

Қазақстан Республикасы
Денсаулық сақтау министрлігі
Фармация комитеті
төрағасының
2019 жылғы «25» қыркүйек
№ N023809 бұйрығымен
БЕКІТІЛГЕН

Медициналық мақсаттағы бұйымды
медицинада қолдану жөніндегі нұсқаулық

Медициналық мақсаттағы бұйымның атауы

Клиникалық материалдағы адам иммунтапшылығы вирусы (АИТВ-1) провирустық ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® ДНҚ-АИТВ-FL» реагенттер жинағы

Бұйымның құрамы мен сипаттамасы

Тағайындалуы

«АмплиСенс® ДНҚ-АИТВ-FL» реагенттер жинағы «нақты уақыт» режимінде амплификация өнімдерін гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен ПТР әдісімен провирустық ДНҚ спецификалық фрагментін амплификациялау жолымен адам иммунтапшылығы вирусы (АИТВ-1) провирустық ДНҚ-сын анықтауға арналған. ПТР жүргізуге арналған материал ретінде адамның жаңа алынған қанынан немесе құрғақ қан дағынан бөліп алынған ДНҚ сынамалары қолданылады.

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

Әдістің принципі

Гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен адам иммунтапшылығы вирусы (АИТВ-1) провирустық ДНҚ-сын анықтау екі кезеңді: клиникалық материалдың үлгілерінен ДНҚ экстракциялауды және «нақты уақыт» режимінде (FRT форматы) гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен провирустық ДНҚ және эндогендік ішкі бақылау (ІБҮ) ДНҚ аймақтарын амплификациялауды қамтиды. Флуорофорға сәйкес келетін FAM каналы бойынша ІБҮ ДНҚ амплификациясы өнімін детекциялайды. Флуорофорға сәйкес келетін JOE каналы бойынша АИТВ-1 провирустық ДНҚ

¹ 98/79/ЕО Еуропалық Одақтың директивасына сәйкес.

амплификациясы өнімін детекциялайды.

Талдамалық сипаттамалар

Талдамалық сезімталдық

Клиникалық материалдың түрі	ДНҚ экстракциялауға арналған жиынтық	Амплификациялау мен детекциялауға арналған жиынтық	Клиникалық материалдың көлемі, мкл	Талдамалық сезімталдық, ГЭ/мл ДНҚ АИТВ-1 ²
Жаңа алынған қан	«РИБО-преп», «ДНҚ-сорб-В»	«ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы	250	100
		«ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы	100	250
Құрғақ қан тамшысы	«РИБО-преп»	«ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы	- (бір шеңбер, d=12 мм)	1x10 ³

Талдамалық спецификалығы

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

Көрсетілген организмдер мен вирустар үшін айқаспалы реакциялар тркелген жоқ.

Жинақ құрамы

FRT НҰСҚАСЫ

Құрғақ қан дақтарына арналған шығын материалдарының жиынтығы – құрғақ қан дақтарын алуға, тасымалдауға және сақтауға арналған жиынтықта мыналар бар:

Шығын материалдары	Саны
Қан алуға арналған Whatman 903 карточкасы	100 дана
Zip-Lock пакеті	100 дана
Кептіргіш	100 дана

Жиынтықталымның 2 түріне жатады.

Жиынтық 100 пациенттен қан сынамаларын алуға, тасымалдауға және

² Клиникалық материалдың 1 мл үлгісінде АИТВ-1 ДНҚ геномдық эквиваленттерінің (ГЭ) саны.

сақтауға есептелген.

«РИБО-преп» реагенттер жиынтығы 100 нұсқасы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

<i>Реагент</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизиске арналған ерітінді	Түссізден сұр-көгілдір түске дейін мөлдір сұйықтық ³	30	1 құты
Преципитацияға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	40	1 құты
3 шаюға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	50	1 құты
4 шаюға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	1 құты
РНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	8 пробирка

Жиынтықталымның 1, 2 түрлерінің құрамына кіреді.

