

**Қазақстан Республикасы
Денсаулық сақтау министрлігі
Фармация комитеті Төрағасының
2018 жылғы “11” Мамыр
№N014947 бұйрығымен
БЕКІТІЛГЕН**

**Медициналық мақсаттағы бұйымды
медицинада қолдану жөніндегі нұсқаулық**

Медициналық мақсаттағы бұйымның атауы

Гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus A*) типтендіруге (H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіруге) арналған «АмплиСенс® *Influenza virus A-типі-FL*» реагенттер жинағы, **ФЕР** немесе **FRT** нұсқалары

Бұйымның құрамы мен сипаттамасы

Тағайындалуы

«АмплиСенс® *Influenza virus A-типі-FL*» реагенттер жинағы тұмау вирустарының өсіріндісіндегі және А тұмау вирустарының РНҚ бар клиникалық материалдағы гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus A*) типтендіруге (H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіруге) арналған.

ПТР жүргізуге арналған материал ретінде келесі клиникалық материалдың: мұрын қуысынан және ауыз жұтқыншақтан жағындылардың, қақырықтардың (немесе трахеядан аспираттардың), *Influenza virus A* РНҚ анықталған секциялық материалдың үлгілерінен алынған кДНК сынамалары пайдаланылады.

РНҚ/ДНК экстракциялау және кДНК алу үшін Ресейтұтынуқадағалау “Эпидемиология ОҒЗИ” ФБҒМ ұсынған реагенттер жинағы пайдаланылады.

Реагенттер жинағын «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*» реагенттер жинағымен клиникалық материалды немесе вирустардың өсірінділерін зерттеу үдерісінде *Influenza virus A* РНҚ анықталған кДНК үлгілерін талдау үшін пайдалану ұсынылады.

Әдіс принципі

Толық талдау үш сатыны: клиникалық материал үлгілерінен РНҚ/ДНК экстракциялауды (бөліп алуды), РНҚ кері транскрипциясы реакциясында кДНК үлгісін алуды, флуоресцентті-таңбаланған олигонуклеотидті зондтардың қатысуымен тұмау вирустарының

гемагглютинині мен нейраминидазасы гендерінің учаскелерін ПТР-амплификациялауды және тікелей ПТР барысында (FRT нұсқасы) немесе оны аяқтағаннан кейін (FER нұсқасы) жүргізілетін флуоресценттік сигналды детекциялауды қамтиды.

Клиникалық материалдан тұмау вирустарының нуклеинді қышқылдарын экстракциялау ішкі бақылау үлгісін (ІБҮ STI-rec) қатыстырыла отырып жүргізіледі, оны пайдалану әрбір үлгі үшін зерттеу іс-шараларын орындау сапасын бақылауға мүмкіндік береді.

Талдамалық сипаттамасы

Талдамалық сезімталдық

РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған жиынтық	Клиникалық материалдың түрі	Тасымалдау ортасы	Амплификация мен детекцияға арналған жиынтық	Талдамалық сезімталдық
«РИБО-преп»	Мұрын қуысынан және ауыз жұтқыншақтан алынған жағындылар	«Респираторлық жағындыларға арналған тасымалдау ортасы»	«ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы	1x10 ³ көшірме/мл
	Мұрын қуысынан және ауыз жұтқыншақтан алынған жағындылар	«Респираторлық жағындыларға арналған тасымалдау ортасы»	«ПТР-жиынтық» FER нұсқасы	1x10 ³ көшірме/мл
«РИБО-сорб»	Мұрын қуысынан және ауыз жұтқыншақтан алынған жағындылар	«Респираторлық жағындыларға арналған тасымалдау ортасы»	«ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы	1x10 ³ көшірме/мл
	Мұрын қуысынан және ауыз жұтқыншақтан алынған жағындылар	«Респираторлық жағындыларға арналған тасымалдау ортасы»	«ПТР-жиынтық» FER нұсқасы	1x10 ³ көшірме/мл

Талдамалық спецификалығы

Реагенттер жинағы А/Н1N1 және А/Н3N2 тұмау вирустарының эпидемиялық штамдарының гемагглютинині мен нейраминидазасы гендерінің фрагменттерін анықтайды. Реагенттер жинағының спецификалық белсенділігі 1977 жылдан 2008 жылға дейін РФ-нда, Украина және Беларусь Республикаларында, сондай-ақ амплификация фрагменттерін секвенирлеу әдісімен кейін расталуымен клиникалық

материалды зерттеу кезінде ерекшеленген эталонды штаммдарды және А/Н1N1 эпидемиялық тұмау вирустарының 26 изолятын, А/Н3N2 эпидемиялық тұмау вирустарының 23 изолятын зерттеу кезінде дәлелденді.

Н13, Н9, Н8N4, Н2N3, Н2N9, N8, Н4N6, Н11N6, Н12N5, Н6, Н10N7, Н5N3, Н7, Н5, Н5N3 субтиптерінің А тұмау вирустарының, Ямагата және Виктория желісінің В тобы вирустарының, гемагглютинині мен нейраминидазасы гендерінің фрагменттеріне, сондай-ақ адамның ЖРА негізгі қоздырғыштарының штаммдары мен изоляттарының кДНК/ДНҚ-на, адамның мұрын қуысы мен ауыз жұтқыншақ бөлімінің қалыпты микрофлорасына және адамның кДНК/ДНҚ-на қатысты жинақ компоненттері белсенділігінің болмауы көрсетілген.

Influenza virus A H1N1 ПТР-қоспасымен-1-FER/FRT реакциясында А/Н1N1 (sw2009) (А/California/04/2009(Н1N1)) нұсқасының тұмау вирусының изоляттарын зерттеу кезінде 1 типті гемагглютининді сәйкестендіру бойынша оң реакция және 1 типті нейраминидазаны сәйкестендіру бойынша теріс реакция байқалады, бұл «Н1N1 субтипті эпидемиялық тұмау вирусы сәйкестендірілмеді (анықталмады)» дегенді білдіреді.

Жинақ құрамы

FER НҰСҚАСЫ

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FER нұсқасы – «соңғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар ДНҚ Influenza virus A H1N1 және H3N2 субтиптерін амплификациялауға және сәйкестендіруге арналған реагенттер жиынтығында мыналар бар:

Реактив	Сипаттамасы	Көлемі, мл	саны
ПТР-қоспа-1-FER/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i> балауыз астына тамызылған	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,008	Сыйымдылығы 0,5 немесе 0,2 мл 55 пробирка
ПТР-қоспа-1-FER/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i> балауыз астына тамызылған	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,008	Сыйымдылығы 0,5 немесе 0,2 мл 55 пробирка
ПТР-қоспа -2-FL	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,77	1 пробирка
ПТР-қоспа -Фон	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка
ПТР арналған минералды майлар	Түссіз тұтқыр сұйықтық	4,0	1 құты
ОБУ кДНК <i>Influenza virus A H1N1</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	1 пробирка
ОБУ кДНК <i>Influenza virus A H3N2</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	1 пробирка
ОБУ STI	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	1 пробирка
TE-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 55 реакциясын жүргізуге есептелген.

Реагенттер жиынтығына қосымша экстракция кезеңіндегі бақылау үлгілері қоса беріледі:

Реактив	Сипаттамасы	Көлемі, мл	Саны
ТБУ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка
ІБУ STI-rec	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,12	5 пробирка

FRT НҰСҚАСЫ

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы **FRT нұсқасы** – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар кДНК Influenza virus A H1N1 және H3N2 субтиптерін амплификациялауға және сәйкестендіруге арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

Реактив	Сипаттамасы	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i> балауыз астына тамызылған	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,008	Сыйымдылығы 0,2 мл 55 пробирка
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i> балауыз астына тамызылған	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,008	Сыйымдылығы 0,2 мл 55 пробирка
ПТР-қоспа-2-FL	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,77	1 пробирка
ОБУ кДНК <i>Influenza virus A H1N1</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	1 пробирка
ОБУ кДНК <i>Influenza virus A H3N2</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	1 пробирка
ОБУ STI	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 55 реакциясын жүргізуге есептелген.

Реагенттер жиынтығына қосымша экстракция кезеңінің бақылау үлгілері беріледі:

Реактив	Сипаттамасы	Көлемі, мл	Саны
ТБУ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка
ІБУ STI-rec	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,12	5 пробирка

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы **FRT-100 F нұсқасы** – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар ДНҚ Influenza virus A H1N1 және H3N2 субтиптерін ПТР-амплификациялауға және сәйкестендіруге арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

Реактив	Сипаттамасы	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H1N1</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,12	10 пробирка
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H3N2</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,12	10 пробирка
ПТР-қоспа-2-FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,6	2 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,06	2 пробирка
ОБУ кДНҚ <i>Influenza virus A H1N1</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	2 пробирка
ОБУ кДНҚ <i>Influenza virus A H3N2</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	2 пробирка
ОБУ STI	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	2 пробирка
TE-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,0	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 100 реакциясын жүргізуге есептелген.

Реагенттер жиынтығына қосымша бөлініп алыну кезеңінің бақылау үлгілері беріледі:

Реактив	Сипаттамасы	Көлемі, мл	Саны
ТБУ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	2 пробирка
ІБУ STI-rec	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,12	10 пробирка

Қолданылу саласы

Клиникалық зертханалық диагностика.

