына сәйкес).
9. Тоңазытқыш 2-ден 8 °С-ге дейін, минус 16 °С-ден аспайтын мұздатқыш камерасымен ДНҚ бөлініп алынған сынамаларына арналған.
10. Жеке халат, қалпақтар, аяқ киімдер және бір реттік қолғаптар МУ 1.3.1888-04 бойынша.
11. Ұштықтарды тастауға арналған ыдыс.

«ПТР-жиынтық» FER нұсқасымен жұмыс істеу кезінде

12. Бағдарланатын амплификатор (мысалы, «Терцик» («ДНҚ-Технология», Ресей), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research», Австралия), «МахуGene» («Ахуген», АҚШ), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems») немесе соған ұқсастар).
13. Флуоресцентті ПТР-детектор (мысалы, «ALA-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНҚ-Технология», Ресей) немесе соған ұқсастар).
14. Минералды майларға арналған пластик пипеткалар («ПТР-жиынтығы» FER-1000 нұсқасымен жұмыс істеу кезінде).

«ПТР-жиынтық» FRT нұсқасымен жұмыс істеу кезінде

15. Бағдарланатын амплификатор «нақты уақыт» режиміндегі флуоресцентті сигналдың детекциялар жүйесімен (мысалы, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия), «iCycler iQ5» («Bio-Rad», АҚШ), «Mx3000P» («Stratagene», АҚШ), «ДТ-96» («ДНҚ-Технология», Ресей) немесе соған ұқсастар).
16. ПТР арналған көлемі 0,2 мл немесе 0,1 мл бір реттік полипропиленді микропробиркалар – «ПТР-жиынтық» FRT-100 F нұсқасымен жұмыс істеу кезінде:
 - а) ПТР арналған көлемі 0,2 мл қақпағы дөңес қабырғасы жұқа пробиркалар (мысалы, «Ахуген», АҚШ) – планшет типіндегі аспапты пайдаланған кезде;
 - б) ПТР арналған көлемі 0,2 мл қақпағы жалпақ қабырғасы жұқа пробиркалар (мысалы, «Ахуген», АҚШ), немесе «Rotor-Gene» ПТР арналған пробиркалар, көлемі 0,1 мл стриптерде 4 данадан қақпақтарымен (мысалы, «Corbett Research», Австралия; «Qiagen», Германия) – ротор типіндегі аспапты пайдаланған кезде.

Зерттелетін материалды алу, тасымалдау және сақтау

Жұмыс бастар алдында Мәскеу, 2008 ж. Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ әзірлеген «ПТР-диагностикасы үшін клиникалық материалды алу, тасымалдау және сақтау» әдістемелік нұсқауымен танысу керек.

Зерттеуге арналған материалдарға мыналар кіреді: урогенитальді тракттың шырышты қабаттарынан, тік ішектің, ауыз жұтқыншақтың, көздің бөлінетін конъюнктивасынан алынған қырынды бөліндісі, адамның несеп үлгілері (таңертеңгі несептің алғашқы порциясының шөгіндісі), қуық асты безі сөлінісі.

ФЕР нұсқасы

ПТР-зерттеу жүргізу

ПТР-зерттеу келесі сатылардан тұрады:

- Зерттелетін (клиникалық) үлгілерден ДНҚ экстракциялау (бөліп алу);
- Амплификация жүргізу.
- «Соңғы нүкте» бойынша амплификация өнімдерін флуоресцентті детекциялау.
- Нәтижелерді интерпретациялау.

ПТР-зерттеу жүргізу ісшарасы жөніндегі егжей-тегжейлі ақпарат пайдаланылатын жабдыққа байланысты, Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ «Гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы ПТР әдісімен ЖЖБИ (жыныс жолымен берілетін инфекция) және басқа да репродукциялық мүшелер инфекциялары қоздырғыштарының ДНҚ болуына клиникалық материалды зерттеу» әдістемелік ұсыныстарында берілген.