«РИБО-преп» реагенттер жиынтығының 2 түрінің құрамына мыналар қоса беріледі:

<i>Реагент</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизиске арналған ерітінді	Түссізден сұр-көгілдір түске дейін мөлдір сұйықтық ⁵	30	2 құты
Преципитацияға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	40	1 құты

Егер клиникалық материал ретінде жаңа алынған қан және бақылауды қоса алғанда 42 сынамадан пайдаланылған жағдайда, егер клиникалық материал ретінде құрғақ қан дақтары пайдаланылған жағдайда, жиынтықталымның 1 түріндегі реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда 100 сынамадан РНҚ/ДНҚ экстракциялауға есептелген.

Егер клиникалық материал ретінде жаңа алынған қан немесе құрғақ қан дақтары пайдаланылған жағдайда, жиынтықталымның 2 түрінде реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда 100 сынамадан РНҚ/ДНҚ экстракциялауға есептелген.

«ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығы 100 нұсқасы – клиникалық материалдан ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

<i>Реагент</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистейтін ерітінді	Мөлдір түссізден сары немесе қызғылт түске дейінгі сұйықтық	30	1 құты
1 шаюға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	30	1 құты

³ Лизиске арналған ерітіндіні 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтау кезінде кристалл түрінде тұнба түзілуі мүмкін.

2 шаюға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	100	1 құты
эмбебап сорбент	Ақтан қою сарғыш түске дейінгі суспензия	1,25	2 пробирка
ДНҚ элюциясына арналған ТЕ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	5,0	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда 100 сынамадан ДНҚ экстракциялауға есептелген. Жиынтықталымның 3 түрінің құрамына кіреді. «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығына мыналар қоса беріледі:

<i>Реагент</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ТБУ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,6	1 пробирка

Гемолитик – жаңа алынған шеткері және кіндік қанды алдын ала өңдеуге арналған реагент:

<i>Реагент</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Гемолитик	Мөлдір түссіз сұйықтық	100	1 құты

Реагент бақылауды қоса алғанда 100 клиникалық үлгілерді алдын ала өңдеуге есептелген. Жиынтықталымның 1, 2 (1 құты), 3 (2 құты) түрлерінің құрамына кіреді.

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT нұсқасы – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен адам иммунтапшылығы вирусы (АИТВ-1) провирустық ДНҚ-сын амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

<i>Реагент</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ПТР-қоспа-1-FRT АИТВ	Түссізден ашық күлгін түске дейін мөлдір сұйықтық	0,24	8 пробирка
ОТ-ПТР-қоспа-2-FEP/FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	8 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,02	8 пробирка
ТЕ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,07	8 пробирка

FRT нұсқасындағы «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығына келесі реагент қоса беріледі:

<i>Реагент</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
АИТВ-1 ДНҚ және адамның ДНҚ-сы ОБУ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда 120 реакцияға есептелген. Жиынтықталымның 1, 2, 3 түрлерінің құрамына кіреді.

Қолданылу саласы

Клиникалық зертханалық диагностика.

Жиынтықталымы

Реагенттер жинағы жиынтықталымның 3 түрінде шығарылады.

Реагенттер жинағы 1 форматта шығарылады.

FRT форматы

Реагенттер жинағы жиынтықталымның 4 түрінде шығарылады:

1 түрі «РИБО-преп» 100 нұсқадағы, «Гемолитик» (1 құты), «ПТР-жиынтық» FRT нұсқадағы реагенттер жиынтығын қамтиды.

2 түрі құрғақ қан дақтарына арналған «РИБО-преп» 100 нұсқадағы, лизиске арналған ерітінді (2 құты), преципитацияға арналған ерітінді (1 құты), «Гемолитик» (1 құты), «ПТР-жиынтық» FRT нұсқадағы шығын материалдарының жиынтығын қамтиды.

3 түрі «ДНҚ-сорб-В» 100 нұсқадағы, «Гемолитик» (2 құты), «ПТР-жиынтық» FRT нұсқадағы реагенттер жиынтығын қамтиды.