Жиынтықталым

«АмплиСенс® *Influenza virus A-тип-FL*» реагенттер жиынтығы FEP және FRT екі нұсқада жиынтықталымның мынадай түрінде шығарылады:

Жиынтықталым түрі	FEP формат	FRT формат
1 түрі	«ПТР-жиынтық» FEP нұсқадағы (0,5 мл пробиркалар) реагенттер жиынтығы.	«ПТР-жиынтық» FRT нұсқадағы (0,2 мл пробиркалар) реагенттер жиынтығы
2 түрі	«ПТР-жиынтық» FEP нұсқадағы (0,2 мл пробиркалар) реагенттер жиынтығы	«ПТР-жиынтық» FRT-100 F нұсқадағы реагенттер жиынтығы
3 түрі	FEP нұсқадағы «АмплиСенс® <i>Influenza virus A-тип-FL</i> » жинақ жиынтықталымына арналған топтама реагенттер	FRT нұсқадағы «АмплиСенс® <i>Influenza virus A-тип-FL</i> » жинақ жиынтықталымына арналған топтама реагенттер

ҒЕР нұсқасы

Жиынтықталымның түрлері «соңғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен кДНҚ амплификациясын жүргізуге арналған және әртүрлі типтегі амплификаторларға арналған, сыйымдылығы әртүрлі пробиркалармен өзгешеленеді. Толық ПТР-зерттеу жүргізу үшін Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған РНҚ/ДНҚ экстракциялауға және кДНҚ алуға арналған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет.

FRT нұсқасы

Жиынтықталымның түрлері «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен кДНҚ амплификациясын жүргізуге арналған. «ПТР-жиынтық» FRT нұсқадағы (0,2 мл пробиркалар) жиынтықталым түрлері амплификацияға арналған пробиркаларда шығарылады. «ПТР-жиынтық» FRT-100 F нұсқадағы жиынтықталым түрлерінде амплификацияға арналған пробиркалар жоқ.

Толық ПТР-зерттеу жүргізу үшін Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған РНҚ/ДНҚ экстракциялауға және кДНҚ алуға арналған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет.

Сақтық шаралары

Жұмыс клиникалық материалда инфекциялық аурулар қоздырғыштарының бар екендігін анықтайтын молекулярлы-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 ЭН 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:

- Зертханалық үдеріс бірбағытты болуы керек. Талдау нормативтік базаға сәйкес ұйымдастырылған жеке бөлмелерде (аймақтарда) жүргізіледі.
- 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 олармен манипуляция жүргізу.
- Жұмысты нормативтік құжаттарда ұсынылған жеке қорғаныс құралдарымен жүргізу.
- Төгілген үлгілер немесе 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;

- Пайдаланылмаған реактивтерді СЕ 2.1.7.728-99 «Емдеу-профилактикалық мекемелерінің қалдықтарын жинау, сақтау және жою ережелеріне» сәйкес жою;
- Талдау алдында мұздатып-қатырылған күйде сақталған реагенттердің қажетті санын бөлме температурасында толығымен жібіту керек. Жібігеннен кейін пробиркалардың ішіндегісін вортексте орналастырып және қақпақтарының ішкі бетінен тамшыларды жою үшін центрифугалау керек.
- Нуклеинді қышқылдарды экстракциялау кезінде центрифугалаудан кейін супернатантты алып қою сатысынан басқа, барлық сатыларда автоматты дозаторларға арналған сүзгісі бар ұштықтарды пайдалану керек. Әрбір үлгі үшін жаңа ұштықты пайдалану керек;
- Нуклеинді қышқылдарды экстракциялау сатысында үлгілердің контаминациялануын болдырмау мақсатында пробиркаларды ашар алдында пробиркалардың қақпақтарының ішкі бетінен сұйықтықтардың тамшыларын жою үшін қысқа уақыт центрифугалау жүргізу қажет.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Амплификациялаудан кейін қалдықтарды (ішінде ПТР өнімдері бар пробиркаларды) жою үшін пробиркаларды ашуға және ішіндегісін төгіп-шашуға жол берілмейді, өйткені бұл зертхана аумағының, жабдықтар мен реагенттердің ПТР өнімдерімен контаминациялануын туындатады.

- Жинақты осы нұсқаулыққа сәйкес қатаң түрде мақсаты 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.

Қосымша материалдар мен құрал-жабдықтар

Талдауға арналған материалдар жинағы

1. Респираторлық жағындыларды сақтауға және тасымалдауға арналған тасымалдау ортасы (Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ өндірісі, ТШ 9398-083-01897593-2009) – мұрын және ауызжұтқыншақ қуысынан алынған жағындыларды сақтауға арналған

реагент.

Материалды алдын ала дайындау

1. Муколизин (Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ өндірісі) – қақырыққа және тұтқыр консистенциялы аспираттарға алдын ала дайындық жүргізуге арналған реагент.

Үлгілердің РНҚ/ДНҚ экстракциялары (1 аймақ)

1. Бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – «РИБО-сорб» (ТШ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТШ 9398-071-01897593-2008) немесе Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған басқа.
2. Экстракцияға арналған қосымша материалдар мен құрал-жабдықтар – РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы нұсқаулығына сәйкес.
3. РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған автоматты станция (мысалы «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) – нуклеинді қышқылдар экстракциясына арналған автоматты станцияларды пайдаланған кезде.
4. Автоматты станцияларға арналған реактивтер және шығын материалдар жинағы (мысалы «NucliSENS® easyMAG™» (NucliSens буфер 1 экстракция үшін, NucliSens буфер 2 экстракция үшін, NucliSens буфер 3 экстракция үшін, NucliSens буфер лизис үшін, NucliSens магнеттелген силика) («bioMérieux», Франция)) – нуклеинді қышқылдар экстракциясына арналған автоматты станцияларды пайдаланған кезде.

Кері транскрипция реакцияларын жүргізу. (2 аймақ)

1. Кері транскрипция реакциясын жүргізуге арналған реагенттер жиынтығы «РЕВЕРТА-L» RT-G-mix-1 реагентімен (ТШ 9398-005-01897593-2008).

ПТР-амплификация өнімдерінің гибридизациялық-флуоресцентті детекциясын және ПТР жүргізу. (2 аймақ)

FER нұсқасы: 0,5 мл ПТР-пробиркаларына арналған бейімделген амплификатор, мысалы, «Терцик» («ДНК-Технология», Ресей) немесе 0,2 мл ПТР-пробиркаларына арналған бейімделген амплификатор, «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research», Австралия), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems», АҚШ), «MaxyGene» («Axygen», АҚШ) немесе баламалы. Флуоресцентті ПТР-детектор, мысалы, «ALA-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Ресей), немесе баламалы.

FRT нұсқа: ротор типіндегі амплификатор, мысалы, Rotor-Gene 3000 немесе 6000 (Corbett Research, Австралия) немесе амплификатор SmartCycler II (Cepheid, АҚШ) немесе баламалы.

1. ПТР-бокс (мысалы, «БАВ-ПТР-«Ламинар-С», «Ламинарлық жүйелер», Ресей).

2. Центрифуга/вортекс (мысалы, «ГЭТА-2», «Биоком», Ресей).
3. «Эппендорф» типіндегі пробиркаларға арналған термостат 25-тен 100 °С-ге дейін (мысалы, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Ресей).
4. Ауыспалы көлемнің автоматты дозаторы (5-тен 20 мкл-ге дейін, 20-дан 200 мкл-ге дейін және 50-ден 1000 мкл-ге дейін).
5. Бір реттік ұштықтар штативтерде 200 мкл дейінгі сүзгісімен.
6. Көлемі 0,2 мл немесе 0,5 мл микропробиркаларға арналған штативтер (реагенттердің пайдаланылатын жиынтықтарына сәйкес).
7. Тоңазытқыш 2-ден 8 °С-ге дейін, минус 16 °С-ден аспайтын мұздатқыш камерасымен қДНК бөлініп алынған сынамаларына арналған.
8. Жеке халат, қалпақтар, аяқ киімдер және бір реттік қолғаптар МУ 1.3.2569-09.
9. Ұштықтарды жинауға арналған ыдыс.
10. ПТР арналған аспаптар үшін нақты уақытта пробирка түбі арқылы детекциямен (мысалы, «Rotor-Gene»). 0,2 мл (жайпақ қақпақ, стриптелмеген), роторға қою үшін 36 пробиркаға ПТР үшін бір реттік полипропиленді микропробиркалар (мысалы, «Ахуген», АҚШ).
ПТР арналған аспаптар үшін нақты уақытта «SmartCycler II» («Cepheid», АҚШ). 0,025 мл-ге бір реттік полипропиленді микропробиркалар («Cepheid», АҚШ) .

Зерттелетін материалды алу, тасымалдау және сақтау

Клиникалық және секциялық материалдың сынамаларын жинау, тасымалдау және дайындау бойынша барлық жұмыстар СЕ 1.2.731-99 «Патогендігі III–IV топтағы микроорганизмдермен және гельминттермен жұмыс істеу қауіпсіздігі», СЕ 1.2.036-95 «Патогендігі I-IV топтағы микроорганизмдерді есепке алу, сақтау, беру және тасымалдау тәртібі» ережелерінің талаптарына қатаң түрде сәйкес жүзеге асырылады.

Талдау жүргізу үшін келесі клиникалық материалды пайдаланады:

- Мұрын қуысынан және ауыз жұтқыншақ бөлімінен жағындылар;
- қақырық (немесе мұрынжұтқыншақтан және кеңірдектен аспираттар);
- секциялық материал (өкпенің зақымданған бөлігінің фрагменттері).