Зерттелетін үлгілерден ДНҚ экстракциялау.

ДНҚ экстракциялау (бөліп алу) үшін пайдаланылатын жиынтыққа арналған нұсқаулыққа сәйкес Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жиынтығы пайдаланылады. Әрбір зерттелетін үлгіден ДНҚ экстракциялау ішкі бақылау үлгісі (ІБҮ-FL) қатыстырыла отырып жүргізіледі.

ДНҚ экстракциялау үшін жинақтың 4-7 шығарылу түрлерін пайдаланғанда жинаққа енетін «ДНҚ-сорб-АМ» реагенттер жиынтығы пайдаланылады.

Амплификация жүргізу

ДНҚ сынамасының 10 мкл көлемін қоса реакциялық қоспаның жалпы көлемі – 30 мкл.

А. Амплификация жүргізу үшін пробиркаларды дайындау

Амплификация үшін пробиркаларды таңдау пайдаланылатын амплификаторға байланысты болады.

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

1. Зерттелетін және бақылау сынамаларының ДНҚ амплификациялау үшін *Ureaplasma spp.* ПТР-қоспа-1-FL бар пробиркалардың қажетті санын алып қою керек.
2. *Ureaplasma spp.* ПТР-қоспа-1-FL бар пробиркаларға қатып қалған балауыз бетіне **10 мкл ПТР-қоспа-2-FL-red** енгізу керек, бұл орайда ол балауыз астына түсіп кетпеуі және *Ureaplasma spp.* ПТР-қоспа-1-FL-мен араласпауы тиіс.
3. Жоғары жағынан (термостатталатын қақпақсыз амплификаторды пайдаланғанда) ПТР-ға арналған минерал майы тамшысын қосу керек.
4. «Фон» үлгісін дайындаңыз. Ол үшін *Ureaplasma spp.* ПТР-қоспа-1-FL бар пробиркаға қатып қалған балауыз бетіне **20 мкл ПТР-қоспа-Фон-red** енгізу керек. Жоғары жағынан (термостатталатын қақпақсыз

амплификаторды пайдаланғанда) ПТР-ға арналған минерал майы тамшысын қосу керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! ПТР-қоспа-Фон-red реагенті «ДНҚ-сорб-АМ» немесе «ДНҚ-сорб-В» жинақтарының көмегімен бөліп алған ДНҚ сынамаларын зерттегенде пайдаланылады. ДНҚ экстракциялау үшін Ресейтұтынуқадағалау ЭОҒЗИ ФБҒМ ұсынған басқа реагенттер жинағын пайдаланғанда, пайдаланылатын жинаққа арналған нұсқаулықты ұстану қажет.

5. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін немесе бақылау үлгілерінен экстракциялау жолымен алынған **ДНҚ сынамаларын 10 мкл-ден** енгізу керек.
6. Бақылау реакцияларын қою керек:
 - а) **ПТР теріс бақылауы (Б-)** – пробиркаға **10 мкл ДНҚ-буфер** енгізу керек.
 - б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **10 мкл кешенді ОБУ** енгізу керек.
 - в) **ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы (Ба-)** – пробиркаға ТБҮ-нен бөлініп алынған **10 мкл** сынаманы енгізу керек.

Амплификаторға қоюдың алдында центрифугада/вортексте қысқа уақыт (1-3 сек) центрифугалау арқылы пробирка қабырғасындағы тамшыларды шөктіру ұсынылады.

Б. Амплификацияны жүргізу

1. Амплификаторда термоциклдеудің тиісті «АмплиСенс-1-FER» бағдарламасын іске қосу керек (1 кестені қараңыз).
2. Ұяшықтардағы температурада 95 °С-ге (үзіліс режиміне) жеткенде пробиркаларды амплификатор ұяшықтарына қою және бағдарламаны жалғастыру түймесін басу керек.

