

**Қазақстан Республикасы**  
**Денсаулық сақтау министрлігі**  
**Фармация комитеті**  
**төрағасының**  
**2019 жылғы “27” қыркүйек**  
**№ N023860 бұйрығымен**  
**БЕКІТІЛГЕН**

**Медициналық мақсаттағы бұйымды**  
**медицинада қолдану жөніндегі нұсқаулық**

**Медициналық мақсаттағы бұйымның атауы**

Клиникалық материалдағы 16 және 18 типтеріндегі адам папилломасы вирустары (АПВ) ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалы тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға және дифференциациялауға арналған «АмплиСенс® АПВ 16/18-FL» реагенттер жинағы.

**Бұйымның құрамы мен сипаттамасы**

**Тағайындалуы**

«АмплиСенс® АПВ 16/18-FL» реагенттер жинағы клиникалық материалдағы амплификация өнімдерін гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакциясы (ПТР) әдісімен 16 және 18 гентиптеріндегі адам папилломасы вирустары (АПВ) ДНҚ-сын анықтауға және дифференциациялауға арналған. ПТР жүргізуге арналған материал ретінде урогенитальді жол шырышты қабаттарының бөлінділерінен қырынды әдісімен алынған ДНҚ сынамалары қолданылады.

Реагенттер жинағын вирустың екі неғұрлым онкогенді гентипін дифференциациялауға мүмкіндік беретін папилломавирустық инфекцияның диагностикасы кезінде екінші ретінде қарастыру ұсынылады. Диагностиканың бірінші кезеңінде Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН өндірген, АПВ жоғарыонкогендік гентиптерінің кең ауқымын (11–14 гентиптер) анықтайтын «АмплиСенс® АПВ ВКР скрин-ЕPh» (электрофорездік детекциялаумен), «АмплиСенс® АПВ ВКР скрин-FL 2х», «АмплиСенс® АПВ ВКР скрин-FL 3х» немесе «АмплиСенс® АПВ ВКР скрин-титр-FL» (гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен) реагенттер жинақтарын пайдалану ұсынылады.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** ПТР-зерттеулерінің нәтижелері аурудың кешенді диагностикасында ескеріледі.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> 98/79/ ЕО Еуропалық Одақтың директивасына сәйкес.

## Әдістің принципі

Гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакциясы (ПТР) әдісімен АПВ ДНҚ анықтау үш сатыны: клиникалық материалдың үлгілерінен ДНҚ экстракциялауды, берілген микроорганизмнің ДНҚ аймағын ПТР-амплификациялау мен гибридизациялық-флуоресценттік детекциялауды қамтиды. Флуоресцентті дабылды детекциялау FER форматын пайдалану кезінде флуоресцентті ПТР-детектордың көмегімен ПТР аяқталғаннан кейін, ал FRT форматын пайдалану кезінде «нақты уақыт» режимінде флуоресценттік дабылды детекциялау жүйесі бар амплификатордың көмегімен тікелей ПТР барысында жүзеге асырылады.

Әдіс эндогендік ішкі бақылау ретінде пайдаланылатын  $\beta$ -глобинді генінің АПВ ДНҚ аймақтарын және ДНҚ аймағын бір мезгілде амплификациялауға негізделген. 16 және 18 гентиптеріндегі АПВ ДНҚ-сы болуына ПТР-зерттеу бір пробиркада жүргізіледі. Ішкі бақылау ретінде таңдалған ДНҚ-нысанасы адам геномының бөлігі болып табылады және әрдайым үлгіде (цервикальдік қырынды) жағындыдағы жасушалар санына барабар жеткілікті мөлшерде ( $10^5 - 10^7$  жасуша/мл) болуы керек. Осылайша, эндогендік ішкі бақылау ПТР-зерттеу кезеңдерін (ДНҚ экстракциясын және амплификация жүргізу) бақылауға ғана емес, сонымен қатар материал алу мен оны сақтаудың дұрыстығын бағалауға мүмкіндік береді. Егер эпителий қырындысы дұрыс алынбаған жағдайда (эпителий жасушаларының саны жеткіліксіз),  $\beta$ -глобиндік генді амплификациялау дабылы төмендетілген болады.

## Талдамалық сипаттамалар

### Талдамалық сезімталдық

Клиникалық материалдың түрі	Тасымалдау ортасы	ДНҚ бөліп алуға арналған жиынтық	Амплификация мен детекцияға арналған жиынтық	Талдамалық сезімталдық, ГЭ/мл <sup>2</sup>
Цервикальдік эпителий қырындысы	«Муколитикпен тасымалдау ортасы (МТО)»	«ДНҚ-сорб-АМ»	«ПТР-жиынтық»	$1 \times 10^3$

Әрбір нысана үшін реагенттер жинағын сызықтық өлшеу диапазоны  $10^3$ -ден  $10^8$  ГЭ/мл-ге дейінді құрайды.

### Талдамалық спецификалығы

Реагенттер жинағы 16 және 18 гентиптеріндегі АПВ ДНҚ-сы фрагментін анықтайды. Жинақтың талдамалық спецификалығы әртүрлі микроорганизмдердің ДНҚ/РНҚ реакциясына қосу арқылы зерттелді (2, 3 және 7 типтеріндегі аденовирус, цитомегаловирус, Эпштейн-Барр вирусы, желшешек вирусы, В, С гепатиті вирусы, бірінші типті адам иммунтапшылығы вирусы, 6 және 8 типті адам герпесі вирусы, қарапайым

<sup>2</sup> Көрсетілген тасымалдау ортасына орналастырылған 1 мл клиникалық материал үлгісіндегі микроорганизмнің геномдық баламаларының (ГЭ) саны.

герпес вирусы, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, β, γ, μ тұқымдасы (1, 3, 4, 5, 8, 37, 38, 65, 20, 24, 49, 50, 15), α төмен және белгіленбеген қауіптегі (6, 11, 26, 53, 7, 27, 10), α тұқымдасы жоғары канцерогенді қауіптегі (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68) адам папилломасы вирустары ДНҚ концентрацияда мл-ге АПВ ДНҚ 10<sup>8</sup> көшірмелері). Сонымен қатар айқаспалы реакциялар анықталмады.

## Жинақ құрамы

### ҒЕР НҰСҚАСЫ

«ДНҚ-сорб-АМ» реагенттер жиынтығы 100 нұсқасы – клиникалық материалдан ДНҚ экстракциялауға арналған реагенттер жиынтығында мыналар бар:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистейтін ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық <sup>3</sup>	30	1 құты
Шаятын ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	100	1 құты
Әмбебап сорбент	Ақ түсті суспензия	1,0	2 пробирка
ДНҚ элюциясына арналған ТЕ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	5,0	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда 100 сынамадан ДНҚ бөліп алуға есептелген. Жиынтықталымның 4, 5 және 6 түрлерінің құрамына кіреді.

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы ҒЕР нұсқасы – «ақырғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен 16 және 18 гентиптеріндегі адам папилломасы вирустары (АПВ) ДНҚ-сын амплификациялау мен дифференциациялауға арналған реагенттер жиынтығында мыналар бар:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18 балауыз астында тамызылды	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	Қызыл түсті мөлдір сұйықтық	0,6	1 пробирка
ПТР-ға арналған минералды май	Түссіз тұтқыр сұйықтық сұйықтық	4,0	1 құты
16, 18 типтердегі АПВ ДНҚ және адам ДНҚ ОБУ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	1 пробирка

<sup>3</sup> Лизистейтін ерітіндіні 2°C-ден 8 °C-ге дейінгі температурада сақтаған кезде кристалдар түрінде тұнба түзілуі мүмкін.

ДНҚ -буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка
------------	------------------------	-----	------------

Реагенттер жиынтығы бақылауды және фоновые үлгілерді қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген.

Реагенттер жиынтығына экстракция кезеңінің бақылау үлгісі қоса беріледі:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ТБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка

**«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FER-100 F нұсқасы** «ақырғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен адам папилломасы вирустары (АПВ) 16 және 18 гентиптерін ДНҚ-сын амплификациялау мен дифференциациялауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	4 пробирка
ПТР-қоспа-2-FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	2 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,03	2 пробирка
ПТР-қоспа-Фон	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка
ПТР үшін минералды май	Түссіз тұтқыр сұйықтық	4,0	1 құты
16, 18 типтердегі АПВ ДНҚ ОБҮ және адамның ДНҚ-сы	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	1 пробирка
ДНҚ -буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды және фондық үлгілерді қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген.

Реагенттер жиынтығына экстракция кезеңінің бақылау үлгісі қоса беріледі:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ТБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка

### **FRT НҰСҚАСЫ**

**«ДНҚ-сорб-АМ» реагенттер жиынтығы 100 нұсқасы** – клиникалық материалдан ДНҚ экстракциялауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистейтін ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық <sup>4</sup>	30	1 құты
Шаятын ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	100	1 құты

<sup>4</sup> Лизистейтін ерітіндіні 2°С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтаған кезде кристалдар түрінде тұнба түзілуі мүмкін.

Әмбебап сорбент	Ақ түсті суспензия	1,0	2 пробирка
ДНҚ элюциясына арналған ТЕ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	5,0	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда 100 сынамадан ДНҚ бөліп алуға есептелген. Жиынтықталымның 3 және 4 түрлерінің құрамына кіреді.