Мұрын қуысынан жағындылар алу.

Жағындыларды мақта тампондарымен құрғақ стерильді зондтармен алады. Егер мұрын қуысында емшара алдында шырыш толып тұрса, сіңбіру ұсынылады. Мақта тампонымен зондты мұрынның сыртқы қабырғасы бойынша төменгі мұрын қойнауына дейін 2-3 см тереңдікке жеңіл қимылмен енгізеді. Содан кейін зондты сәл төмен түсіріп, төменгі мұрын қойнауына төменгі мұрын жолына енгізеді, айналма қозғалыстар жасайды және мұрынның сыртқы қабырғасын бойлай алып тастайды.

Материалды алғаннан кейін тампонды (мақта тампонымен зондтың

жұмыс бөлігін) респираторлық жағындыларды сақтау және тасымалдау үшін 500 мкл тасымалдау ортасында стерильді бір реттік пробиркаға орналастырады. Зондтың шетін ол пробирканың қақпағын тығыздап жабуға мүмкіндік беретіндей есеппен сындырып алады. Ерітіндімен және зондтың жұмыс бөлігімен пробирканы жабады.

Ауыз жұтқыншақтан жағындылар алу.

Ауыз жұтқыншақ бөлімінен жағындыларды сумен ауыз қуысын алдын ала шайғаннан кейін бадамша бездердің, таңдай доғаларының бетімен және ауыз жұтқыншақ бөлімінің артқы қабырғасынан айналма қозғалыстарымен мақталы тампондары бар құрғақ стерильді зондтармен алады.

Материалды алғаннан кейін тампонды (мақта тампонымен зондтың жұмыс бөлігін) респираторлық жағындыларды сақтау және тасымалдау үшін 500 мкл тасымалдау ортасында стерильді бір реттік пробиркаға орналастырады. Зондтың шетін ол пробирканың қақпағын тығыздап жабуға мүмкіндік беретіндей есеппен сындырып алады. Ерітіндімен және зондтың жұмыс бөлігімен пробирканы жабады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Жағындыларды жинау кезінде бір пробиркаға мұрын қуысынан және ауыз жұтқыншақ бөлімінен жағындыларды бірге салу ұсынылады. Ол үшін зондтардың жұмыс істейтін шеттерін пациенттен жағындыларды алғаннан кейін респираторлық жағындыларды сақтау және тасымалдау үшін 500 мкл тасымалдау ортасында бір пробиркаға орналастырады және бір үлгі ретінде зерттеледі.

Мұрынжұтқыншақтан және трахеядан алынатын қақырық немесе аспираттар.

Қақырықты сумен ауыз қуысын алдын ала шайғаннан кейін стерильді бір реттік контейнерлерде жинайды. Мұрынжұтқыншақтан және трахеядан аспираттарды дағдылы тәсілмен алып, стерильді бір реттік контейнерлерге орналастырады.

Жоғарыда көрсетілген материалды зерттеу жүргізуге дейін 2-ден 8 °С-ге дейін 1 тәулік немесе минус 16°С-ден аспайтын температурада 1 апта сақтауға рұқсат етіледі.

Секциялық материалды стерильді бір реттік контейнерлерге орналастырып, алған бойда бірден мұздатып-қатырады немесе 1 сағат бойы зерттейді. Материалды минус 68 °С-ден аспайтын температурада 1 жыл бойы бұдан әрі сақтауға болады. Материалды бір рет мұздатып-қатыруға жол беріледі.

РНҚ/ДНҚ экстрациялау үшін зерттелетін материалды дайындау

Сынамаларды дайындауға байланысты барлық манипуляциялар «Сақтық шаралары» бөлімінде келтірілген құжаттарға сәйкес айнымалы

көлемдердің дозалағыштарын, 1,5 мл-лік бір реттік полипропиленді пробиркаларды, сүзгілері бар ұштықтарды және басқа материалдарды қолданып жүргізіледі.

Респираторлық жолдан жағындылар. Жабық пробирканың ішіндегісін вортексте араластырып, пробирканың қақпағының ішкі бетінен тамшыларды алып тастау үшін микроцентрифугада минутына 5 мың айналым кезінде 5 секунд бойы центрифугалау керек.

Қақырық немесе трахеядан аспират. Жұмыс «МУКОЛИЗИН» реагентіне нұсқаулық бойынша орындалады. Дайындалған қақырық (100 мкл) РНҚ/ДНҚ бөліп алу үшін қолданылады. Қақырықтың қалдығын талдауды қайтадан жүргізу қажет болса мұздатып-қатырады.

Секциялық материалды стерильді фарфор шишалар және ыдыстарды қолданумен гомогендейді, содан соң стерильді физиологиялық ерітіндіде немесе фосфат буферінде 10 % суспензияны әзірлейді. Суспензияны 1,5 мл-лік пробиркаға ауыстырады және минутына 10 мың айналым кезінде 5 минут бойы центрифугалайды. Шөгіндіүстілік сұйықтықты (100 мкл) РНҚ бөліп алу үшін пайдаланады. Суспензияның қалдығын талдауды қайтадан жүргізу қажет болса мұздатып-қатырады.

FER нұсқасы

ПТР-зерттеу жүргізу

ПТР-зерттеу келесі сатылардан тұрады:

- Зерттелетін үлгілерден РНҚ/ДНҚ экстракциялау
- РНҚ кері транскрипциясының реакциясында ДНҚ үлгісін алу
- Амплификация жүргізу
- «түпкілікті нүкте» бойынша амплификация өнімдерін флуоресцентті детекциялау
- Нәтижелерді интерпретациялау.

ПТР-зерттеу жүргізу ісшарасы жөніндегі егжей-тегжейлі ақпарат пайдаланылатын жабдықтың типіне байланысты, Ресейтұтынуқадағалау «Эпидемиология ОҒЗИ» ФБҒМ әдістемелік ұсыныстарында «Гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus A*) типтендіруге (H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіруге) арналған «АмплиСенс® Influenza virus A-типi-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсыныстарында» берілген.

Зерттелетін үлгілерден РНҚ/ДНҚ экстракциялау және РНҚ кері транскрипциясының реакциясын жүргізу

РНҚ/ДНҚ экстракциялау және кері транскрипциясының реакциясын жүргізу үшін пайдаланылатын жиынтық нұсқаулығына сәйкес Ресейтұтынуқадағалау «Эпидемиология ОҒЗИ» ФБҒМ ұсынған реагенттер жинағы пайдаланылады. Әрбір клиникалық үлгіден РНҚ/ДНҚ

экстракциялау үлгісін ішкі бақылай отырып жүргізіледі (ІБҮ STI-rec). Реагенттердің ұсынылған жинағын пайдалану емшаралары Қосымшада егжей-тегжейлі сипатталған.

Амплификация жүргізу

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

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Амплификация сатысында ПТР-қоспа-1-FEP/FRT әрбір атауы үшін «Фон» 2 пробиркасы қолданылады, амплификациялаудың оң бақылаулары, ішкі бақылау үлгісін амплификациялаудың оң бақылауы және реагенттердің тазалығын және эксперименттің әрбір қойылымы кезінде оператор жұмысының ұқыптылығын бақылауға арналған амплификациялаудың теріс бақылауы. Бұдан басқа амплификация сатысында РНҚ/ДНҚ (ТБ) экстракциялау сатысының теріс бақылауы зерттеледі.

1 кесте

ПТР-қоспа-1-FEP/FRT және амплификацияның оң бақылау үлгілері атауының сәйкестігі

ПТР-қоспа-1-FEP/FRT атауы	Оң бақылау үлгілерінің атауы
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT Influenza virus A H1N1	Influenza virus A H1N1 <u>к</u> ДНҚ ОБҮ
ПТР- қоспа-1-FEP/FRT Influenza virus A H3N2	Influenza virus A H3N2 <u>к</u> ДНҚ ОБҮ

А. Амплификация үшін пробиркаларды дайындау

Амплификация үшін пробиркаларды таңдау пайдаланылатын амплификаторға байланысты болады.

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

1. Зерттелетін және бақылау сынамаларының кДНҚ амплификациялау үшін ПТР-қоспа-1-FEP/FRT тиісті атауымен 1 кестені қараңыз) пробиркалардың қажетті мөлшерін алып қою керек. Балауыз пробиркалардың түбіндегі ерітіндіні толық жабатынына көз жеткізу керек.
2. Балауыз бетіне ПТР-қоспа-2-FL 7 мкл-ден енгізу керек, бұл орайда ол балауыз астына түсіп кетпеуі және ПТР-қоспа-1-FEP/FRT араласпауы тиіс.
3. Жоғары жағынан (термостатталатын қақпақсыз амплификаторды пайдаланғанда) ПТР-ға арналған минерал майы тамшысын қосу керек.
4. ПТР-қоспа-1-FEP/FRT әрбір атауы үшін «Фонның» 2 үлгісі бойынша дайындау керек. Ол үшін ПТР-қоспасымен-1-FEP/FRT екі пробиркаға қатып қалған балауыз бетіне 17 мкл ПТР-қоспа-Фон енгізу керек, бұл орайда ол балауыз астына түсіп кетпеуі және ПТР-қоспа-1-FEP/FRT-мен араласпауы тиіс. Жоғары жағынан ПТР-ға арналған минерал майы тамшысын қосу керек.
5. Дайындалған пробиркаларға РНҚ кері транскрипциясының

реакциясында алынған кДНК сынамаларын 10 мкл-ден енгізу керек.