1 кесте

«АмплиСенс-1-FER» бағдарламасы

Цикл	«Терцик»			«GeneAmp PCR System 2700»			«Gradient Palm Cycler», «MAXYGENE»		
	Температура, °С	Уақыты	Циклдары	Температура, °С	Уақыты	Циклдары	Температура, °С	Уақыты	Циклдары
0	95	Үзіліс		95	Үзіліс		95	Үзіліс	
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Сақтау		10	Сақтау		10	Сақтау	

Ескерту - Амплификаторлардың басқа модельдеріне арналған термоциклдеу бағдарламалары «Гибридизациялық-флуоресцентті детекциясымен ПТР әдісімен ЖЖБИ және басқа да репродукциялық мүшелер инфекциялары қоздырғыштарының ДНҚ болуына клиникалық материалды зерттеу» әдістемелік ұсыныстарында жазылған.

3. Бағдарламаны орындау аяқталысымен флуоресцентті детекциялауға кірісу керек.

Амплификация өнімдерін флуоресцентті детекциялау

Детекция флуоресцентті сигналдың қарқындылығын екі арна бойынша флуоресцентті ПТР-детектордың көмегімен (пайдаланатын аспап нұсқаулыққа сәйкес) өлшеу жолымен төмендегіше жүргізіледі:

- FAM (немесе аспаптың моделіне байланысты осыған ұқсасының) арнасы бойынша *Ureaplasma spp.* ДНҚ фрагменті амплификациясы өнімінің жинақталуы туралы сигнал тіркеледі.
- HEX (немесе аспаптың моделіне байланысты осыған ұқсасының) арнасы бойынша ІБҮ ДНҚ амплификациясы өнімінің жинақталуы туралы сигнал тіркеледі.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Детекциялауды өткізгенге дейін ПТР-детектордың бағдарламалық қамтамасыз етілуіне тиісті реттеулер енгізілуі және сақталуы тиіс – ПТР-жиынтыққа қосымша бет-парақты, сондай-ақ Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ «Гибридизациялық-флуоресцентті детекциясымен ПТР әдісімен ЖЖБИ және басқа да репродукциялық мүшелер инфекциялары қоздырғыштарының ДНҚ болуына клиникалық материалды зерттеу» әдістемелік ұсыныстарын қараңыз.

Нәтижелерді интерпретациялау

Алынған нәтижелерді бақылау үлгілері мен клиникалық үлгілерден экстракциялау жолымен алынған ДНҚ сынамаларына арналған тиісті арналар жөніндегі фонға қатысты флуоресцентті сигналдың деңгейі жөніндегі деректер негізінде интерпретациялайды. Интерпретациялау пайдаланылатын аспаптың бағдарламалық қамтамасыз етуінің көмегімен автоматты жүргізіледі.

Нәтижелерді интерпретациялау принципі келесідегідей:

- Егер берілген сынама үшін FAM арнасы бойындағы сигнал белгіленген шектік мәннен жоғары болса, *Ureaplasma spp.* ДНҚ-ның **анықталғаны**.
- Егер берілген сынама үшін FAM арнасы бойындағы сигнал белгіленген шектік мәннен төмен болса, ал HEX арнасы бойындағы сигнал белгіленген шектік мәннен жоғары болса, *Ureaplasma spp.* ДНҚ-ның **анықталмағаны**.
- Егер берілген сынама үшін FAM арнасы бойындағы сигнал белгіленген шектік мәннен төмен және HEX арнасы бойындағы сигнал белгіленген шектік мәннен төмен болса, талдау нәтижесі **нақты емес**.

Егер сынама үшін **нақты емес** нәтиже алынса, тиісті клиникалық үлгінің ПТР-зерттеуін қайталау қажет.

Егер амплификацияның оң және теріс бақылаулары мен ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы үшін 2 кестеге сәйкес дұрыс нәтижелер алынса, ПТР-зерттеу нәтижесі нақты болып есептеледі.