**«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT нұсқасы** – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен адам папилломасы вирустары (АПВ) 16 және 18 гентиптерін ДНҚ-сын амплификациялауға, дифференциациялауға және сандық анықтауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18 балауыз астында тамызылды	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,01	Көлемі 0,2 мл 110 пробирка
ПТР-қоспа-2-FL-red	Қызыл түсті мөлдір сұйықтық	1,1	1 пробирка
К1 АПВ 16, 18	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,04	3 пробирка
К2 АПВ 16, 18	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,04	3 пробирка
К3 АПВ 16, 18	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,04	3 пробирка
ДНҚ -буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген.

Реагенттер жиынтығына экстракция кезеңінің бақылау үлгісі қоса беріледі:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ТБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка

**Реагенттер жиынтығына мыналар қоса беріледі:**

- 16 және 18 гентиптеріндегі АПВ ДНҚ-сы санын автоматты есептеуге және нәтижелерді интерпретациялауға арналған Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix форматындағы бағдарламалық қамтамасыз ету;

**«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT-100 F нұсқасы** – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен адам папилломасы вирустары (АПВ) 16 және 18 гентиптерін ДНҚ-сын амплификациялауға, дифференциациялауға және сандық анықтауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	4 пробирка
ПТР-қоспа-2-FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	2 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,03	2 пробирка

<b>К1 АПВ 16, 18</b>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,04	3 пробирка
<b>К2 АПВ 16, 18</b>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,04	3 пробирка
<b>К3 АПВ 16, 18</b>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,04	3 пробирка
<b>ДНҚ -буфер</b>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген.

Реагенттер жиынтығына экстракция кезеңінің бақылау үлгісі қоса беріледі:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
<b>ТБҮ</b>	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка

**Реагенттер жиынтығына мыналар қоса беріледі:**

- 16 және 18 гентиптеріндегі АПВ ДНҚ-сы санын автоматты есептеуге және нәтижелерді интерпретациялауға арналған Microsoft Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix форматындағы бағдарламалық қамтамасыз ету.

### **Қолданылу саласы**

Клиникалық зертханалық диагностика.

### **Жиынтықталымы**

**Реагенттер жинағы 2 форматта шығарылады.**

#### **FER форматы**

Реагенттер жинағы жиынтықталымның 7 түрінде шығарылады:

**1 түрі** «ПТР-жиынтық» FER-100 F нұсқадағы реагенттер жиынтығын қамтиды.

**2 түрі** «ПТР-жиынтық» FER нұсқадағы реагенттер жиынтығын қамтиды (0,5 мл пробиркалар).

**3 түрі** «ПТР-жиынтық» FER нұсқадағы реагенттер жиынтығын қамтиды (0,2 мл пробиркалар).

**4 түрі** «ДНҚ-сорб-АМ» 100 нұсқадағы, «ПТР-жиынтық» FER-100 F нұсқадағы реагенттер жиынтықтарын қамтиды.

**5 түрі** «ДНҚ-сорб-АМ» 100 нұсқадағы, «ПТР-жиынтық» FER нұсқадағы реагенттер жиынтықтарын қамтиды (0,5 мл пробиркалар).

**6 түрі** «ДНҚ-сорб-АМ» 100 нұсқадағы, «ПТР-жиынтық» FER нұсқадағы реагенттер жиынтықтарын қамтиды (0,2 мл пробиркалар).

**7 түрі** көтерме, жекелеген реагенттер бойынша алдын ала қапталған, олардың көтерме қаптамасында реагенттердің таңбасы бар реагенттер жинақтарын қамтиды.

Жиынтықталымның 1, 2 және 3 түрлері «ақырғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен 16, 18 типтердегі АПВ ДНҚ амплификациясын жүргізуге арналған.

Толық ПТР-зерттеу жүргізу үшін Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынған ДНҚ экстракциялауға арналған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет.

Жиынтықталымның 4, 5 және 6 түрлері клиникалық материалдан ДНҚ экстракциялауды қамтитын толық ПТР-зерттеуін және «ақырғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен 16, 18 типтердегі АПВ ДНҚ амплификациясын жүргізуге арналған.

Жиынтықталымның 7 түрі тапсырыс берушінің тілінде және жинақтар бойынша жиынтықталымның келесі таңбалануы үшін өндірістік мақсаттарға арналған.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Жиынтықталымның 7 түрі Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН бекітілген регламентке сәйкес қана пайдаланылады.

### **FRT форматы**

Реагенттер жинағы жиынтықталымның 5 түрінде шығарылады:

**1 түрі** «ПТР-жиынтық» FRT-100 F нұсқадағы реагенттер жиынтығын қамтиды.

**2 түрі** «ПТР-жиынтық» FRT нұсқадағы реагенттер жиынтығын қамтиды.

**3 түрі** «ДНҚ-сорб-АМ» 100 нұсқадағы, «ПТР-жиынтық» FRT-100 F нұсқадағы реагенттер жиынтықтарын қамтиды.

**4 түрі** «ДНҚ-сорб-АМ» 100 нұсқадағы, «ПТР-жиынтық» FRT нұсқадағы реагенттер жиынтықтарын қамтиды.

**5 түрі** көтерме, жекелеген реагенттер бойынша алдын ала қапталған, олардың көтерме қаптамасында реагенттердің таңбасы бар реагенттер жинақтарын қамтиды.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** FRT форматындағы реагенттер жинағының 1-4 шығару түрлерін 16 және 18 гентиптеріндегі адам папилломасы вирустары ДНҚ-сын сапалық анықтау үшін де, сандық бағалау үшін де пайдалануға болады.

Жиынтықталымның 1 және 2 түрлері «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен 16 және 18 гентиптеріндегі АПВ ДНҚ-сын амплификациялау жүргізуге арналған. Толық ПТР-зерттеу жүргізу үшін Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынған ДНҚ экстракциялауға арналған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет.

Жиынтықталымның 3 және 4 түрлері клиникалық материалдан ДНҚ экстракциясын қамтитын толық ПТР-зерттеу жүргізуге және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен 16 және 18 гентиптеріндегі АПВ ДНҚ-сын амплификациялау жүргізуге арналған.

Жиынтықталымның 5 түрі тапсырыс берушінің тілінде және жинақтар бойынша жиынтықталымның келесі таңбалануы үшін өндірістік мақсаттарға арналған.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Жиынтықталымның 5 түрі Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН бекітілген регламентке сәйкес қана пайдаланылады.

## **Сақтық шаралары**

Жұмыс санитарлық-эпидемиялық ережелерін сақтаумен инфекциялық аурулар қоздырғыштарының болуына клиникалық материалды молекулярлық-биологиялық (ПТР) зерттеулерді орындайтын зертханада, СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділігі (қауіптілігі) III–IV топтағы микроорганизмдермен және паразиттік аурулар қоздырғыштарымен жұмыс істеу қауіпсіздігі», СанЕжН 2.1.7.2790-10 «Медициналық қалдықтарды өңдеуге қойылатын санитарлық-эпидемиологиялық талаптар» және ӘН 1.3.2569-09 «Патогенділігі I–IV топтағы микроорганизмдері бар материалмен жұмыс кезінде нуклеин қышқылдарын амплификациялау әдістерін пайдаланатын зертханалардың жұмысын ұйымдастыру» әдістемелік нұсқауларына сәйкес жүргізілуі керек.

Жұмыс істеу кезінде әрқашан келесі талаптарды орындау керек:

- Зерттелетін үлгілерді инфекциялық қауіпті ретінде қарастырып, СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділігі (қауіптілігі) III–IV топтағы микроорганизмдермен және паразиттік аурулар қоздырғыштарымен жұмыс істеу қауіпсіздігі» санитарлық ережелеріне сәйкес жұмысты ұйымдастыру және сақтау.
- Төгілген үлгілер мен реактивтерді дезинфекциялайтын заттарды пайдалана отырып, СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділігі (қауіптілігі) III–IV топтағы микроорганизмдермен және паразиттік аурулар қоздырғыштарымен жұмыс істеу қауіпсіздігі» санитарлық ережелеріне сәйкес жинап алу және дезинфекциялау.
- Зертханалық үдеріс бір бағытта болуы керек. Талдау жекелеген бөлмелерде (аймақтарда) жүргізіледі. Жұмыс Бөліп алу Аймағында басталып, Амплификациялау және Детекциялау Аймағында жалғасуы керек. Үлгілерді, жабдықтарды мен реактивтерді үдерістің алдыңғы сатысы өткізілген аймаққа қайтаруға болмайды.
- Пайдаланылмаған реактивтерді СанЕжН 2.1.7.2790-10 «Медициналық қалдықтарды жұмыс істеуге қойылатын санитарлық-эпидемиологиялық талаптарға» сәйкес жою керек.

## **НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!**

Амплификациялаудан кейін қалдықтарды (ПТР өнімдері бар пробиркаларды) жою кезінде пробиркаларды ашуға және ішіндегісін төгуге жол берілмейді, өйткені бұл зертхана аумағының, жабдықтар мен реагенттердің ПТР 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 болу керек. Жанасу болғанда зақымданған жерді дереу сумен жуу және медициналық



жәрдем алу керек.