- б. Бақылау реакциясын қою керек (ПТР-қоспа-1-FEP/FRT әрбір атауы үшін, 1 кестені қараңыз):
 - а) ПТР теріс бақылауы (Б-) – пробиркаға 10 мкл ТЕ-буфер енгізу керек.
 - б) ПТР оң бақылауы (Б+) – пробиркаға 10 мкл кешенді ОБУ (оң бақылау үлгісін) енгізу керек.
 - в) ІБУ ПТР оң бақылауы (ІБ+) – пробиркаға 10 мкл STI ОБУ (оң бақылау үлгісін) енгізу керек.
 - г) экстракцияның (бөлінудің) теріс бақылауы (ТБ) – пробиркаға ТБҮ-нен (теріс бақылау үлгісінен) бөлініп алынған 10 мкл сынаманы енгізу керек.

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

Б. Амплификацияны жүргізу

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

2 кесте

Influenza virus A H1N1 және A H3N2 ДНК амплификациялау бағдарламасы

Белсенді реттелетін амплификаторлар (пробиркадағы ерітінді бойынша):									
«Терцик» («ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cycler (Corbett Research), MaxyGene (Axygen Scientific)				Матрицалы реттелетін амплификаторлар температуралары: Uno-2 (Biometra)		
Циклдар	Температурасы	Уақыты	Циклдар	Температурасы	Уақыты	Циклдар	Температурасы	Уақыты	Циклдар
0	95 °С	үзіліс		95 °С	үзіліс		95 °С	үзіліс	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	25 с	42
	54 °С	20 с		54 °С	25 с		54 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	25 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	сақтау		10 °С	сақтау		10 °С	сақтау	

Ескерту – Амплификаторлардың басқа модельдеріне арналған термоциклдеу бағдарламалары «Гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus A*) типтендіруге (H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіруге) арналған «АмплиСенс® *Influenza virus A*-типi-FL»

реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсыныстарында» берілген.

3. Бағдарламаны орындау аяқталысымен нәтижелер детекциясына кірісу керек.

«Соңғы нүкте» бойынша амплификация өнімдерін флуоресцентті детекциялау

Детекция флуоресцентті ПТР-детектордың көмегімен (пайдаланылатын аспап нұсқаулыққа сәйкес) **3 кестеде** көрсетілген арналар бойынша флуоресцентті сигнал қарқындылығын өлшеу жолымен жүргізіледі.

3 кесте

ПТР-қоспа-1-FEP/FRT және детекция арналары атауының сәйкестігі

ПТР-қоспа-1-FEP/FRT атауы	Арна бойындағы детекция		
	FAM	HEX	ROX
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	STI ІБҮ және ОБҮ	<i>Influenza virus A</i> H1	<i>Influenza virus A</i> N1
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	STI ІБҮ және ОБҮ	<i>Influenza virus A</i> H3	<i>Influenza virus A</i> N2

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! ПТР-детектордың бағдарламалық қамтамасыз етуінде детекциялау жүргізгенге дейін тиісті түзетулер енгізіліп, сақталуы тиіс – реагенттер жинағына қосымша бетті және Ресейтұтынуқадағалау «Эпидемиология ОҒЗИ» ФБҒМ әдістемелік ұсыныстарында «Гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus A*) типтендіруге (H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіруге) арналған «АмплиСенс® *Influenza virus A*-типi-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсыныстарын» қараңыз.

Нәтижелерді интерпретациялау

Алынған нәтижелер бақылау үлгілеріне және клиникалық үлгілерден бөлінген қДНҚ сынамаларына арналған тиісті арналар бойынша фонға қатысты флуоресцентті сигналдың деңгейі туралы деректердің негізінде интерпретацияланады. Интерпретация пайдаланылатын аспаптың бағдарламалық қамтамасыз етуі көмегімен автоматты түрде жүргізіледі. Нәтижелерді интерпретациялау принципі келесідегідей:

- Егер осы сынама үшін тиісті арна бойынша сигнал (**3 кестені қараңыз**) оң нәтиженің белгіленген шектік мәнінен жоғары болса, ізделіп отырған ген-нысаналар фрагменті анықталғаны.
- Егер осы сынама үшін тиісті арна бойынша сигнал (**3 кестені қараңыз**) теріс нәтиженің белгіленген шектік мәнінен төмен, ал FAM (ІБҮ) арнасы бойынша сигнал белгіленген шектік мәннен жоғары болса, ізделіп отырған ген-нысаналар фрагменті анықталмағаны.

Амплификацияның оң және теріс бақылаулары мен РНҚ/ДНҚ экстракциясының теріс бақылауы үшін **4 кестеге** сәйкес дұрыс нәтижелер алынса, ПТР-зерттеу нәтижесі нақты болып есептеледі.

Бақылау үлгілерін талдау нәтижелері

Бақылау	ПТР-зерттеудің бақыланатын сатысы	Арна бойындағы сигнал		
		ФАМ	HEX	ROX
		ІБҮ детекциясы	Ген-нысана детекциясы (N1/N3)	Ген-нысана детекциясы (N1/N2)
ТБ	РНҚ экстракциясы	Шектік мәннен <u>жоғары</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>
Б-	ПТР	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>
ІБ+	ПТР	Шектік мәннен <u>жоғары</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>
Б+	ПТР	Теріс нәтиженің шектік мәнінен <u>төмен</u>	<u>ОБҮ әрбір үлгісі үшін шектер қосымша бетте көрсетілген.</u>	<u>ОБҮ әрбір үлгісі үшін шектер қосымша бетте көрсетілген.</u>

Зерттелетін үлгіде егер HEX арнасы бойынша флуоресценция деңгейі шектік мәннен жоғары болса, N1 субтипi (немесе A/N3) A тұмау вирусы сәйкестендірілген.

Зерттелетін үлгіде егер ROX арнасы бойынша флуоресценция деңгейі шектік мәннен жоғары болса, A/N1 (немесе A/N2) тұмау вирусы сәйкестендірілген.

Егер зерттелетін үлгіде арналардың (HEX және ROX) екеуі немесе бірі бойынша флуоресценцияның деңгейі теріс нәтиженің шектік мәнінен төмен, ал ІБҮ бойынша сигналдың деңгейі ІБҮ детекциялау үшін (ФАМ арнасы) шектік мәннен жоғары болса, бұл үлгіде эпидемиялық тұмау вирусының A/N1N1 (немесе A/N3N2) берілген субтипi сәйкестендірілмеген (анықталмаған) болып есептеу керек.

Егер ПТР оң нәтижесі үшін (Б+) тиісті арна бойынша флуоресценцияның сигналы оң нәтиженің шектік мәнінен төмен болса, барлық теріс клиникалық үлгілер үшін амплификацияны қайталау қажет.

РНҚ/ДНҚ (ТБ) экстракциясының теріс бақылауы және/немесе ПТР (Б-) теріс бақылауы үшін ген-нысананы детекциялау сигналы оң нәтиженің шектік мәнінен жоғары болса, мүмкін болатын ластану салдарын жою үшін экстракциялау сатысынан бастап берілген ген-нысана анықталған барлық үлгілерді зерттеуді қайталау қажет.

Егер берілген сынама үшін берілген ген-нысананы детекциялауға арналған тиісті арна бойынша сигнал (3 кестені қараңыз) теріс нәтиженің белгіленген шектік мәнінен төмен болса және ІБҮ (ФАМ) детекциясының арнасы бойынша сигнал белгіленген шектік мәннен төмен болса, талдау нәтижесі **нақты емес**. «Б-» үлгісі үшін барлық арналар бойынша теріс нәтиже норма болып табылады.

Егер берілген сынама үшін берілген ген-нысананы детекциялауға арналған тиісті арна бойынша сигнал (3 кестені қараңыз) теріс нәтиженің белгіленген шектік мәнінен жоғары, бірақ оң нәтиженің шектік мәнінен төмен болса (сигнал шектік мәндердің арасында болады), талдау нәтижесі **күмәнді** болады.

Егер сынама үшін **нақты емес** немесе **күмәнді** нәтиже алынса, тиісті клиникалық үлгінің ПТР-зерттеуін РНҚ/ДНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайтадан жүргізу талап етіледі. **Нақты емес** нәтиже қайталанған кезде талдау үшін материалды қайтадан жинау ұсынылады. **Күмәнді** нәтиже қайталанған кезде сынаманы оң деп есептеу, **күмәнді** сынама қайтадан қойылған кезде теріс нәтиже алынса, талдау үшін материалды қайтадан жинау ұсынылуы керек.

FRT нұсқасы

ПТР-зерттеу жүргізу

ПТР-зерттеу келесі сатылардан тұрады :

- Зерттелетін үлгілерден РНҚ/ДНҚ экстракциялау.
- РНҚ кері транскрипция реакциясында кДНҚ үлгісін алу.
- «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциямен ПТР-амплификациясын жүргізу.
- Нәтижелерді талдау және интерпретациялау.

ПТР-зерттеу жүргізу ісшарасы жөніндегі егжей-тегжейлі ақпарат пайдаланылатын жабдыққа байланысты, Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ «АмплиСенс® *Influenza virus* А-типi-FL гибридизациялық-флуоресцентті детекциясымен полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus* А) типтеуге арналған реагенттер жинағын қолдану жөніндегі Әдістемелік ұсынымдар».