2 кесте

ПТР-талдауының әртүрлі сатыларын бақылауға арналған нәтижелер

Бақылау	ПТР-зерттеудің бақыланатын сатысы	Арна бойындағы сигнал		Кейбір детекторлар бағдарламаларындағы нәтижелерді белгілеу
		FAM	HEX	
Ба-	ДНҚ экстракциясы	Шектік мәнінен төмен	Шектік мәнінен жоғары	«-» немесе «ТБ»
Б-	ПТР	Шектік мәнінен төмен	Шектік мәнінен төмен	«де» немесе «ТБ»
Б+	ПТР	Шектік мәнінен жоғары	Шектік мәнінен жоғары	«+» немесе «ТБ»

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!

1. Егер ПТР оң бақылауы (Б+) үшін FAM арнасы бойынша шектік мәннен төмен болса, *Ureaplasma spp.* ДНҚ анықталмаған барлық үлгілер үшін амплификация мен детекцияны қайталау керек.
2. Егер ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы (Ба-) және/немесе ПТР теріс бақылауы (Б-) үшін FAM арнасы бойындағы сигнал шектік мәнінен жоғары болса, *Ureaplasma spp.* ДНҚ анықталған бүкіл үлгілерге арналған ПТР-зерттеуді ДНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау керек.

FRT нұсқасы

ПТР-зерттеу жүргізу

ПТР-зерттеу келесі сатылардан тұрады:

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

ПТР-зерттеу жүргізу ісшарасы жөніндегі егжей-тегжейлі ақпарат пайдаланылатын жабдық типтеріне байланысты, Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ «Гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы ПТР әдісімен ЖЖБИ (жыныс жолымен берілетін инфекция) және басқа да репродукциялық мүшелер инфекциялары қоздырғыштарының ДНҚ болуына клиникалық материалды зерттеу» әдістемелік ұсыныстарында берілген.

Зерттелетін үлгілерден ДНҚ экстракциялау

ДНҚ экстракциялау (бөліп алу) үшін пайдаланылатын жинаққа арналған нұсқаулыққа сәйкес Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жинағы пайдаланылады. Әрбір клиникалық үлгіден ДНҚ экстракциялау ішкі бақылау үлгісі - IBY-FL қатыстырыла отырып жүргізіледі.

ДНҚ бөліп алу үшін жинақтың 4-7 шығарылу түрлерін пайдаланғанда жинаққа енетін «ДНҚ-сорб-АМ» реагенттер жиынтығы пайдаланылады.

«Нақты уақыт» режиміндегі детекциялаумен амплификацияны жүргізу

А. Амплификация жүргізу үшін пробиркаларды дайындау.

Амплификацияға арналған пробиркаларды таңдау «нақты уақыт» режиміндегі детекция жүйесі бар пайдаланылатын амплификаторға байланысты болады.

Пробиркаларға реагенттерді, ДНҚ сынамаларын және бақылау үлгілерін енгізу үшін сүзгілері бар бір реттік ұштықтар пайдаланылады.

А1. FRT нұсқасындағы «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығының көмегімен амплификация жүргізу үшін пробиркаларды дайындау.

ДНҚ сынамасының 10 мкл көлемін қоса реакциялық қоспаның жалпы көлемі – 30 мкл.

1. Зерттелетін және бақылау сынамаларының ДНҚ амплификациялау үшін *Ureaplasma spp.* ПТР-қоспа-1-FL бар пробиркалардың қажетті санын алып қою керек.
2. Балауыздың бетіне 10 мкл-ден ПТР-қоспа-2-FL-red енгізу керек, бұл орайда ол балауыздың астына түсіп кетпеуі және *Mycoplasma hominis* ПТР-қоспа-1-FL-мен араласпауы тиіс.
3. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін немесе бақылау үлгілерінен экстракциялау нәтижесінде алынған ДНҚ сынамаларын 10 мкл-ден енгізу керек.
4. Бақылау реакцияларын қою керек:
 - а) ПТР теріс бақылауы (Б-) – пробиркаға 10 мкл ДНҚ-буфер енгізу керек.
 - б) ПТР оң бақылауы (Б+) – пробиркаға 10 мкл кешенді ОБУ енгізу керек.
 - в) ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы (Ба-) – пробиркаға ТБҮ-ден бөлініп алынған 10 мкл сынаманы енгізу керек.