- Материалдардың қауіпсіздігі жөніндегі парақтар (MSDS – material safety data sheet) сұраныс бойынша қол жетімді.

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

1. Тасымалдау ортасы – «Муколитикпен тасымалдау ортасы (МТО)» (ТШ 9398-098-01897593-2009) немесе Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынған басқалары.
  2. ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – «ДНҚ-сорб-АМ» (ТШ 9398-036-01897593-2009) немесе Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынған басқалары – жиынтықталымның 1-3 түрлерімен (FER форматы) және 1, 2 (FRT форматы) жұмыс істегенде.
  3. ДНҚ экстракциясына арналған қосымша материалдар мен құрал-жабдықтар – ДНҚ экстракциясына арналған реагенттер жиынтығына нұсқаулыққа сәйкес.
  4. Бактериясыз ауа ортасы боксы (ПТР-бокс).
  5. Центрифуга/вортекс.
  6. Ауыспалы көлемдегі электрондық немесе механикалық дозаторлардың жинағы.
  7. Штативтердегі 200 мкл-ге дейінгі дозаторларға арналған бір реттік ұштықтар.
  8. Штативтердегі 200 мкл-ге дейінгі сүзгісімен бір реттік ұштықтар.
  9. Көлемі 0,2 мл немесе 0,5 мл пробиркаларға арналған штативтер (пайдаланылатын реагенттер жиынтықтарына сәйкес).
  - 10.-16 °С-ден аспайтын мұздатқыш камерасымен 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурадағы тоңазытқыш.
  11. Жеке халат, қалпақтар, аяқ киімдер және бір реттік қолғаптар ЭН 1.3.2569-09 бойынша.
  12. Ұштықтарды тастауға арналған ыдыс.
- FER форматымен жұмыс істеу кезінде:
13. Көлемі 0,2 мл немесе 0,5 мл бір реттік полипропиленді пробиркалар – «ПТР-жиынтық» FER-100 F нұсқасымен жұмыс істеу кезінде.
  14. 0,5 мл пробиркаларға (мысалы, «Терцик», «ДНҚ-Технология», Ресей); 0,2 мл пробиркаларға (мысалы, Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия) немесе МахуGene (Axygen, АҚШ) арналған бағдарламаланатын амплификатор.
  15. Үш және одан астам детекция каналдарымен флуоресцентті ПТР-детектор (мысалы, ALA-1/4 (BioSan, Латвия); «Джин» («ДНҚ-Технология», Ресей)).
- FRT нұсқасымен жұмыс істеу кезінде:
16. «Нақты уақыт» режимінде флуоресцентті дабылды 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» («ДНҚ-Технология», Ресей) және Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН

ұсынған осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда).

17. Бір реттік полипропиленді пробиркалар для ПТР Көлеміом 0,2 мл или 0,1мл – при работе с «ПТР-жиынтықом» нұсқасы FRT-100 F:

- а) Көлемі 0,2 мл дөңгелек немесе жалпақ оптикалық мөлдір қақпағы бар ПТР үшін жұқа қабырғалы пробиркалар – планшеттік типті аспапты пайдалану кезінде;
- б) Көлемі 0,2 мл жалпақ қақпағы бар ПТР үшін жұқа қабырғалы пробиркалар (мысалы, Axugen, АҚШ) немесе Көлемі 0,1 мл стриптердегі 4 данадан қақпақтарымен, Rotor-Gene-ге ПТР үшін пробиркалар (мысалы, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – роторлық типті аспапты пайдалану кезінде.

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

Жұмыс басталар алдында Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН Мәскеу, 2008ж. әзірлеген «ПТР-диагностика үшін клиникалық материалды алу, тасымалдау, сақтау» әдістемелік ұсынымдарын оқып шығу керек.

Зерттеу жүргізу үшін келесі клиникалық материал пайдаланылады:

**Әйелдерде:** эпителий үлгілерін сондай-ақ цитологиялық зерттеу сияқты алады:

**Бірінші тәсіл** – үлгілер алуға арналған ішінде бір/екі цервикальдік цитошеткасы және «Муколитикпен тасымалдау ортасы (МТО)» 0,5 мл көлемінде 2 мл-ге пробиркасы бар жиынтық пайдаланылады.

Бір цервикальдік цитошеткамен алынған цервикальдік каналдың (эндоцервикс) эпителий қырындысын және/немесе екінші цервикальдік цитошеткамен алынған жатыр мойнағының беткейімен (экзоцервикс) эпителий қырындысын тасымалдау ортасымен пробиркаға салу керек. Цитошеткалардың жұмыс бөлігін үзіп алып, тасымалдау ортасымен пробиркада қалдыру керек.

**Екінші тәсіл** – үлгілер алуға арналған ішінде цервикальдік цитошеткасы және Digene тасымалдау ортасымен 1,0 мл көлемінде пробиркасы бар Digene (АҚШ) фирмасының жиынтығы пайдаланылады.

Эндоцервикстен цервикальдік цитошеткамен алынған қырындыны Digene тасымалдау ортасымен пробиркаға салу керек.

**Үшінші тәсіл** – үлгілер алуға арналған ішінде эндо-/экзоцервикстен эпителиді бірмезгілде алуға арналған біріктірілген гинекологиялық зонд және «Муколитикпен тасымалдау ортасы (МТО)» 2,0 мл көлемінде 5 мл-ге пробиркасы бар жиынтық пайдаланылады.

Эндоцервикс пен экзоцервикстен алынған қырындыны тасымалдау ортасымен пробиркаға салу керек. Зондтың жұмыс бөлігін үзіп алып, тасымалдау ортасымен пробиркада қалдыру керек.

**Төртінші тәсіл** – үлгілер алуға арналған ішінде эндо-/экзоцервикстен эпителиді бірмезгілде алуға арналған біріктірілген гинекологиялық зонд және CytoScreen (Италия) фирмасының тасымалдау-бекіту ортасымен немесе PreservCyt (АҚШ) фирмасының сұйық цитологияға арналған банкасы бар

жиынтық пайдаланылады.

Эндоцервикс пен экзоцервикстен алынған қырындыны тасымалдау-бекіту ортасымен пробиркаға салу керек. Зондтың жұмыс бөлігін үзіп алып, тасымалдау ортасымен банкада қалдыру керек.

**Бесінші тәсіл** – Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН өндірген «Инфекцияларды ПТР әдісімен диагностикалау үшін қынаптан алынған сүртіндіні өз бетімен алуға арналған жиынтық» пайдаланылады.

**Еркектерде:** эмбебап зондпен алынған уретра эпителиі қырындысын «Муколитикпен тасымалдау ортасы (МТО)» бар 0,5 мл көлемінде 2 мл-ге пробиркаға салу керек.

**Сынамаларды сақтау шарттары:**

- 18 °С-ден 25 °С-ге дейінгі температурада – 5 тәуліктен асырмай;
- 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада – 20 тәуліктен асырмай;
- -16 °С-ден аспайтын температурада – бір жыл бойы. Материалды бір рет мұздатып қатыру-жібітуге жол беріледі.

Сұйық цитология үшін тасымалдау-бекіту ортасында материал бір жыл бойы бөлме температурасында сақталады.

## **ҒЕР нұсқасы**

### **ПТР-зерттеуін жүргізу**

ПТР-зерттеу келесі кезеңдерден тұрады:

- Зерттелетін үлгілерден алынған ДНҚ экстракциялау.
- Амплификация жүргізу.
- «Ақырғы нүкте» бойынша амплификация өнімдерін флуоресцентті детекциялау.
- Нәтижелерді интерпретациялау.

Пайдаланылған жабдыққа байланысты ПТР-зерттеуін жүргізу емшарасы жөніндегі егжей-тегжейлі ақпарат клиникалық материалдағы 16 және 18 гентиптеріндегі адам папилломасы вирустары (АПВ) ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакциясы (ПТР) әдісімен анықтауға және дифференциациялауға арналған, Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН әзірленген, «АмплиСенс® АПВ 16/18-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда баяндалған.

### **Зерттелетін үлгілерден алынған ДНҚ экстракциялау**

ДНҚ экстракциялау үшін пайдаланылатын жиынтыққа нұсқаулыққа сәйкес Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынған реагенттер жиынтықтары пайдаланылады.

ДНҚ экстракциясы үшін жинақтың 4, 5 және 6 шығару түрлерін пайдалану кезінде жинаққа кіретін «ДНҚ-сорб-АМ» реагенттер жиынтығы пайдаланылады. Жұмыс тәртібін «ДНҚ-сорб-АМ» реагенттер жиынтығын

пайдаланумен ДНҚ экстракциясы» қосымшасында қараңыз.

## Амплификация жүргізу

### А. Амплификациялауға арналған пробиркаларды дайындау

Амплификациялауға арналған пробиркаларды таңдау пайдаланылатын амплификаторға байланысты.

Реагенттерді, ДНҚ сынамалары мен бақылау үлгілерін пробиркаларға енгізу үшін сүзгілері бар бір реттік ұштықтар пайдаланылады.