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

Жиынтықталымның 1 және 2 түрлері «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен адам имунтапшылығы вирусы (АИТВ-1) провирустық ДНҚ-сын және эндогендік ішкі бақылау ДНҚ-сын адам имунтапшылығы вирусы (АИТВ-1) провирустық ДНҚ-сын және эндогендік ішкі бақылау ДНҚ-сын преципитациялау және амплификациялау әдісімен клиникалық материалдан (**жаңа алынған қан, құрғақ қан дақтары**) ДНҚ экстракциялауды қамтитын толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымның 3 түрі силикагельде сорбциялау және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен адам имунтапшылығы вирусы (АИТВ-1) провирустық ДНҚ-сын және эндогендік ішкі бақылау ДНҚ-сын амплификациялау әдісімен клиникалық материалдан (**жаңа алынған қан**) ДНҚ экстракциялауды қамтитын толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымның 4 түрі ол тапсырыс берушінің тілінде және жинақтар бойынша жиынтықталымның келесі таңбалануы үшін өндірістік мақсаттарға арналған.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! 3 түрі клиникалық материал ретінде жаңа алынған қан үлгілерін ғана пайдалану кезінде ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Жиынтықталымның 4 түрі Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН-мен бекітілген регламентке сәйкес қана пайдаланылады.

Жиынтықталымның 1, 2 және 3 түрлері бақылауды қоса алғанда амплификацияның 100 реакциясын жүргізуге есептелген.

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 өндеуге қойылатын санитарлық-эпидемиологиялық талаптар» және ЭН 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:

- Зертхана бөлмесіндегі температура 20 °C-ден 28 °C-ге дейін, салыстырмалы ылғалдылығы 15-тен 75%-ға дейін.
- 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 үлгілерді 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 Экстракциялау Аймағында басталып, Амплификациялау және Детекциялау Аймағында жалғасуы керек. Үлгілерді, жабдықтарды мен реактивтерді үдерістің алдыңғы сатысы өткізілген аймаққа қайтаруға болмайды.
- Пайдаланылмаған реактивтерді, жарамдылық мерзімі өткен реагенттерді, сондай-ақ пайдаланылған реагенттерді, қаптаманы⁴, биологиялық материалды, биологиялық материалмен ластанған материалдарды, құралдар мен заттарды қоса 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 амплификация өнімдерімен ластануын туындатады.

- Сүзгісі бар автоматты дозаторларға арналған бір реттік ұштықтарды

⁴ Пайдаланылмаған реагенттерді, жарамдылық мерзімі өткен реагенттерді, пайдаланылған реагенттерді, қаптаманы медициналық қалдықтар қауіптілігінің Г класына жатады.

пайдаланып, әрбір операция кезінде алмастыру керек⁵.

Бір реттік пластик ыдыстар (пробиркалар, ұштықтар) медициналық қалдықтарды зарарсыздандыру үшін пайдаланылатын, ішінде дезинфекциялық зат бар арнайы контейнерге тасталуы керек.