Зерттелетін үлгілерден РНҚ/ДНҚ экстракциялау және РНҚ кері транскрипция реакциясын жүргізу

РНҚ/ДНҚ экстракциялау үшін және кері транскрипция реакциясын жүргізу үшін Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жиынтығы пайдаланылады. Әр клиникалық үлгіден РНҚ/ДНҚ экстракциялау ішкі бақылау үлгісі (**ІБҮ STI-rec**) бар жерде жүргізіледі. Ұсынылған реагенттер жинақтарын пайдалану емшаралары **Қосымшада** егжей-тегжейлі сипатталған.

«Нақты уақыт» режимінде детекциясымен амплификация жүргізу

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Реакцияның әрбір қойылымы кезінде амплификация сатысында амплификацияның оң бақылауы (**5 кестені қараңыз**) оң бақылаулар, ішкі бақылау үлгісі амплификациясының оң бақылауы және реагенттердің тазалығын және оператор жұмысының

ұқыптылығын бақылауға арналған амплификацияның теріс бақылауы пайдаланылады. Бұдан басқа амплификация сатысында РНҚ/ДНҚ (ТБ) экстракциялау сатысының теріс бақылауы зерттеледі.

5 кесте

ПТР-қоспа-1-FEP/FRT және амплификацияның оң бақылау үлгілері атауының сәйкестігі

ПТР-қоспа-1-FEP/FRT атауы	Оң бақылау үлгілері атауы
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	<i>Influenza virus A H1N1</i> кДНҚ ОБУ
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	<i>Influenza virus A H3N2</i> кДНҚ ОБУ

А. Амплификацияға арналған пробиркаларды дайындау

Амплификацияға арналған пробиркаларды таңдау «нақты уақыт» режимінде детекция жүйесімен пайдаланылатын амплификаторға байланысты болады.

Пробиркаларға реагенттерді, кДНҚ сынамаларды және бақылау үлгілерін енгізу үшін сүзгілері бар бір реттік ұштықтарды пайдаланады.

А1. FRT нұсқасы үшін «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығының көмегімен «нақты уақыт» режимінде детекциялаумен амплификацияны жүргізу

1. Зерттелетін және бақылау сынамаларының кДНҚ амплификациялау үшін тиісті атаудың (5 кестені қараңыз) ПТР-қоспа-1-FEP/FRT бар пробиркалардың қажетті санын алып қою керек. Балауыз пробиркалардың түбіндегі ерітіндіні толық жабатынына көз жеткізу керек.
2. Балауыздың бетіне 7 мкл-ден ПТР-қоспа-2-FL енгізу керек, бұл орайда ол балауыздың астына түсіп кетпеуі және ПТР-қоспа-1-FEP/FRT-мен араласпауы тиіс.
3. Дайындалған пробиркаларға РНҚ кері транскрипциясының реакциясында алынған кДНҚ сынамаларын 10 мкл-ден енгізу керек.
4. Бақылау реакцияларын қою керек (ПТР-қоспа-1-FEP/FRT әрбір атауы үшін, 5 кестені қараңыз):
 - а) ПТР теріс бақылауы (Б-) – пробиркаға 10 мкл ТЕ-буфер енгізу керек.
 - б) ПТР оң бақылауы (Б+) – пробиркаға 10 мкл ОБУ енгізу керек (5 кестені қараңыз).
 - в) ІБУ ПТР оң бақылауы (ІБ+) – пробиркаға 10 мкл STI ОБУ енгізу керек.
 - г) экстракциялаудың (бөліп алудың) теріс бақылауы (ТБ) – пробиркаға ТБҮ-нен бөлінген 10 мкл сынаманы енгізу керек.
5. Пробирканың төменгі бөлігінде вортексте қысқа центрифугалаумен (1-2 с) реакциялық қоспаны шөктіру керек (планшетті типті аспаптар үшін).

6. Амплификацияның және флуоресцентті сигналды детекциялаудың тиісті бағдарламасын орындау үшін аспапты («нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесімен амплификаторды) бағдарламалау керек (6 кестені қараңыз).

6 кесте

Influenza virus A H1N1 және A H3N2 ДНҚ-на амплификация бағдарламасы FRT нұсқасы

Циклдар	Роторлы типтегі аспаптар ¹		
	Температурасы, °C	Уақыты	Циклдар қайталануының саны
1	95	5 мин	1
2	95	10 с	10
	54	20 с	
	72	10 с	
3	95	10 с	35
	54	20 с флуоресц. сигналдың детекциясы	
	72	10 с	

Флуоресцентті сигналдың детекциясы FAM/Green, JOE/Yellow/HEX және ROX/Orange флуорофорларына арналған арналар бойымен тағайындалады.

7. Пробиркаларды аспаптың реакциялық модульдерінің ұяшықтарына орнату керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіру бойынша реакцияларын бірмезгілде қоюға болмайды.

8. Флуоресцентті сигналды детекциялаумен амплификациялау бағдарламасының орындалуын іске қосу керек.
9. Бағдарламаны орындау аяқталысымен нәтижелерді талдауға және интерпретациялауға кірісу керек.

A2. FRT-100 F нұсқасы үшін «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығының көмегімен «нақты уақыт» режимінде детекциялаумен амплификацияны жүргізу

1. Тиісті атаудың (5 кестені қараңыз) ПТР-қоспа-1-FER/FRT (F), ПТР-қоспа-2-FRT және полимераза (TaqF) бар пробиркалардың қажетті санын еріту керек. ПТР-қоспа-1-FER/FRT (F), ПТР-қоспа-2-FRT және полимераза (TaqF) бар пробиркалардың ішіндегісін араластырып, центрифуга/вортекстің көмегімен қысқа уақыт центрифугалау арқылы (1-2 с) тамшыларды шөктіру керек.
2. Зерттелетін және бақылау сынамаларының кДНҚ амплификациясы үшін пробиркалардың немесе стриптердің қажетті санын алып қою керек.
3. N реакцияларды жүргізу үшін $10 \cdot (N+1)$ мкл тиісті атаудың (5 кестені қараңыз) ПТР-қоспаны-1-FER/FRT (F), $5,0 \cdot (N+1)$ мкл ПТР-қоспаны-

¹ мысалы, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» немесе ұқсасы

2-FRT және 0,5*(N+1) мкл полимеразаны (TaqF) жеке пробиркада араластыру керек.

4. Вортексте дайындалған қоспаны араластыру және центрифуганын/вортекстің көмегімен қысқа уақыт центрифугалау арқылы тамшыларды шөктіру керек.
5. Әрбір пробиркаға дайындалған қоспаны **15 мкл**-ден енгізу керек.
6. Дайындалған пробиркаларға **РНҚ кері транскрипциясының реакциясында алынған кДНҚ сынамасын 10 мкл**-ден енгізу керек.
7. Бақылау реакцияларын қою керек (**ПТР-қоспа-1-FER/FRT (F) әрбір атауы үшін, 5 кестені қараңыз**):
 - а) **ПТР теріс бақылауы (Б-)** – пробиркаға **10 мкл ТЕ-буфер** енгізу керек.
 - б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **10 мкл ОБУ** енгізу керек (5 кестені қараңыз).
 - в) **ІБҮ ПТР оң бақылауы (ІБ+)** – пробиркаға **10 мкл STI ОБУ** енгізу керек.
 - г) **экстракцияның (бөліп алудың) теріс бақылауы (ТБ)** – пробиркаға **ТБҮ**-ден бөлініп алынған **10 мкл** сынаманы енгізу керек.
8. Smart Cycler II аспабымен жұмыс кезінде аспапқа миницентрифуганы қолданып, пробирканың төменгі бөлігіне реакциялық қоспаны шөктіру керек.
9. Амплификацияның және флуоресцентті сигналды детекциялаудың тиісті бағдарламасын орындау үшін аспапты («нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесімен амплификаторды) бағдарламалау керек (**7 кестені қараңыз**).

7 кесте

Influenza virus A H1N1 және A H3N2 кДНҚ-на амплификация бағдарламасы FRT-100 F нұсқа

Циклдар	Роторлы типті ² аспаптар			Smart Cycler II ³ типті аспаптар		
	Температурасы	Уақыты	Циклдар қайталануының саны	Температурасы	Уақыты	Циклдар
1	95 °C	15 мин	1	95 °C	900 с	1
2	95 °C	10 с	10	95 °C	15 с	42
	54 °C	20 с				
	72 °C	10 с				
3	95 °C	10 с	35	54 °C	25 с флуоресц. сигналдың детекциясы	42
	54 °C	20 с флуоресц. сигналдың детекциясы				
	72 °C	10 с				

² мысалы, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q немесе ұқсасы

³ мысалы, Smart Cycler II немесе ұқсасы

Флуоресцентті сигналдың детекциясы FAM/Green, JOE/Yellow/HEX және ROX/Orange флуорофорларына арналған арналар бойынша жүргізіледі.

Ескерту – амплификатордың нақты моделі үшін термоциклдеу бағдарламасы «Гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus A*) типтендіруге (H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіруге) арналған «АмплиСенс® *Influenza virus A*-типi-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсыныстарында» берілген.

10. Пробиркаларды аспаптың реакциялық модулінің ұяшықтарына орнату керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! H1N1 және H3N2 субтиптеріне сәйкестендіру бойынша реакцияларды бізмезгілде қоюға болмайды.

11. Флуоресцентті сигналды детекциялаумен амплификация бағдарламасының орындалуын іске қосу керек.