### А1. «ПТР-жиынтық» FER нұсқасын пайдаланумен амплификацияға арналған пробиркаларды дайындау

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

#### 1. «Фон» үлгілерін дайындау. 2 фондық үлгіні дайындау керек:

– ДНҚ экстракциясы үшін ұсынылған реагенттер жиынтықтарынан біреуін пайдаланған кезде:

екі пробиркаға балауыздың беткейіне 20 мкл ПТР-қоспа-Фон-red енгізу керек. ПТР үшін беткейге минералды майдың тамшысын қосу керек (майды амплификатордың типіне байланысты қосу ұсынылады).

– ДНҚ экстракциясы үшін басқа реагенттер жинақтарын пайдаланған кезде пайдаланылатын жинаққа нұсқаманы орындау керек.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** «Фон» үлгілерін амплификациялау жүргізгеннен кейін 1 ай бойы 2 °С-ден 20 °С-ге дейінгі температурада сақтауға және көп рет пайдалануға болады. «Фон» пробиркаларын бірдей сериялы реагенттер жинағымен, бірдей типтегі бөлінетін реагенттермен және бірдей типтегі ПТР-пробиркаларымен бірге пайдаланған жағдайда, оларды көп рет пайдалануға рұқсат етіледі.

2. Зерттелетін және бақылау сынамаларын ДНҚ амплификациялау үшін **АПВ 16/18 ПТР-қоспа-1-FL бар** пробиркалардың қажетті санын алу керек.

3. Балауыздың беткейіне **ПТР-қоспа-2-FL-red 10 мкл-ден** енгізу керек, сонымен қатар ол балауызға түсіп кетпеуі және **АПВ 16/18 ПТР-қоспа-1-FL-мен** араласпауы керек.

4. ПТР үшін беткейге минералды майдың тамшысын қосу керек (майды амплификатордың типіне байланысты қосу ұсынылады).

5. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін немесе бақылау үлгілерінің ДНҚ экстракциясы нәтижесінде алынған **ДНҚ сынамаларын 10 мкл-ден** енгізу керек.

6. Бақылау реакцияларын төмендегідей қою керек:

а) **ПТР теріс бақылауы (Б–)** – пробиркаға **10 мкл ДНҚ –буферді** енгізу керек;

б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **10 мкл 16, 18 типтердегі АПВ ДНҚ және адам ДНҚ ОБУ** енгізу керек;

в) **экстракцияның теріс бақылауы (Ба–)** – ДНҚ экстракциясы үшін ұсынылған реагенттер жиынтықтарының біреуін пайдаланған жағдайда

пробиркаға ТБҮ-ден бөлінген **10 мкл** сынаманы енгізу керек.

Ескертпе – экстракцияның теріс бақылауы (Б–) пробиркасына ДНҚ экстракциясы үшін басқа реагенттер жинақтарын пайдаланған кезде пайдаланылатын жинаққа нұсқаулыққа сәйкес 10 мкл тиісті сынаманы (Б–) енгізу керек.

**А1. «ПТР-жиынтық» FER-100 F нұсқадағы реагенттер жиынтығының көмегімен амплификация үшін пробиркаларды дайындау ДНҚ сынамасының көлемін қоса – 10 мкл, реакциялық қоспаның жалпы көлемі– 25 мкл.**

1. «Фон» дайындау. **2 фондық үлгіні дайындау керек.** Ол үшін:

– **ДНҚ экстракциясы үшін ұсынылған реагенттер жиынтықтарынан біреуін пайдаланған кезде:**

екі ПТР-пробиркаға **10 мкл ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18 және 15 мкл ПТР-қоспа-Фонды** енгізу керек. ПТР үшін беткейге минералды майдың тамшысын қосу керек (майды амплификатордың типіне байланысты қосу ұсынылады).

– **ДНҚ экстракциясы үшін басқа реагенттер жинақтарын пайдаланған кезде пайдаланылатын жинаққа нұсқаулықты орындау керек.**

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!»** «Фон» үлгілерін амплификациялау жүргізгеннен кейін 1 ай бойы 2 °С-ден 20 °С-ге дейінгі температурада сақтауға және көп рет пайдалануға болады. «Фон» пробиркаларын бірдей сериялы реагенттер жинағымен, бірдей типтегі бөлінетін реагенттермен және бірдей типтегі ПТР-пробиркаларымен бірге пайдаланған жағдайда, оларды көп рет пайдалануға рұқсат етіледі.

2. **ПТР-қоспа-2-FRT мен полимераза**ның (TaqF) қоспасын дайындау керек. Ол үшін **полимеразамен (TaqF) (30 мкл)** бір пробирканың ішіндегісін **ПТР-қоспа-2-FRT (300 мкл)** бар пробиркаға толығымен апарып салу және көбік түзілуіне жол бермей, вортексте мұқият араластыру керек. Қоспаны дайындау күнін көрсетіп, пробирканы таңбалау керек.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Дайындалған қоспа 60 үлгіні зерттеуге есептелген. Қоспаны 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 3 ай бойы сақтау және қажет болған кезде пайдалану керек.

3. Реакциялық қоспаны дайындау керек (1 кестені қараңыз). Есептеу кезінде тіпті бір үлгіні зерттеу үш бақылау реакциясын қоюмен қатар жүретінін ескеру қажет. Бұдан басқа **артығымен** реагенттерді алып, тағы бір реакцияға есептеу керек.

Есептеу әрбір ПТР қойылымына төмендегілер талап етілетіндігі бойынша жүргізіледі:

- 10 мкл **ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18;**
- 5 мкл **қоспа ПТР-қоспа-2-FRT және полимераза (TaqF).**

## Реакциялық қоспаларды дайындау сызбасы

Зерттелетін үлгілердің саны	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18, мкл	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Қоспа ПТР-қоспа-2-FRT және полимераза (TaqF), мкл	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Зерттелетін үлгілердің саны	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18, мкл	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350
Қоспа ПТР-қоспа-2-FRT және полимераза (TaqF), мкл	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175

Ескертпе – Есептеу мына формулаға сәйкес үлгілер үшін берілген:  $n + 4$ , мұнда  $n$  – зерттелетін клиникалық үлгілердің саны, 4 – ПТР-зерттеу бақылаулары, олардан 1 экстракция кезеңін бақылау, 2 ПТР кезеңін бақылау және бір пробиркаға артығы.

4. Әрбір зерттелетін үлгі, оң және теріс бақылаулар үшін «Жұмыс орны» штативінде бір ПТР-пробиркадан орнату керек. Әрбір пробиркаға дайындалған қоспаны **15 мкл**-ден енгізу керек.
5. ПТР үшін беткейге минералды майдың тамшысын қосу керек (майды амплификатордың типіне байланысты қосу ұсынылады).
6. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін немесе бақыланатын үлгілерден экстракция нәтижесінде алынған **ДНҚ сынамаларын 10 мкл**-ден енгізу керек.
7. Бақылау реакцияларын төмендегідей қою керек:
  - а) **ПТР теріс бақылауы (Б–)** – пробиркаға **10 мкл ДНҚ –буферді** енгізу керек.
  - б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **10 мкл 16, 18 типтердегі АПВ ДНҚ және адам ДНҚ ОБУ** енгізу керек.
  - г) **Экстракцияның теріс бақылауы (Ба–)** – пробиркаға ДНҚ экстракциясы үшін ұсынылған реагенттер жиынтықтарының біреуін пайдаланған жағдайда пробиркаға ТБҮ-ден бөлінген **10 мкл** сынаманы енгізу керек.

Ескертпе – экстракцияның теріс бақылауы (Б–) пробиркасына ДНҚ экстракциясы үшін басқа реагенттер жинақтарын пайдаланған кезде пайдаланылатын жинаққа нұсқаулыққа сәйкес бөлінген 10 мкл тиісті сынаманы (Б–) енгізу керек.

Амплификаторға салмай тұрып, қысқа (1-3 с) центрифугалау арқылы пробиркалардың қабырғаларынан тамшыларды тұндыру ұсынылады.

## Б. Амплификация жүргізу

1. Тиісті бағдарламаны амплификаторда іске қосыңыз (2, 3 кестені қараңыз). Ұяшықтардағы температура 95 °С-ге жеткенде (үзіліс режимі), пробиркаларды амплификатордың ұяшықтарына салу және бағдарламаны жалғастыру үшін түймені басу керек.

2 кесте

### «АмплиСенс-1-FER» амплификациялау бағдарламасы

	«Терцик»			GeneAmp PCR System 2700			Gradient Palm Cycler, MaxyGene		
Цикл	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны
0	<b>95</b>	Үзіліс		<b>95</b>	Үзіліс		<b>95</b>	Үзіліс	
1	<b>95</b>	5 мин	1	<b>95</b>	5 мин	1	<b>95</b>	5 мин	1
2	<b>95</b>	2 с	35	<b>95</b>	20 с	20	<b>95</b>	2 с	24
	<b>65</b>	5 с		<b>65</b>	25 с		<b>65</b>	10 с	
	<b>72</b>	5 с		<b>72</b>	30 с		<b>72</b>	10 с	
3	<b>95</b>	2 с	9	<b>95</b>	20 с	24	<b>95</b>	2 с	20
	<b>60</b>	10 с		<b>60</b>	30 с		<b>60</b>	15 с	
	<b>72</b>	5 с		<b>72</b>	30 с		<b>72</b>	10 с	
4	<b>95</b>	2 с	1	<b>95</b>	20 с	1	<b>95</b>	2 с	1
	<b>60</b>	10 с		<b>60</b>	30 с		<b>60</b>	15 с	
	<b>10</b>	сақтау		<b>10</b>	сақтау		<b>10</b>	сақтау	

Ескертпе – Бұл бағдарлама тек «ПТР-жиынтық» **FER** нұсқасымен жұмыс істеу кезінде пайдаланылады.