А2. FRT-100 F және FRT-1000 F нұсқаларындағы «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығының көмегімен пробиркаларды амплификация жүргізу үшін дайындау.

ДНҚ сынамасының 10 мкл көлемін қоса реакциялық қоспаның жалпы көлемі - 25 мкл.

1. ПТР-қоспа-2-FRT бар пробирканы жібіту керек. ПТР-қоспа-1-FL *Ureaplasma spp.*, ПТР-қоспа-2-FRT реагенттері, полимераза (TaqF) бар пробиркалардың ішіндегісін араластыру және центрифугада/вортесте қысқа уақыт (1-2 сек) центрифугалау арқылы тамшыларды шөктіру керек.
2. Зерттелетін және бақылау сынамаларының ДНҚ амплификациялау үшін пробиркалардың немесе стриптердің қажетті санын алып қою керек.
3. N реакцияларды (2 ПТР бақылауын қоса) жүргізу үшін $10^{*}(N+1)$ мкл ПТР-қоспаны-1-FL *Mycoplasma hominis*, $5,0^{*}(N+1)$ мкл ПТР-қоспаны-2-FRT және $0,5^{*}(N+1)$ мкл полимеразаны (TaqF) жеке пробиркада араластыру

- керек.
4. Дайындалған қоспаны араластыру және центрифуганың/вортекстің көмегімен қысқа уақыт центрифугалау арқылы тамшыларды шөктіру керек.
 5. Әрбір пробиркаға дайындалған қоспаны **15 мкл-ден** енгізу керек.
 6. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін немесе бақылау үлгілерінен экстракциялау нәтижесінде алынған **ДНҚ сынамасын 10 мкл-ден** енгізу керек.
 7. Бақылау реакцияларын қою керек:
 - а) **ПТР теріс бақылауы (Б-)** – пробиркаға **10 мкл ДНҚ-буфер** енгізу керек.
 - б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **10 мкл кешенді ОБУ** енгізу керек.
 - в) **ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы (Ба-)** – пробиркаға ТБУ-ден бөлініп алынған **10 мкл** сынаманы енгізу керек.

Б. «Нақты уақыт» режиміндегі детекциялаумен амплификация жүргізу

1. «АмплиСенс-1» флуоресцентті сигналын амплификациялау мен детекциялаудың тиісті бағдарламасын орындау үшін аспапты («нақты уақыт» режиміндегі детекция жүйесі бар амплификаторды) бағдарламалау керек (3 кестені қараңыз).

3 кесте

«АмплиСенс-1» бағдарламасы

Циклы	Роторлы типтегі аспаптар ⁵			Планшетті типтегі аспаптар ⁶		
	Темпера-тура, °С	Уақыты	Циклдар қайталануының саны	Темпера-тура, °С	Уақыты	Циклдар қайталануының саны
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с флуоресцентті сигналдың детекциясы		60	30 с флуоресцентті сигналдың детекциясы	
		72			15 с	

Флуоресцентті сигналдың детекциясы флуорофорларға арналған FAM және JOE арналары бойынша тағайындалады (басқа тесттерді бір мезгілде жүргізгенде детекция басқа да пайдаланылатын арналар бойымен тағайындалады)⁸.

2. Пробиркаларды аспаптың реакциялық модульдерінің ұяшықтарына орнату керек.
3. Флуоресцентті сигналды детекциялаумен амплификациялау

⁵ Мысалы, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» немесе соған ұқсастар.