12. Бағдарламаның орындалуы аяқталысымен нәтижелерді талдауға және интерпретациялауға кірісу керек.

Нәтижелерді талдау және интерпретациялау.

Нәтижелерді талдауды «нақты уақыт» режиміндегі детекциялаумен ПТР жүргізу үшін пайдаланылатын аспапты бағдарламалық қамтамасыз етуінің көмегімен жүргізеді. Нәтижелер тиісті деңгейде белгіленген шектік сызықта **8 кестеге** сәйкес қолданылатын арналардың әрбірінде қисық флуоресценция қилысуының болуы (немесе болмауы) негізінде интерпретацияланады, нәтижелер кестесіндегі тиісті бағанда қДНК берілген сынамасы үшін «Сt» шектік циклы мәнінің болуын (немесе болмауын) анықтайды.

8 кесте

Анықталатын ген-нысаналарды детекциялау арналарының тізбесі

ПТР-қоспа-1-FEP/FRT атауы	Арна бойындағы детекция		
	FAM/Green	JOE/Yellow/Cy3	ROX/Orange/TexasRed
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ІБҮ және ОБҮ STI	<i>Influenza virus A H1</i>	<i>Influenza virus A N1</i>
ПТР-қоспа-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ІБҮ және ОБҮ STI	<i>Influenza virus A H3</i>	<i>Influenza virus A N2</i>

Нәтижелерді интерпретациялау принципі келесідегідей:

- Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесінде тиісті арна бойынша (**8 кестені қараңыз**) «Сt» шектік циклының мәні айқындалса, ген-нысананың ізделіп отырған фрагменті **анықталғаны**. Бұл орайда берілген сынама флуоресценциясының қисығы флуоресценцияның экспоненциальді жоғарылауы тән учаскедегі шектік түзуді қиып өтуі тиіс.
- Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесінде тиісті арна бойынша (**8 кестені қараңыз**) Сt шектік циклының мәні айқындалмаса (жоқ

болса) (флуоресценция қисығы шектік сызықты қиып өтпесе), ал нәтижелер кестесінде флуорофорға арналған FAM арнасы бойынша Ct шектік циклының мәні көрсетілген (шектік) мәннен аспай айқындалса, ген-нысананың ізделіп отырған фрагменті **анықталмағаны**.

Егер бақылау реакциясының нәтижелерін бағалау кестесіне сәйкес амплификацияның оң және теріс бақылаулары мен РНҚ/ДНҚ бөлінуінің теріс бақылауы үшін дұрыс нәтижелер алынса, ПТР-зерттеу нәтижесі дұрыс болып есептеледі (**9 кестені қараңыз**).

9 кесте

ПТР-зерттеудің әртүрлі сатыларын бақылауға арналған нәтижелер

Бақылау	ПТР-зерттеудің бақыланатын сатысы	Арна бойындағы сигнал		
		FAM/Green	JOE/Yellow/Cy3	ROX/Orange/Texas Red
		ІБҮ детекциясы	Ген-нысана детекциясы (N1/N3)	Ген-нысана детекциясы (N1/N2)
ТБ	РНҚ экстракциясы	Шектік мәннен төмен	<u>Анықталған жоқ</u>	<u>Анықталған жоқ</u>
Б-	ПТР	<u>Анықталған жоқ</u>	<u>Анықталған жоқ</u>	<u>Анықталған жоқ</u>
ІБ+	ПТР	Шектік мәннен төмен	<u>Анықталған жоқ</u>	<u>Анықталған жоқ</u>
Б+	ПТР	<u>Анықталған жоқ</u>	<u>ОБҮ әрбір үлгісіне арналған шектеулер қосымша бетте көрсетілген</u>	<u>ОБҮ әрбір үлгісіне арналған шектеулер қосымша бетте көрсетілген</u>

Зерттелетін үлгіде егер JOE/Yellow/Cy3 арнасы бойынша Ct мәні болса, A/N1 (немесе A/N3) тұмау вирусы сәйкестендірілген.

Зерттелетін үлгіде егер ROX/Orange/Texas Red арнасы бойынша Ct мәні болса, A/N1 (немесе A/N2) тұмау вирусы сәйкестендірілген.

Егер зерттелетін үлгіде арналардың екеуінде немесе бірінде (JOE/Yellow/Cy3 және ROX/Orange/Texas Red) Ct мәні болмаса, ал ІБҮ бойынша Ct мәні ІБҮ детекциялау үшін (FAM/Green арнасы) шектік мәннен аспаса, бұл үлгіде A/N1N1 (немесе A/N3N2) эпидемиялық тұмау вирусының A/N1N1 (немесе A/N3N2) берілген субтипін сәйкестендірілмеген (анықталмаған) болып есептеледі.

Егер ПТР оң бақылауы үшін (Б+) қандай да болсын ген-нысана детекциясының тиісті арнасы шектік циклының мәні болмаса немесе шектік мәннен асса, берілген арна бойынша барлық теріс клиникалық үлгілер үшін амплификацияны қайталау қажет.

Егер РНҚ/ДНҚ (ТБ) экстракциясының теріс бақылауы және/немесе ПТР (Б-) теріс бақылауы үшін қандай да болсын ген-нысана детекциясының арнасы бойынша Ct шектік циклының мәні анықталса, берілген ген-нысана анықталған барлық үлгілер үшін экстракциялау сатысынан бастап, мүмкін болатын ластану салдарын жою үшін зерттеуді қайталау қажет.

Егер берілген сынама ген-нысаналар детекциясы арналарының бірі бойынша Ct шектік циклының мәні анықталмаса (болмаса) (**8 кестені**

қараңыз) және ІБҮ-не (FAM) арналған арна бойынша *Ct* мәні сондай-ақ болмаса немесе көрсетілген шектік мәннен асса, талдау нәтижесі **нақты емес** болып есептеледі. Мұндай жағдайда РНК/ДНҚ экстракциялау сатысынан бастап тиісті клиникалық үлгіні ПТР-зерттеуді қайтадан жүргізу талап етіледі. Нәтижені қайталау кезінде талдау үшін материалды қайтадан жинау ұсынылады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! *Ct* шектік мәндері реагенттер жинағына қосымша бетте және Ресейтұтынуқадағалау «Эпидемиология ОҒЗИ» ФБҒМ әдістемелік ұсыныстарында «Гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus A*) типтендіруге (H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіруге) арналған «АмплиСенс® *Influenza virus A*-типi-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсыныстарында» берілген.

А ҚОСЫМША. «РИБО-сорб» реагенттерінің жиынтығын пайдаланған кезде сынамадан РНҚ экстракциялау

1. **Лизирлейтін ерітінді мен шаюға арналған ерітіндіні 1** (егер олар 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақталса) кристаллдар толығымен ерігенше 60-тан 65 °С-ге дейінгі температурада қыздыру керек.
2. Көлемі 1,5 мл бір реттік пробиркалардың қажетті мөлшерін тандап қою керек (бөлінудің теріс бақылауын қоса). Әр пробиркаға **450 мкл-ден лизирлейтін ерітіндіні және 10 мкл-ден ІБҮ STI-rec** енгізу керек. Пробиркаларды таңбалау қажет.
3. **Лизирлейтін ерітіндісі мен ІБҮ STI-rec** бар пробиркаларға аэрозольді бөгеті бар ұштықтарды пайдалана отырып, **зерттелетін сынамаларды 100 мкл-ден** енгізу керек. Бөлме температурасында 3-тен 5 мин-қа дейін инкубациялау керек.
4. Теріс бақылау (ТБ) пробиркасына бөліністің **ТБҮ 100 мкл-ін** енгізу керек.
5. Тығыз жабылған сынамаларды вортексте мұқият араластыру керек және пробирка қақпағының ішкі бетінен тамшыларды алып тастауға арналған микроцентрифугада 5 мың айн./мин кезінде 5 с бойына центрифугалау керек. Егер пробиркаларда **жүзгін** бөлшектер (толығымен ерімеген материалдар) болса, микроцентрифугада 10 мың айн./мин 1 мин бойы центрифугалаңыз және шөгіндіүстілік сұйықтықты басқа пробиркаларға құйыңыз.
6. **Сорбентті** вортексте мұқият қайта суспензиялаңыз. Әрбір пробиркаға жеке ұштықпен қайта суспензияланған **сорбентті 25 мкл-ден** тамызыңыз. Вортексте араластырыңыз, штативке 1 минутқа қойыңыз, тағы бір рет араластырыңыз және 5 минутқа қалдырыңыз.
7. Сорбентті шөктіру үшін микроцентрифугада 10 мың айн./мин 30 с бойы пробирканы центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты және әр сынама үшін жеке ұштықты пайдалана отырып, шөгіндіүстілік сұйықтықты алып тастаңыз.
8. Пробиркаларға **1 шаюға арналған 400 мкл** ерітіндіні құйыңыз. Вортексте сорбент толығымен қайта суспензияланғанша араластырыңыз, микроцентрифугада 10 мың айн./мин 30 с центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты және әр сынама үшін жеке ұштықты пайдалана отырып, шөгіндіүстілік сұйықтықты алып тастаңыз.
9. Пробиркаларға **3 шаю үшін 500 мкл ерітінді** тамызыңыз. Сорбентті вортексте мұқият қайта суспензиялаңыз. Микроцентрифугада 10 мың айн./мин 30 с центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты және әр сынама үшін жеке ұштықты пайдалана отырып, шөгіндіүстілік сұйықтықты алып тастаңыз.
10. **3 шаюға арналған ерітіндімен** 9 т. ұстана отырып шаюды қайталау керек.
11. Пробиркаларға **4 шаюға арналған ерітіндіні 400 мкл-ден** тамызыңыз. Вортексте сорбентті мұқият қайта суспензиялаңыз, микроцентрифугада

10 мың айн./мин 30 с центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, жеке ұштықпен әрбір пробиркадан шөгіндіүстілік сұйықтықты толығымен алып тастау керек.