3 кесте

### «АмплиСенс-1-FER-F» амплификациялау бағдарламасы

	«Терцик»			GeneAmp PCR System 2700			Gradient Palm Cycler, MaxyGene		
Цикл	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны
0	<b>95</b>	Үзіліс		<b>95</b>	Үзіліс		<b>95</b>	Үзіліс	
1	<b>95</b>	15 мин	1	<b>95</b>	15 мин	1	<b>95</b>	15 мин	1
2	<b>95</b>	2 с	35	<b>95</b>	20 с	20	<b>95</b>	2 с	24
	<b>65</b>	5 с		<b>65</b>	25 с		<b>65</b>	10 с	
	<b>72</b>	5 с		<b>72</b>	30 с		<b>72</b>	10 с	
3	<b>95</b>	2 с	9	<b>95</b>	20 с	24	<b>95</b>	2 с	20
	<b>60</b>	10 с		<b>60</b>	30 с		<b>60</b>	15 с	
	<b>72</b>	5 с		<b>72</b>	30 с		<b>72</b>	10 с	
4	<b>95</b>	2 с	1	<b>95</b>	20 с	1	<b>95</b>	2 с	1
	<b>60</b>	10 с		<b>60</b>	30 с		<b>60</b>	15 с	
	<b>10</b>	сақтау		<b>10</b>	сақтау		<b>10</b>	сақтау	

Ескертпе – Бұл бағдарлама тек «ПТР-жиынтық» **FER-100 F** нұсқасымен жұмыс істеу кезінде пайдаланылады.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Егер бұл реагенттер жиынтығы «АмплиСенс® АПВ

ВКР скрин-FL 2х» немесе «АмплиСенс® АПВ ВКР скрин-FL 3х» реагенттер жинағымен бірге пайдаланылса, онда бірыңғай амплификациялау бағдарламасын бір рет пайдалануға болады (4 кестені қараңыз)

4 кесте

**16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 гентиптеріндегі АПВ ДНҚ амплификациялау бағдарламасы**

Белсенді реттелетін амплификаторлар (пробиркадағы ерітінді бойынша)									
«Терцик»				GeneAmp PCR System 2700			Gradient Palm Cyclер; MaxyGene		
Цикл	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны
0	<b>95</b>	Үзіліс		<b>95</b>	Үзіліс		<b>95</b>	Үзіліс	
1	<b>95</b>	15 мин	1	<b>95</b>	15 мин	1	<b>95</b>	15 мин	1
2	<b>93</b>	5 с	20	<b>95</b>	10 с	50	<b>93</b>	5 с	50
	<b>59</b>	5 с		<b>59</b>	20 с		<b>59</b>	10 с	
	<b>72</b>	5 с		<b>72</b>	10 с		<b>72</b>	5 с	
3	<b>93</b>	2 с	30	<b>72</b>	1 мин	1	<b>72</b>	1 мин	1
	<b>59</b>	10 с		<b>95</b>	20 с	1	<b>95</b>	20 с	1
4	<b>10</b>	сақтау		<b>10</b>	сақтау		<b>10</b>	сақтау	

2. Амплификациялау бағдарламасын орындауды аяқтағаннан кейін флуоресценттік дабылды детекциялауға арналған аспаптың көмегімен детекциялауға кірісу керек.

**«Ақырғы нүкте» бойынша амплификациялау өнімдерін флуоресцентті детекция**

Детекциялау мынадай үш канал бойынша флуоресцентті дабылдың қарқындылығын өлшеу арқылы флуоресценттік ПТР-детектордың көмегімен (тиісті аспапқа нұсқаулыққа сәйкес) жүргізіледі.

- FAM каналы бойынша (немесе ұқсас, аспаптың моделіне байланысты) 16 гентиптік АПВ ДНҚ амплификациялау өнімінің жинақталуы туралы дабыл тіркеледі,
- HEX каналы бойынша (немесе ұқсас, аспаптың моделіне байланысты) 18 гентиптік АПВ ДНҚ амплификациялау өнімінің жинақталуы туралы дабыл тіркеледі,
- ROX каналы бойынша (немесе ұқсас, аспаптың моделіне байланысты) ІБҮ ДНҚ амплификациялау өнімінің жинақталуы туралы дабыл тіркеледі.

**Тесттің нәтижелерін есепке алу**

Каналы	FAM	HEX	ROX
Нәтижесі	АПВ 16	АПВ 18	ВКО

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** ПТР-детекторының бағдарламалық қамтамасыз етілуіне детекция жүргізгенге дейін тиісті баптамалар енгізіліп, сақталуы



керек – «ПТР-жиынтықу» қосымша парақты, сондай-ақ 16 және 18 гентиптеріндегі адам папилломасы вирустары (АПВ) ДНҚ-сын в клиническом материале гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакциясы (ПТР) әдісімен анықтауға және дифференциациялауға арналған «АмплиСенс® АПВ 16/18-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН әзірлеген әдістемелік ұсынымдарын қараңыз.

### Нәтижелерді интерпретациялау

Алынған нәтижелер бақылау үлгілері үшін тиісті каналдар бойынша фонға және клиникалық үлгілерден бөлінген ДНҚ сынамаларына қатысты флуоресценттік дабылдың деңгейі туралы деректердің негізінде интерпретацияланады.

Интерпретация пайдаланылатын аспаптың бағдарламалық қамтамасыз етілуінің көмегімен автоматты түрде жүргізіледі. Нәтижелерді интерпретациялау принципі келесідей (5 кестені қараңыз):

- теріс нәтиженің белгіленген шекті мәнінен төмен мәндер - **теріс**, оң нәтиженің белгіленген шекті мәнінен жоғары - **оң**, шектер арасындағы – **күмәнді** деп қабылданады;
- FAM каналы бойынша оң нәтиже **16 гентипті АПВ ДНҚ** сынамасында болуы туралы куәландырады;
- HEX каналы бойынша оң нәтиже **18 гентипті АПВ ДНҚ** сынамасында болуы туралы куәландырады;
- егер берілген сынама үшін ROX каналы бойынша дабыл белгіленген шекті мәннен төмен болса, зерттеу нәтижесі **нақты емес**.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Шекті мәндер реагенттер жинағына қоса берілген қосымша парақта көрсетілген.

5 кесте

#### Зерттеу нәтижелерін жалпы интерпретациялау

FAM (АПВ 16)	HEX (АПВ 18)	ROX (ВКО)	Нәтиже
–	–	+	<b>16, 18 гентиптердегі АПВ анықталмады</b>
+	–	+	<b>16 гентипті АПВ анықталды</b>
+	–	–	
–	+	+	<b>18 гентипті АПВ анықталды</b>
–	+	–	
+	+	+	<b>16, 18 гентиптердегі АПВ анықталды</b>
+	+	–	
–	–	–	<b>Нәтиже нақты емес</b>

Егер 6 кестеге сәйкес амплификацияның оң бақылауы мен теріс бақылауы және ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы және теріс

бақылау үшін дұрыс нәтижелер алынған болса, ПТР-зерттеуі нәтижесі сенімді деп саналады.

6 кесте

**ПТР-зерттеуінің әртүрлі кезеңдерін бақылауға арналған нәтижелер**

Бақылау	ПТР-зерттеуінің бақыланатын кезеңі	Канал бойынша дабыл			Кейбір детекторлардың бағдарламаларында нәтиженің белгіленуі
		FAM	HEX	ROX	
Ба-	ДНҚ экстракциясы	Теріс нәтиженің шекті мәнінен төмен	Теріс нәтиженің шекті мәнінен төмен	Шекті мәннен төмен	«-» немесе «ТБ»
Б-	ПТР	Теріс нәтиженің шекті мәнінен төмен	Теріс нәтиженің шекті мәнінен төмен	Шекті мәннен төмен	«нд»
Б+	ПТР	Оң нәтиженің шекті мәнінен жоғары	Оң нәтиженің шекті мәнінен жоғары	Шекті мәннен жоғары	«+»немесе «ТБ»

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!**

1. **Күмәнді нәтижені** алған кезде тиісті үлгілердегі амплификацияны және детекцияны қайталау қажет.
2. Егер ПТР оң бақылауы (Б+) үшін FAM және/немесе HEX каналдары бойынша дабыл оң нәтиженің шекті мәнінен төмен болса, онда АПВ ДНҚ анықталмаған барлық үлгілер үшін амплификациялау және детекциялау қайталануы керек.
3. **Нақты емес нәтиже** алған кезде экстракция кезеңінен бастап, тиісті үлгілер үшін ПТР-зерттеуін қайталау қажет. Жаңартылған нақты емес мән алынған жағдайда, төменде нақты емес Бұл жағдайда барлық үлгілердің түгендеу талдауы жарамсыз болып саналады. DNҚ AR анықталған барлық Algilderden талдауын қайталау қажет, DNҚ өндіру кезеңінен бастап, ластану көзін анықтау және жою бойынша шаралар қабылдау қажет.саналады.
4. Егер ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы (Б-) және/немесе ПТР теріс бақылауы (Б-) үшін каналдардың кез келгені бойынша дабыл оң нәтиженің шекті мәнінен жоғары болса, онда бұл реактивтер мен үлгілердің ластану болуын көрсетеді. Бұл жағдайда барлық үлгілер бойынша талдау нәтижелері жарамсыз болып саналады. ДНҚ экстракциясы кезеңінен бастап, АПВ ДНҚ анықталған барлық үлгілердің талдауын қайталау талап етіледі, сондай-ақ ластану көзін анықтау және жою бойынша шаралар қабылдау қажет.