⁶ Мысалы, «iCycler», «iQ5», «Mx3000P», «Mx3000», «ДТ-96» немесе соған ұқсастар.

бағдарламасын іске қосу керек.

4. Бағдарламаны орындау аяқталысымен нәтижелерді талдауға кірісу керек.

Нәтижелерді талдау және интерпретациялау.

Нәтижелерді талдауды «нақты уақыт» режиміндегі детекциялы ПТР жүргізу үшін пайдаланылатын аспап бағдарламалық қамтамасыз етуінің көмегімен жүргізеді. Флуоресцентті сигналдың жинақталу қисығын екі арна бойынша талдайды:

- Флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша *Ureaplasma spp.* ДНҚ фрагменті амплификациясы өнімінің жинақталуын растайтын сигнал тіркеледі.
- Флуорофорға арналған JOE арнасы бойынша ІБҮ ДНҚ амплификация өнімінің жинақталуын растайтын сигнал тіркеледі.

Нәтижелер флуоресценция қисығының тиісті деңгейде белгіленген шектік желімен қиылысуының болуы (немесе болмауы) негізінде интерпретацияланады, бұл ДНҚ-ның берілген сынамасы үшін нәтижелер кестесінің тиісті графасында «Сt» шектік циклының мәні болуын (немесе болмауын) анықтайды.

Нәтижелерді интерпретациялау принципі келесідегідей:

- Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесінде флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша «Сt» шектік циклының мәні айқындалса, *Ureaplasma spp.* ДНҚ-сы **анықталғаны**. Бұл орайда берілген сынама флуоресценциясының қисығы флуоресценцияның экспоненциальді жоғарылауына тән учаскедегі шектік түзуді қиып өтуі тиіс.
- Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесінде флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша *Ct* шектік циклының мәні айқындалмаса (жоқ болса) (флуоресценция қисығы шектік сызықты қиып өтпесе), ал нәтижелер кестесінде флуорофорға арналған JOE арнасы бойынша *Ct* шектік циклының мәні көрсетілген (шектік) мәннен аспай айқындалса, *Ureaplasma spp.* ДНҚ-сы **анықталмағаны**.
- Егер берілген сынама үшін флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша *Ct* шектік циклының мәні айқындалмаса (жоқ болса) және флуорофорға арналған JOE арнасы бойынша да *Ct* мәні анықталмаса (жоқ болса) немесе көрсетілген шектік мәннен асып кетсе, талдау нәтижесі **нақты емес**. Мұндай жағдайда тиісті клиникалық үлгіні ПТР-зерттеу қайта жүргізілуі қажет.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! *Ct* шектік мәндері ПТР-жиынтыққа қосымша бет-парақта көрсетілген. Сонымен қатар Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ «Гибридизациялық-флуоресцентті детекциялы ПТР әдісімен ЖЖБИ және басқа да репродукциялық мүшелер инфекциялары қоздырғыштарының ДНҚ болуына клиникалық материалды зерттеу» әдістемелік ұсыныстарын қараңыз.

Егер бақылау реакциясының нәтижелерін бағалау кестесіне сәйкес амплификацияның оң және теріс бақылаулары мен ДНҚ экстракциясы (бөлініп алыну) теріс бақылауы үшін дұрыс нәтижелер алынса, ПТР-зерттеу нәтижесі дұрыс болып есептеледі (4 кестені қараңыз).

ПТР-талдауының әртүрлі сатыларын бақылауға арналған нәтижелер

Бақылау	ПТР-зерттеудің бақыланатын сатысы	Шектік циклдың мәні, Ct	
		флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша	флуорофорға арналған JOE арнасы бойынша
Ба-	ДНҚ экстракциялау	Мәні жоқ	Шектіктен аз мән анықталды
Б-	ПТР	Мәні жоқ	Мәні жоқ
Б+	ПТР	Шектіктен аз мән анықталды	Шектіктен аз мән анықталды

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!