12. Сорбентті кептіру үшін пробиркаларды температурасы 60 °С термостатқа 15 минутқа салыңыз. Сонымен бірге пробиркалар қақпағы ашық болуы тиіс.

13. Пробиркаларға аэрозольді бөгеті бар ұштықтарды пайдалана отырып, РНҚаз бос **РНҚ-буферді 50 мкл-ден** қосыңыз. Температурасы 60 °С термостатқа 2-3 минутқа салыңыз. Вортексте араластырыңыз және пробиркаларды микроцентрифугада ең жоғары айналымда (12–13 мың айн./мин) 1 минут бойы центрифугалаңыз. Шөгіндіүстілік сұйықтықта тазартылған РНҚ болады. Сынамалар кері транскрипция реакциясының қойылымына дайын.

Кері транскрипция реакциясын РНҚ-сынаманы алғаннан кейін тез арада жүргізу керек. Реакция үшін РНҚ ерітіндісін алғанда **сорбентті қоса қамтымай** өте абай болу керек. Егер сорбент бұлыңғырланып кетсе, оны центрифугада шөктіру керек.

Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 4 сағатқа дейін сақталады. Препаратты ұзақ уақыт сақтау үшін сорбентті қоса қамтымай, РНҚ ерітіндісін бөліп алу қажет, стерильді пробиркаға тамызып және минус 68 °С-ден аспайтын температурада бір жыл бойы сақтау керек.

Б ҚОСЫМША. «РИБО-преп» реагенттерінің жиынтығын пайдаланған кезде сынамадан РНҚ экстракциялау

Жұмыс тәртібі:

1. **Лизиске арналған ерітіндіні** (егер ол 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақталса) кристалдар толығымен ерігенше 65 °С температурада қыздыру керек.
2. Қақпағы тығыз жабылатын 1,5 мл бір реттік пробиркалардың қажетті мөлшерін іріктеп алыңыз (бөліп алудың теріс және оң бақылауын қоса алғанда). Әрбір пробиркаға **10 мкл ІБҮ STI-rec** және **300 мкл лизиске арналған ерітіндіні тамызыңыз**. Пробиркаларды таңбалау керек.
3. **Лизиске арналған ерітіндісі және ІБҮ STI-rec** бар пробиркаларға аэрозольді бөгеті бар ұштықтарды пайдалана отырып, **дайындалған сынаманы 100 мкл-ден тамызыңыз**. Теріс бақылау (ТБ) пробиркасына бөліндінің ТБҮ **100 мкл енгізу** керек.
4. Пробирка ішіндегісін вортексте мұқият араластырыңыз, пробирка қақпағының ішкі бетінен тамшыларды алу үшін микроцентрифугада 5 с бойы центрифугалаңыз және термостатта **65 °С-де 5 минут** қыздырыңыз.
5. **Преципитацияға арналған 400 мкл ерітіндіні** пробиркаға тамызыңыз, вортексте араластырыңыз.
6. Микроцентрифугада пробирканы **13 мың айн./мин 5 минут** бойы центрифугалаңыз.
7. Вакуумды сорғышты және әр сынама үшін **200 мкл-ге** жеке ұштықты пайдалана отырып, шөгіндіге тimestен шөгіндіүстілік сұйықтықты абайлап алыңыз.
8. Пробиркаларға **3 шаюға арналған 500 мкл ерітіндіні** тамызыңыз, қақпағын тығыз жабыңыз, пробирканы 3-5 рет аударып төңкере отырып шөгіндіні абайлап шайыңыз. Барлық пробиркалар үшін емшараны бір мезгілде жүргізуге болады, бұл үшін штативтегі пробиркалардың бетін қақпақпен немесе басқа штативпен жабу керек, оларды қысып және штативті аударып төңкеру керек.
9. Микроцентрифугада **13 мың айн./мин 1-2 минут бойы** центрифугалау керек.
10. Вакуумды сорғышты және әр сынама үшін **10 мкл-ге** жеке ұштықты пайдалана отырып, шөгіндіге тimestен шөгіндіүстілік сұйықтықты абайлап алыңыз.
11. Пробиркаларға **4 шаюға арналған 200 мкл ерітіндіні** тамызыңыз, қақпағын тығыз жабыңыз, пробирканы 3-5 рет аударып төңкере отырып шөгіндіні абайлап шайыңыз.
12. Микроцентрифугада **13 мың айн./мин 1-2 минут бойы** центрифугалау керек.
13. Вакуумды сорғышты және әр сынама үшін **10 мкл-ге** жеке ұштықты пайдалана отырып, шөгіндіге тimestен шөгіндіүстілік сұйықтықты абайлап алыңыз.

14. Шөгіндіні кептіру үшін пробиркаларды температурасы **65 °C** термостатқа **5 минутқа** салыңыз (сонымен бірге пробиркалар қақпағы ашық болуы тиіс).
15. **РНҚ-буферді 50 мкл-ден тамызыңыз.** Вортексте араластырыңыз. Вортексте қайта қайта сілки отырып, температурасы **65 °C** термостатқа **5 минутқа** салыңыз.
16. Микроцентрифугада **13 мың айн./мин 1 минут бойы** центрифугалау керек. Шөгіндіүстілік сұйықтықта тазартылған РНҚ мен ДНҚ бар. Сынамалар ПТР мен кері транскрипция реакциялары қойылымына дайын.

Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °C-ге дейінгі температурада 4 сағатқа дейін сақталады. Препаратты ұзақ уақыт сақтау үшін сорбентті қоса қамтымай, РНҚ ерітіндісін бөліп алу қажет, стерильді пробиркаға тамызып және минус 68 °C-ден аспайтын температурада бір жыл бойы сақтау керек.

В ҚОСЫМША. NucliSENS easyMAG автоматты стансасын пайдаланған кезде сынамадан РНҚ экстракциялау

1 нұсқа. Аспаптан тыс үлгі лизисімен РНҚ экстракциялау

Бөліп алудың осы әдісі NucliSens лизисіне арналған буфер шығынын төмендетуге және дұрысы құрамында ұйындылар (қақырық, аспираттар) бар клиникалық материалдар үлгісімен жұмыс істегенде көмектеседі.

Жұмыс тәртібі:

1. NucliSENS easyMAG аспабын қосыңыз және аспапқа берілген нұсқаулықты ұстана отырып, оны РНҚ/ДНҚ бөлінділеріне дайындау.
2. Зерттелетін үлгілерді енгізуге арналған терезеге әр үлгі үшін мынадай параметрлерді енгізіңіз: үлгінің атауы, РНҚ (*Other* орнату) бөліп алуға арналған материал (*Matrix*), үлгі көлемі (*volume*) –0,1 ml, элюция көлемі (*Eluate*) – **25** mkl, үлгі типі (*Type*) –Lysed, үлгілерде (*priority*) РНҚ бөліп алу кезегі – normal.
3. РНҚ/ДНҚ бөліп алудың жаңа хаттамасын жасау және оны сақтап қою керек. Хаттамада лизис пен үлгілерді инкубациялау аспаптан тыс жүргізілетінін көрсету керек: *On-board Lysis Buffer Dispensing-no, On-board Lysis Incubation-no*.
4. Үлгілер кестесін жасалған хаттамаға енгізу керек.
5. NucliSENS easyMAG (бөліп алудың теріс бақылауын қоса алғанда) аспабында РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған арнаулы бір реттік пробиркалардың қажетті мөлшерде іріктеп алу керек. Әрбір пробирканың ішкі қабырғасына **ІБҮ STI-rec 10 мкл-ден** тамызыңыз. Пробиркаларға **NucliSens лизисіне арналған буферді 550 мкл-ден** қосыңыз.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Ішінде ұйындылары бар материалдармен жұмыс істеген кезде лизисті көлемі 1,5 мл пробиркаларда жүргізу ұсынылады. Инкубация (**8 т. қараңыз**) аяқталғаннан кейін пробиркаларды микроцентрифугада 10 мың айн./мин 1 минут бойы центрифугалау керек және шөгіндіүстілік сұйықтықты NucliSENS easyMAG аспабында РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған арнаулы пробиркаларға енгізу керек.

6. **Лизиске арналған ерітіндісі** және **ІБҮ STI-rec** бар пробиркаларға аэрозольді бөгеті бар ұштықтарды пайдалана отырып **дайындалған сынаманы 100 мкл-ден** енгізу керек және пипеткамен тамыза отырып мұқият араластыру керек. (Пробиркаға шырыш ұйындысын және ірі бөлшектерді түсірмеу керек)
7. Бөліндінің теріс бақылау (ТБ) пробиркасына **ТБҮ 100 мкл-ін** енгізу керек.
8. Пробирканы бөлме температурасында 10 минут бойы инкубациялау керек.