**FRT нұсқасы**

**ПТР-зерттеуін жүргізу**

ПТР-зерттеу келесі кезеңдерден тұрады:

- Зерттелетін үлгілерден ДНҚ экстракциясы.
- «Нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен амплификация жүргізу.
- Нәтижелерді талдау және интерпретациялау.

Пайдаланылған жабдыққа байланысты ПТР-зерттеуін жүргізу емшарасы жөніндегі егжей-тегжейлі ақпарат клиникалық материалдағы 16 және 18 гентиптеріндегі адам папилломасы вирустары (АПВ) ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакциясы (ПТР) әдісімен анықтауға және дифференциациялауға арналған, Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН әзірленген, «АмплиСенс® АПВ 16/18-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда баяндалған.

### **Зерттелетін үлгілерден алынған ДНҚ экстракциясы**

ДНҚ экстракциясы үшін пайдаланылған жиынтыққа нұсқаулыққа сәйкес Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынылған реагенттер жиынтықтары пайдаланылады.

ДНҚ экстракциясын алу үшін жинақтың 3 және 4 шығару түрлерін пайдаланған кезде жинаққа кіретін «ДНҚ-сорб-АМ» пайдаланылады. Жұмыс тәртібін «ДНҚ-сорб-АМ» реагенттер жиынтығын пайдаланумен ДНҚ экстракциясы» қосымшасында қараңыз.

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

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

Амплификациялауға арналған пробирканы таңдау «нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесімен пайдаланылатын амплификаторға байланысты.

Реагенттерді, ДНҚ сынамалары мен бақылау үлгілерін пробиркаларға енгізу үшін сүзгілері бар бір реттік ұштықтар пайдаланылады.

#### **А1. Подготовка пробирок для амплификации с использованием «ПТР-жиынтық» FRT нұсқасын пайдаланумен амплификациялау үшін пробиркаларды дайындау**

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

1. Зерттелетін және бақылау сынамаларын ДНҚ амплификациялау үшін АПВ 16/18 ПТР-қоспа-1-FL бар пробиркалардың қажетті санын алу керек.
2. Балауыздың беткейіне ПТР-қоспа-2-FL-red 10 мкл-ден енгізу керек, сонымен қатар ол балауызға түсіп кетпеуі және АПВ 16/18 ПТР-қоспа-1-FL-мен араласпауы керек.
3. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін немесе бақыланатын үлгілерден

экстракция нәтижесінде алынған ДНҚ сынамаларын 10 мкл-ден енгізу керек.  
4. Бақылау реакцияларын төмендегідей қою керек:

Сапалы талдау жүргізу үшін:

- а) **теріс бақылау (Б–)** – пробиркаға **10 мкл ДНҚ –буферді** енгізу керек;
- б) **оң бақылау (Б+)** – пробиркаға **10 мкл К2 АПВ 16, 18** енгізу керек;
- в) **экстракцияны теріс бақылау (Б–)** – пробиркаға ТБҮ-ден бөлінген **10 мкл** сынаманы енгізу керек.

Сандық талдау жүргізу үшін:

- а) **ПТР теріс бақылауы (Б–)** – пробиркаға **10 мкл ДНҚ –буферді** енгізу керек.
- б) **АПВ (К1, К2, К3) калибраторлары** – үш пробиркаға әрбір ДНҚ-калибраторды (**К1 АПВ 16, 18; К2 АПВ 16, 18; К3 АПВ 16, 18**) **10 мкл-ден** енгізу керек.
- в) **Экстракцияның теріс бақылауы (Б–)** – пробиркаға ТБҮ-ден бөлінген **10 мкл** сынаманы енгізу керек.

**А2. FRT-100 F нұсқадағы «ПТР-жиынтық» көмегімен амплификациялау үшін пробиркаларды дайындау**

**ДНҚ көлемін қоса – 10 мкл, реакциялық қоспаның жалпы көлемі – 25 мкл.**

1. **ПТР-қоспа-2-FRT мен полимераза (TaqF) қоспасын** дайындау керек. Ол үшін полимеразамен (TaqF) (**30 мкл**) бір пробирканың ішіндегісін **ПТР-қоспа-2-FRT (300 мкл) бар** пробиркаға толығымен апарып салу және көбік түзілуіне жол бермей, вортесте мұқият араластыру керек. Қоспаны дайындау күнін көрсетіп, пробирканы таңбалау керек.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Дайындалған қоспа 60 үлгіні зерттеуге есептелген.

2. Қоспаны 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 3 ай бойы сақтау және қажет болған кезде пайдалану керек. Реакциялық қоспаны дайындау керек (7 және 8 кестені қараңыз).

Есептеу кезінде тіпті бір үлгіні зерттеу **сапалық форматында** үш бақылау нүктесін, ал **сандық форматта** бес үш бақылау нүктесін қоюмен қатар жүретінін ескеру қажет. Бұдан басқа **артығымен** реагенттерді алып, тағы бір реакцияға есептеу керек. Есептеу әрбір ПТР қойылымына төмендегілер талап етілетіндігі бойынша жүргізіледі:

- 10 мкл **ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18;**
- 5 мкл **қоспа ПТР-қоспа-2-FRT және полимераза (TaqF).**

7 кесте

**Сапалы анықтау үшін реакциялық қоспаларды дайындау сызбасы**

Зерттелетін үлгілердің саны	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
АПВ 16/18ПТР-қоспа-1-FL, мкл	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210
Қоспа ПТР-қоспа-2-FRT	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105

және полимераза (TaqF), мкл														
Зерттелетін үлгілердің саны	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
АПВ 16/18ПТР- қоспа-1 -FL, мкл	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350
Қоспа ПТР- қоспа-2-FRT және полимераза (TaqF), мкл	110	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175

Ескертпе – Есептеу мына формулаға сәйкес үлгілер үшін берілген:  $n + 4$ , мұнда  $n$  – зерттелетін клиникалық үлгілердің саны, 4 – ПТР-зерттеу бақылаулары, олардан 1 экстракция кезеңін бақылау, 2 ПТР кезеңін бақылау және бір пробиркаға артығы.

8 кесте

#### Сандық анықтау үшін реакциялық қоспаларды дайындау сызбасы

Зерттелетін үлгілердің саны	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
АПВ 16/18 ПТР-қоспа-1- FL, мкл	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
ПТР-қоспа-2- FRT мен полимераза (TaqF) қоспасы, мкл	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115
Зерттелетін үлгілердің саны	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
АПВ 16/18 ПТР-қоспа-1 - FL, мкл	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370
ПТР-қоспа-2- FRT мен полимераза (TaqF) қоспасы, мкл	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185

Ескертпе – Есептеу мына формулаға сәйкес үлгілер үшін берілген:  $n + 6$ , мұнда  $n$  – зерттелетін клиникалық үлгілердің саны, 6 – ПТР-зерттеу бақылаулары, олардан 1 экстракция кезеңін бақылау, 4 ПТР кезеңін бақылау және бір пробиркаға артығы.

3. Зерттелетін үлгілердің және бақылаулардың ДНҚ-сын амплификациялауға арналған пробиркалардың қажетті санын таңдау керек. Әрбір пробиркаға дайындалған қоспаны **15 мкл-ден** енгізу керек.

4. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін немесе бақыланатын үлгілерден экстракция нәтижесінде алынған ДНҚ сынамаларын 10 мкл-ден енгізу керек.

5. Бақылау реакцияларын төмендегідей қою керек:

Сапалы талдау жүргізу үшін:

- а) **теріс бақылау (Б–)** – внести в пробиркаға **10 мкл ДНҚ -буфера**;
- б) **оң бақылау (Б+)** – пробиркаға **АПВ 16, 18 10 мкл К2** енгізу керек;
- в) **экстракцияның теріс бақылауы (Ба–)** – пробиркаға ТБҮ-нен бөлінген **10 мкл** сынаманы енгізу керек.

Сандық талдау жүргізу үшін:

- а) **ПТР теріс бақылауы (Б–)** – пробиркаға **10 мкл ДНҚ –буферді** енгізу керек;
- б) **АПВ калибраторлары (К1, К2, К3)** – үш пробиркаға әрбір ДНҚ-калибраторын (**К1 АПВ 16, 18; К2 АПВ 16, 18; К3 АПВ 16, 18**) **10 мкл-ден** енгізу керек.
- в) **экстракцияның теріс бақылауы (Ба–)** – пробиркаға ТБҮ-нен бөлінген **10 мкл** сынаманы енгізу керек.