- Егер ПТР оң бақылауы (Б+) үшін флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша шектік циклдың мәні жоқ болса немесе шекаралық мәннен асып кетсе, *Ureaplasma spp.* ДНҚ анықталмаған барлық үлгілер үшін амплификацияны және детекцияны қайталау керек.
- Егер ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы (Ба-) және/немесе ПТР теріс бақылауы (Б-) үшін FAM арнасы бойындағы шектік циклдың мәні Ct бекітілген болса, *Ureaplasma spp.* ДНҚ анықталған бүкіл үлгілерге арналған ПТР-зерттеуді ДНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау керек.

Қысқарту тізімі

Осы нұсқаулықта келесі қысқартылған сөздер мен мәндері қолданылады:

ІБҮ	– ішкі бақылау үлгісі
ЖЖБИ	– жыныс жолымен берілетін инфекциялар
ТБҮ	– теріс бақылау үлгісі
ОБҮ	– оң бақылау үлгісі
ПТР	– полимеразды тізбекті реакция
FER	– «соңғы нүкте» бойынша флуоресцентті детекция
FRT	– «нақты уақыт» режиміндегі флуоресцентті детекция
Ресейтұтыну қадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ	– Адамның әл-ауқаты және тұтынушылардың құқықтарын қорғау саласындағы қадағалау жөніндегі федералды қызмет «Эпидемиология орталық ғылыми-зерттеу институты» Федералды бюджеттік ғылыми мекемесі

Сақтау шарттары

Реагенттер жиынтығын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. ПТР-қоспа-1-FL *Ureaplasma spp.* жарықтан қорғалған жерде сақтау керек. ПТР-қоспа-2-FRT мен полимеразаны (TaqF) минус 16 °С-ден аспайтын температурада сақтау керек.

Тасымалдау

Реагенттер жинағын 2-ден 8°C-ге дейінгі температурада 5 тәуліктен асырмай тасымалдау керек. «ПТР-жиынтық» FRT-100 F және FRT-1000 F нұсқаларын алған кезде сақтауға ұсынылған температураға сәйкес дереу жиынтықтау керек.

Босатылу шарттары

Емдеу-профилактикалық және санитарлық-профилактикалық мекемелерге арналған.

Сақтау мерзімі

9 ай.

Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін қолдануға болмайды.

Баспа өнімдерінде пайдаланылатын символдар

	Каталогтағы нөмірі		Сақ болыңыз! Жолдама құжаттамаға жүгініңіз
	Партия коды		Тесттердің ең көп саны
	In vitro диагностикасына арналған бұйым		дейін пайдаланыңыз
	Өзгерген күні		Пайдалану жөніндегі басшылыққа жүгініңіз
	Температураның шектемесі		Күн сәулесінің түсуіне жол бермеңіз
	Өндіруші		Дайындалған күні

Осыған сәйкес медициналық мақсаттағы бұйым өндірілген нормативтік құжат

Клиникалық материалдағы Ureaplasma (U.parvum және U.urealyticum) текті микроорганизмдер ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалы тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® Ureaplasma spp.-FL» реагенттер жинағы.

Техникалық шарттары ТШ 9398-024-01897593-2009.

Өндіруші

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

Реагенттер жинағының сапасына қатысты шағымдарды дайындаушы кәсіпорынға Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ (111123, Мәскеу қ., Новогиреевская к-сі, 3а үй) шағымдармен жұмыс істейтін және оқуды ұйымдастыратын бөлімге жіберіңіз (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

«АмплиСенс» өнімдері жөніндегі пікірлер мен ұсыныстарды тұтынушы анкетасын толтырып www.amplisens.ru сайтында қалдыруға болады.

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

«КБ Диагностик» ЖШС Алматы обл., Іле ауданы, Боралдай кенті,
(Аэропорт), тел./факс 8 (727) 331-31-42 (47)
E-mail info@kb-diagnostic.kz