Магнитті силикасы бар NucliSens пробирканы вортесте қарқынды араластыра отырып, қайта суспензиялау керек. Әрбір пробиркаға аэрозольді бөгеті бар жеке ұштықтармен магнитті силиканы 25 мкл-ден енгізу және пипеткамен тамыза отырып мұқият араластыру керек.

Магнитті силика пробирканың барлық көлеміне бірқалыпты таралуы тиіс.
10. Үлгілері бар пробиркаларды аспапқа салыңыз, ұштықтарды орнатыңыз, үлгілер лизисімен РНҚ бөліп алу бағдарламасын аспаптан тыс қосу керек (*off board*).

11. РНҚ бөліп алу аяқталғаннан кейін пробиркаларды аспаптан алыңыз және **РНҚ бөліп алу емшарасы аяқталғаннан кейін 30 минуттан кешіктірмей ПТР-ОТ реакциясын жүргізу керек.**

Сақтау қажет болғанда тазартылған РНҚ бөліп алғаннан кейін 30 минут аралығында стерильді пробиркаларға ауыстырып салу керек.

Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 8 сағатқа дейін, бір ай бойы– минус 16 °С-ден аспайтын температурада, едәуір ұзақ - минус 68 °С-ден аспайтын температурада сақтауға болады.

2 нұсқа. Аспаптағы үлгі лизисімен РНҚ экстракциялау.

Жұмыс тәртібі:

1. NucliSENS easyMAG аспабын қосу және аспапқа берілген нұсқаулықты ұстана отырып, оны РНҚ бөліп алуға дайындау.
2. Зерттелетін үлгілерді енгізуге арналған терезеге әр үлгі үшін мынадай параметрлерді енгізіңіз: үлгінің атауы, РНҚ (*Other* орнату) бөліп алуға арналған материал (*Matrix*), үлгі көлемі (*volume*) –0,1 ml, элюция көлемі (*Eluate*) – **25** mkl, үлгі типі (*Type*) –Primary, үлгілерде (*priority*) РНҚ бөліп алу кезегі – normal.
3. РНҚ/ДНҚ бөліп алудың жаңа хаттамасын жасау және оны сақтап қою керек. Хаттамада лизис пен үлгілерді инкубациялау аспаптан тыс жүргізілетінін көрсету керек: *On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes.*
4. Үлгілер кестесін жасалған хаттамаға енгізу керек.
5. NucliSENS easyMAG (бөліп алудың теріс бақылауын қоса алғанда) аспабында РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған бір реттік пробиркалардың қажетті мөлшерде іріктеп алу керек. Әрбір пробирканың ішкі қабырғасына **ІБҮ STI-гес 10 мкл-ден** тамызыңыз. Пробиркаларға **NucliSens лизисіне арналған буферді 550 мкл-ден** қосыңыз.
6. **ІБҮ** бар пробиркаларға аэрозольді бөгеті бар ұштықтарды пайдалана отырып **дайындалған сынаманы 100 мкл-ден** енгізу керек. (Пробиркаға шырыш ұйындысын және ірі бөлшектерді түсірмеу керек)
7. Бөліндінің теріс бақылау (ТБ) пробиркасына **ТБҮ 100 мкл-ін** енгізу керек.
8. Үлгілері бар пробиркаларды аспапқа салыңыз, ұштықтарды орнатыңыз, үлгілер лизисімен РНҚ бөліп алу бағдарламасын аспапта қосу керек (*on board*).
9. NucliSENS easyMAG автоматты стансасы *Instrument State – Idle* қалыптағы жұмысын тоқтатпайынша күту керек.
10. **Магнитті силикасы бар NucliSens** пробирканы вортексте қарқынды араластыра отырып, қайта суспензиялау керек. Аспаптың қақпағын ашып және әрбір пробиркаға аэрозольді бөгеті бар жеке ұштықтармен

магнитті силиканы 25 мкл-ден енгізу және пипеткамен тамыза отырып мұқият араластыру керек. Магнитті силика пробирканың барлық көлеміне бірқалыпты таралуы тиіс.

11. Аспап қақпағын жауып және РНҚ бөліп алу бағдарламасын жалғастыру қажет.
12. РНҚ бөліп алу аяқталғаннан кейін пробиркаларды аспаптан алыңыз және **РНҚ бөліп алу емшарасы аяқталғаннан кейін 30 минуттан кешіктірмей ПТР-ОТ реакциясын жүргізу керек.**

Сақтау қажет болғанда тазартылған РНҚ бөліп алғаннан кейін 30 минут аралығында стерильді пробиркаларға ауыстырып салу керек. **Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 8 сағатқа дейін, бір ай бойы–минус 16 °С-ден аспайтын температурада, едәуір ұзақ - минус 68 °С-ден аспайтын температурада сақтауға болады.**

**Г ҚОСЫМША. Кері транскрипция реакциясын жүргізу
2 аймақта жүргізіледі – ПТР-амплификациясын жүргізуге арналған
бөлме.**

(Реакцияның жалпы көлемі – 20 мкл, РНҚ-сынама көлемі – 10 мкл)

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! РНҚ жұмыс істегенде «RNase-free», «DNase-free» арнайы заттаңбасы бар бір реттік пластик шығын материалдарын пайдалану қажет.

Жұмыс тәртібі:

1. Көлемі 0,2 (0,5) мл микропробиркалардың қажетті санын таңдап алу керек.
 2. Реакциялық қоспаны 12 реакцияға дайындау керек. Бұл үшін **RT-mix** бар пробиркаға **5 мкл RT-G-mix-1** енгізу керек және вортексте мұқият араластыру, пробирка қақпағындағы тамшыларды шөктіру керек.
 3. Алынған ерітіндіге **6 мкл ревертазаны (MMiv)** қосу, 5 рет пипеткамен тамызып, вортексте араластыру қажет. Пробирка қақпағындағы тамшыларды қысқа мерзімді центрифугалау арқылы шөктіру керек.
 4. Микропробиркаларға дайын реакциялық қоспаны **10 мкл-ден** тамызыңыз.
 5. Бөгеті бар ұштықтарды пайдалана отырып, реакциялық қоспасы бар пробиркаға **10 мкл РНҚ-сынаманы** қосыңыз. Пипеткамен тамызу арқылы абайлап араластыру керек.
 6. Пробиркаларды амплификаторға (термостат) **37 °С** температурда 30 минутқа салыңыз.
 7. ПТР келесі қойылымына арналған кДНК кері транскрипция реакциясынан алынғанды ДНҚ-буфермен 2 рет сұйылту керек (**20 мкл кДНК-ға** аэрозольді бөгеті бар жеке ұштықпен **20 мкл ДНҚ-буферді** қосыңыз, вортексте араластырыңыз және пробирка қақпағының ішкі бетінен тамшыларды алу үшін вортексте 5 с бойы центрифугалаңыз).
- кДНК дайын препаратын минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 апта бойына немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада бір жыл бойы сақтауға болады.**

Қысқарту тізімі

Осы нұсқаулықта келесі қысқартылған сөздер мен мәндері қолданылады:

ПТР	- полимеразалы тізбекті реакция
FEP	- «соңғы нүкте» бойынша флуоресцентті детекция
FRT	- «нақты уақыт» режиміндегі флуоресцентті детекция
кДНҚ	- РНҚ матрицасында кері транскрипция реакциясында алынатын комплементарлық ДНҚ
ОБҮ	- Оң бақылау үлгісі
ІБҮ STI-rec	- Гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар жинақтарға арналған ішкі бақылау үлгісі
ТБҮ	- Теріс бақылау үлгісі
ТБ	- Теріс бақылау экстракциясы (бөлініп алынуы) РНҚ/ДНҚ
Б-	- ПТР теріс бақылау
Б+	- ПТР оң бақылау
ІБ+	- ІБҮ үлгісі амплификациясының оң бақылауы
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

Жарамдылық мерзімі

FEP нұсқасы (1 түрі, 2 түрі) және FRT нұсқасы 1 түрі – 9 ай.

FRT нұсқасы 2 түрі – 12 ай.

Жарамдылық мерзімі өткен реагенттер жинағы қолдануға жатпайды.

Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін қолдануға болмайды.

Тасымалдау

Реагенттер жинағын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 5 тәуліктен асырмай тасымалдау керек. «ПТР-жиынтық» FRT-100 F нұсқасын алған кезде көрсетілген сақтау температурасына сәйкес жиынтықтан босатып шығару керек.

Сақтау шарттары

Реагенттер жинағын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. ПТР-қоспа-2-FRT, ПТР-қоспа-1-FEP/FRT (F) реагенттері (көлемі 0,12 мл), полимеразаны (TaqF) минус 16 °С-ден аспайтын температурада сақтау керек.

Босатылу шарттары

Емдеу-профилактикалық және санитарлық-профилактикалық мекемелерге

арналған.

Баспа өнімдерінде пайдаланылатын символдар

	Каталогтағы нөмірі		Сақ болыңыз! Ілеспе құжаттамаға жүгініңіз
	Партия коды		Тесттердің ең көп саны
	In vitro диагностикаға 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

Гибридизациялық-флуоресценттік детекциясымен полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісімен А тұмауы вирустарын (*Influenza virus A*) типтендіруге (H1N1 және H3N2 субтиптерін сәйкестендіруге) арналған «АмплиСенс® *Influenza virus A-типі-FL*» реагенттер жинағы, **FEP** немесе **FRT** нұсқалары

Техникалық шарттары ТШ 9398-102-01897593-2010.

Өндіруші ұйым

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) 331-31-47
E-mail info@kb-diagnostic.kz