## **Б. «Нақты уақыт» режимінде детекциялаумен амплификациялау жүргізу**

1. Флуоресцентті дабылдың амплификациясы мен детекциясының тиісті бағдарламасын орындау үшін «АмплиСенс-1» аспабын (нақты уақыт) режимінде детекциялау жүйесімен амплификаторды) бағдарламалау керек (9 кестені қараңыз).

### **9 кесте**

#### **«АмплиСенс-1» амплификациялау бағдарламасы**

Цикл	Роторлық типті аспаптар <sup>5</sup>			Планшетті типті аспаптар <sup>6</sup>		
	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдердің саны
1	<b>95</b>	15 мин	1	<b>95</b>	15 мин	1
2	<b>95</b>	5 с	5	<b>95</b>	5 с	5
	<b>60</b>	20 с		<b>60</b>	20 с	
	<b>72</b>	15 с		<b>72</b>	15 с	
3	<b>95</b>	5 с	40	<b>95</b>	5 с	40
	<b>60</b>	20 с флуоресц. дабылды детекция- лау		<b>60</b>	30 с флуоресц. дабылды детекциялау	
	<b>72</b>	15 с		<b>72</b>	15 с	

Флуоресцентті дабылды детекциялау флуорофорларға арналған FAM, JOE және ROX каналдары бойынша тағайындалады (басқа тесттерді бірмезгілде өткізу кезінде анықтау басқа пайдаланылатын каналдар бойынша да

<sup>5</sup> Мысалы, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q немесе оған ұқсастар.

<sup>6</sup> Мысалы, iCycler, iQ5, Mx3000P, Mx3005P, «ДТ-96» немесе оған ұқсастар.

тағайындалады).

2. Аспаптың реакциялық модулінің ұяшықтарына пробиркаларды орнату керек.
3. Флуоресценттік дабылды детекциялаумен амплификациялау бағдарламасын орындауды іске қосу керек.
4. Бағдарламаның орындалуы аяқталғаннан кейін нәтижелерді талдауға және интерпретациялауға кірісу керек.

### **Нәтижелерді талдау және интерпретациялау**

Нәтижелерді талдау проводят «нақты уақыт» режимінде детекциялаумен ПТР жүргізу үшін пайдаланылатын аспаптың бағдарламалық қамтамасыз етуінің көмегімен жүргізіледі. Флуоресценттік дабылдың жинақталу қисықтары үш канал бойынша талданады:

- флуорофорға арналған FAM каналы бойынша (немесе ұқсас, аспаптың моделіне байланысты) **16 гентиптік АПВ ДНҚ** амплификациялау өнімінің жинақталуы туралы дабыл тіркеледі,
- флуорофорға арналған JOE каналы бойынша (немесе ұқсас, аспаптың моделіне байланысты) **18 гентиптік АПВ ДНҚ** амплификациялау өнімінің жинақталуы туралы дабыл тіркеледі,
- флуорофорға арналған ROX каналы бойынша (немесе ұқсас, аспаптың моделіне байланысты) эндогендік ішкі бақылау ретінде пайдаланылатын, адам ДНҚ фрагменті амплификациялау өнімінің жинақталуы туралы дабыл тіркеледі.

Нәтижелер шекті сызықпен белгіленген тиісті деңгейде **S-тәрізді түріндегі** флуоресценцияның қисығы қиылысуының болуы (немесе болмауы) негізінде интерпретацияланады, бұл осы ДНҚ сынамасы үшін нәтижелер кестесіндегі тиісті бағандағы *Ct* шекті циклі мәнінің болуын (немесе болмауын) анықтайды.

Нәтижелерді интерпретациялау принципі келесідей:

**Сапалық анықтауды жүргізу кезінде** (10 кестені қараңыз):

- **16 гентипті** - FAM каналы бойынша нәтижелер кестесіндегі аталған сынама үшін көрсетілген шекті мәнінен аспайтын *Ct* шекті циклінің мәні анықталды;
- егер флуорофорға арналған JOE каналы бойынша нәтижелер кестесіндегі аталған сынама үшін көрсетілген шекті мәнінен аспайтын *Ct* шекті циклінің мәні анықталса, **ДНҚ АПВ 18 гентипті АПВ ДНҚ анықталады**;
- егер флуорофорға арналған FAM және JOE каналдары бойынша нәтижелер кестесіндегі аталған сынама үшін *Ct* шекті циклінің мәні анықталмаса (болмаса) немесе көрсетілген шекті мәнінен асатын болса, ал флуорофорға арналған ROX каналы бойынша нәтижелер кестесіндегі *Ct* шекті циклінің мәні көрсетілген шекті мәнінен аспаса, **16 гентипті және 18 гентипті АПВ ДНҚ анықталмайды**;

– егер аталған сынама үшін, флуорофорға арналған **ROX** каналы бойынша *Ct* шекті циклінің мәні болмаса немесе көрсетілген шекті мәнінен асатын болса, талдау нәтижесі **нақты емес**.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** *Ct* шектік мәндері реагенттер жинағына қоса берілген қосымшада көрсетілген.

10 кесте

**Зерттеу нәтижелерінің жалпы интерпретациясы**

FAM (АПВ 16)	JOE (АПВ 18)	ROX (ВКО)	Нәтиже
–	–	+	<b>16, 18 гентиптеріндегі АПВ анықталған жоқ</b>
+	–	+	<b>16 гентипті АПВ анықталды</b>
+	–	–	
–	+	+	<b>18 гентипті АПВ анықталды</b>
–	+	–	
+	+	+	<b>16,18 гентиптеріндегі АПВ анықталды</b>
+	+	–	
–	–	–	<b>Нәтиже нақты емес</b>

**Сандық анықтау жүргізу кезінде:**

*Ct* шекті циклінің мәндерінің негізінде және 16, 18 АПВ калибраторларының және адамның ДНҚ берілген мәндеріне сүйене отырып, калибрлеу түзу сызығын автоматты түрде салу және 16 гентипті АПВ ДНҚ, 18 гентипті АПВ ДНҚ және ПТР-сынамасындағы адам ДНҚ-сы көшірмелерінің мәндерін есептеу жүреді.

Алынған мәндер адамның 100 мың жасушаларына келетін 16 және/немесе 18 гентиптеріндегі АПВ ДНҚ санын есептеу үшін пайдаланылады:

$$I_g = \left[ \frac{\text{число копий ДНК ВПЧ (16 или 18)}}{\text{число копий ДНК человека}} \times 200000 \right] = I_g(\text{ВПЧ на 100 тыс. клеток})$$

Алынған нәтиже 11 кестеге сәйкес интерпретацияланады:

11 кесте

**I<sub>g</sub> алынған нәтижелерді интерпретациялау (АПВ 100 мың жасушаға)**

I <sub>g</sub> нәтижесі (100 мың жасушаларына АПВ)	Түсіндіру
<3	Клиникалық маңызы шағын
3–5	Клиникалық маңызы бар. Дисплазияны болдырмауға болмайды, дисплазия даму қаупі бар
>5	Клиникалық маңызы бар, жоғары. Дисплазия болу ықтималдығы жоғары

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!** Калибраторлар концентрациясының мәндері реагенттер жинағына қоса берілген қосымша парақта көрсетілген.

Егер 12 кестеге сәйкес калибраторлар үшін амплификацияның теріс бақылауы мен ДНҚ экстракциясының теріс бақылауының дұрыс нәтижелері алынса, ПТР-зерттеуі (сандық және сапалық тест) нәтижесі сенімді деп саналады.



## ПТР-зерттеуінің әртүрлі кезеңдері үшін нәтижелер

Бақылау	ПТР-зерттеуінің бақыланатын кезеңі	Шекті циклдің мәні, $C_t$		
		флуорофорға арналған FAM каналы бойынша	флуорофорға арналған JOE/HEX каналы бойынша	флуорофорға арналған ROX каналы бойынша
Ба–	ДНҚ экстракциясы	Мәні жоқ	Мәні жоқ	Мәні жоқ
Б–	ПТР	Мәні жоқ	Мәні жоқ	Мәні жоқ
К1, К2, К3	ПТР	Шекаралықтан кем мән анықталған	Шекаралықтан кем мән анықталған	Шекаралықтан кем мән анықталған

**Сандық тесттің нәтижелері есепке алуға жатпайды, егер:**

1. Пробиркадағы адамның ДНҚ-сы концентрациясының мәні  $10^3$  ГЭ/реакциядан кем болса (ROX/Orange каналы бойынша үлгілер үшін алынған мән): клиникалық материал жеткіліксіз алынды немесе сынаманы өңдеу кезінде жаңылысу болды. ДНҚ экстракциясы кезеңінен бастап осы сынаманы қайта орнату талап етіледі.
2. Калибрлеу түзу сызығын салу кезінде  $R^2$  корреляция коэффициенті 0,9-дан кем. ДНҚ экстракциясы кезеңінен бастап барлық сынамаларды қайта орнату талап етіледі.

**НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!**

1. ПТР кезеңінің теріс бақылауы (Б–) және/немесе экстракция кезеңінің теріс бақылауы (Ба–) үшін нәтижелер кестесінде FAM/Green, JOE/HEX/Yellow және/немесе ROX/Orange каналдар бойынша кез-келген  $C_t$  мәнінің пайда болуы реактивтер мен үлгілердің ластануын көрсетеді. Бұл жағдайда барлық үлгілердің талдау нәтижелері жарамсыз болып саналады. ДНҚ экстракциясы кезеңінен бастап АПВ ДНҚ анықталған барлық үлгілерді талдауды қайталау талап етіледі, сондай-ақ ластану көзін анықтау және жою бойынша шаралар қабылдау қажет.
2. Егер FAM/Green, JOE/HEX/Yellow және/немесе ROX/Orange каналдары бойынша ПТР калибраторлары (АПВ 16, 18 К1; АПВ 16, 18 К2; АПВ 16, 18 К3) үшін нәтижелер кестесіндегі  $C_t$  мәні жоқ немесе шекаралық мәндер асатын болса, қоздырғыштың ДНҚ-сы шекаралық мәндері анықталмаған барлық үлгілер үшін амплификацияны қайталау қажет. Егер осы үлгі үшін  $C_t$  шекті циклінің мәні анықталмаса немесе FAM/Green және/немесе JOE/HEX/Yellow каналдар бойынша шекті мәннен  $C_t$  мәні асып кетсе, ал ROX/Orange каналы бойынша шекаралықтан асатын  $C_t$  шекті мәні алынды, экстракция кезеңінен бастап қайтадан талдау жүргізу керек. Мүмкін себебі – ДНҚ жоғалуына немесе ПТР тежегіштерінің болуына әкелетін клиникалық материалды дайындау рәсіміндегі қате.

## Қысқарту тізімі

Осы нұсқаулықта келесі қысқартылған сөздер мен мәндері қолданылады:

ІБҮ	- ішкі бақылау үлгісі (адам $\beta$ -глобинді генін аймағы)
АПВ	- адам папилломасы вирусы
ДНҚ	- дезоксирибонуклеин қышқылы
Б+	- ПТР оң бақылауы
Б-	- ПТР теріс бақылауы
Ба-	- экстракциясының теріс бақылауы
ТБҮ	- теріс бақылау үлгісі
ОБҮ	- оң бақылау үлгісі
ПТР	- полимеразалы тізбекті реакция
МТО	- муколитикпен тасымалдау ортасы
Роспотребнадзор эпидемиология ФЗИ ФБУН	- Тұтынушылардың құқықтарын қорғау және адамның әл-ауқаты саласындағы қадағалау жөніндегі федералды қызметі «Эпидемиология орталық ғылыми-зерттеу институты» Федералды бюджеттік ғылым мекемесі
FER	- «ақырғы нүкте» бойынша флуоресценттік детекция
FRT	- «нақты уақыт» режимінде флуоресценттік детекция

### Сақтау шарттары

«ДНҚ-сорб-АМ» реагенттер жиынтығын 2 °С-ден 25 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. «ПТР-жиынтық» FER нұсқадағы және FRT нұсқадағы реагенттер жиынтығын 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. «ПТР-жиынтық» FER-100 F нұсқадағы және FRT-100 F нұсқадағы 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек (полимераза (TaqF), ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18 және ПТР-қоспа-2-FRT қоспағанда). Полимераза (TaqF), ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18 және ПТР-қоспа-2-FRT -16 °С-ден аспайтын температурада сақтау керек. ПТР-қоспа-1-FL АПВ 16/18 жарықтан қорғалған жерде сақтау керек.

### Тасымалдау

Реагенттер жинағын 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 5 тәуліктен асырмай тасымалдау керек.

### Босатылу шарттары

Емдеу-профилактикалық және санитарлық-профилактикалық мекемелерге арналған.

### 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 өнімдерінде пайдаланылатын символдар

	Каталогтағы нөмірі		Сақ болыңыз! Ілеспе құжаттамаға жүгініңіз
	Партия коды		Тесттердің ең көп саны
	In vitro диагностикаға арналған бұйым		дейін пайдалану керек
	Өзгерген күні		Пайдалану жөніндегі нұсқаулыққа жүгініңіз
	Температураның шектемесі		Күн сәулесінің түсуіне жол бермеу керек
	Температураның жоғары шектемесі		Дайындалған күні
	Өндіруші		

### Осыған сәйкес медициналық мақсаттағы бұйым өндірілген нормативтік құжат

Клиникалық материалдағы 16 және 18 гентиптеріндегі адам папилломасы вирустары (АПВ) ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакциясы (ПТР) әдісімен анықтауға және дифференциациялауға арналған «АмплиСенс® АПВ 16/18-FL» реагенттер жинағы.

Техникалық шарттары ТШ 9398-063-01897593-2012.

### Өндіруші

Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН (111123, Мәскеу қ-сы, Новогиреевская 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 қатысты шағымдарды дайындаушы кәсіпорынға Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН (111123, Мәскеу қ-сы, Новогиреевская к-сі, 3а үй) шағымдармен жұмыс істейтін және оқуды ұйымдастыратын бөлімге жіберу керек (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 тұтынушы сауалнамасын толтырып, [www.amplisens.ru](http://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 ауылы,  
(Аэропорт), тел./факс 8 (727) 331-31-47  
E-mail [info@kb-diagnostic.kz](mailto:info@kb-diagnostic.kz)

## ҚОСЫМША

### «ДНҚ-сорб-АМ» РЕАГЕНТТЕР ЖИЫНТЫҒЫН ПАЙДАЛАНУМЕН ДНҚ ЭКСТРАКЦИЯСЫ

#### Жұмыс тәртібі

1. Лизирлейтін ерітінді (егер ол 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақталса) 65 °С температурада кристалдар толығымен ерігенше араластырып, қыздыру керек.
2. Реагенттерді қосу.

#### 1 тәсіл:

- көлемі **1,5 мл** бір реттік пробиркалардың қажетті санын таңдау керек (экстракцияның теріс бақылауын қоса).
- **Әмбебап сорбентті** гомогенді консистенцияға дейін қайтадан суспензиялау, сүзгісі бар ұштықтарды пайдаланып, әрбір пробиркаға лизирлейтін ерітіндіні **300 мкл**-ден және әмбебап сорбентті **20 мкл**-ден енгізу керек. Пробиркаларды таңбалау керек.

#### 2 тәсіл:

- жұмыс басталар алдында лизирлейтін ерітіндісі бар құтыға алдын ала гомогенделген әмбебап сорбенттің бүкіл көлемін (30 мл-ге лизирлейтін ерітіндіге 2 мл) қосып, араластыру керек. Алынған қоспаны бөлме температурасында 2 тәулік бойы сақтауға рұқсат етіледі. Қолданар алдында жақсылап араластыру керек.
  - Көлемі **1,5 мл** (экстракцияның теріс бақылауын қоса) бір реттік пробиркалардың қажетті санын таңдау және сүзгісімен ұштықты пайдаланып, **лизирлейтін ерітінді** мен **әмбебап сорбенттің** дайындалған қоспасын **320 мкл**-ден әрбір пробиркаға енгізу керек. Пробирканы таңбалау керек.
3. Таңбалауға сәйкес пробиркаға әрбір сынамаға сүзгісімен жеке ұштықты пайдаланып, сынаманы **100 мкл**-ден енгізу керек. Экстракцияның теріс бақылауымен (Ба–) пробиркаға сүзгісімен ұштықты пайдаланып, **100 мкл ТБҮ** енгізу керек.
  4. Пробиркалардың ішіндегісін вортексте мұқият араластыру және **65 °С температурадағы** термостатта **5 минут** инкубациялау керек. Инкубациялау аяқталғаннан кейін вортексте араластыру және штативке **2 минутқа** қою керек.
  5. Әмбебап сорбентті пробиркаларға центрифугалау арқылы **30 секунд бойы минутына 10 мың айналым** кезінде тұндыру керек. Әр сынама үшін сүзгісіз бөлек ұштықты пайдаланып, әмбебап сорбентті ұстамай, вакуумды сорғыштың көмегімен колба-қақпанға тұнба үстіндегі сұйықтықты алып тастау керек.
  6. Сынамаларға **шайғыш ерітіндіні 1 мл**-ден қосып, әмбебап сорбент толығымен қайта суспензияланғанша вортексте араластыру керек.
  7. 5 тармақты қайталау керек.

8. Әмбебап сорбентті кептіру үшін пробиркаларды **65 °С** температурадағы термостатқа **5-10 минутқа** қою керек. Сонымен бірге пробиркалардың қақпақтары ашық болуы керек.
9. Пробиркаларға **ДНҚ элюциясы үшін ТЕ-буферді 100 мкл-ден** қосу керек. Әмбебап сорбентті толығымен қайта суспензияланғанша вортексте араластыру керек. **65 °С** температурадағы термостатқа **5 минутқа** қою керек.
10. Вортексте араластыру керек. Пробиркаларды микроцентрифугада **1 минут бойы минутына 12 мың айналым** кезінде центрифугалау керек. Тұнба үстіндегі сұйықтықта тазартылған ДНҚ бар. Сынамалар ПТР қойылымына дайын.

**Алынған ДНҚ сынамалары 1 апта бойы 2 °С-ден 8 °С-ге температурада және бір жыл бойы минус -16 °С-ден аспайтын температурада сақтауға болады.**

ДНҚ сынамаларымен пробиркаларды амплификация аймағына ауыстырылады.