- ПТР қойылымы жүргізілетін үстелдердің беткейлерін, сондай-ақ бөлмелерді жұмыс басталарға дейін және аяқталғаннан кейін 30 минут ішінде ультракүлгін сәулемен сәулелендіру керек.
- Реагенттер жинағы сынамалардың көрсетілген санына ПТР-зерттеу жүргізу үшін бір рет қолдануға арналған («Құрамы» бөлімін қараңыз).
- Реагенттер жинағы осы нұсқаулыққа сәйкес қолдануға дайын. Реагенттер жинағын қатаң түрде тағайындалуы бойынша қолдану керек.
- Реагенттер жинағымен жұмыс істеуге молекулярлық диагностика және клиникалық диагностикалық зертханада белгіленген тәртіппен жұмыс істеу ережелері әдісімен оқытылған қызметкерлер жіберіледі (СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділігі (қауіптілігі) III–IV топтағы микроорганизмдермен және паразиттік аурулар қоздырғыштарымен жұмыс істеу қауіпсіздігі»).
- Егер реагенттің ішкі қаптамасы бүлінген болса немесе сыртқы түрі сипаттамаға сәйкес келмесе, реагенттер жинағын пайдалануға болмайды.
- Егер нұсқаулыққа сәйкес тасымалдау және сақтау шарттары сақталмаса, реагенттер жинағын пайдалануға болмайды.
- Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін жинақты пайдалануға болмайды.
- Бір реттік опаланбаған қолғаптарды, зертханалық халаттарды пайдалану, үлгілермен және реагенттермен жұмыс кезінде көзді қорғау керек. Жұмыс аяқталған соң қолды мұқият жуу керек. Барлық операциялар адам организмімен жанасуды болдырмау үшін қолғаппен ғана жүргізіледі.
- Буларды деммен жұтудан, терімен, көзбен және шырышты қабатпен жанасудан аулақ болу керек. Жұтылған кезде зиянды.
- Жанасу болғанда зақымданған жерді дереу сумен жуу және қажет болған кезде медициналық жәрдем алу керек.
- Тасымалдау, пайдалану және сақтау шарттарын сақтаған кезде жарылыс және өрттен қауіпсіз.
- Материалдардың қауіпсіздігі жөніндегі парақтар (SDS – safety data sheet) сұраныс бойынша қол жетімді.

Адам организміне теріс салдарлар әкелуі мүмкін ықтимал оқиғаларды бағалау.

Жоғарыда келтірілген сақтық шараларын тағайындалуы бойынша пайдалану және сақтау кезінде, адам организмімен жанасу мүмкін емес. Төтенше жағдайлар кезінде мыналар болуы мүмкін:

- сезімтал адамдарда көздің шырышты қабығының тітіркенуі,
- сезімтал адамдарда терінің тітіркенуі,
- аллергиялық реакция,
- деммен жұту кезінде зиян,

⁵Экстракция үдерісінде тұнба үстіндегі сұйықтықты вакуумдық сорғыштың көмегімен алып тастау үшін, сүзгісіз бір реттік ұштықтар пайдаланылады.

- ішке қабылдау кезінде зиян.

Адам организміне реагенттер жиынтығының ерекше әсерлері (жиынтықталымның барлық түрлері үшін):

- Канцерогенді әсері жоқ.
- Мутагенді әсері жоқ.
- Репродуктивті уыттылығы жоқ.

Қосымша материалдар мен құрал-жабдықтар

1 АЙМАҚ. Клиникалық материалдан ДНҚ экстракциялау.

1. Бактериясыз ауа ортасы боксы (ПТР-бокс).
2. «Эппендорф» типті пробиркаларға арналған микроцентрифуга (16000 g-ге дейін).
3. Вортекс.
4. «Эппендорф» типті пробиркаларға арналған 25 °С-ден 100 °С-ге дейін термостат.
5. Тұнба үстіндегі сұйықтықты алып тастауға арналған колба-қақпанымен медициналық вакуумдық сорғыш.
6. Ауыспалы көлемдегі автоматты дозаторлар.
7. Штативтердегі 200 мкл-ге дейінгі сүзгісімен бір реттік ұштықтар.
8. Бір реттік полипропиленді бұрандасы бар немесе 1,5 мл-ге тығыз жабылатын пробиркалар.
9. Көлемі 1,5 мл пробиркаларға арналған штативтер.
10. ДНҚ бөлініп алынған сынамаларына арналған -16 °С-ден аспайтын температурадағы 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.

Құрғақ қан дақтарымен жұмыс істеу кезінде:

13. Диаметрі 6 мм компостерлер (мысалы, Qiagen, Германия).

2 АЙМАҚ. ПТР жүргізу және амплификациялау өнімдерін гибридизациялық-флуоресцентті детекциялау

1. Бактериясыз ауа ортасы боксы (ПТР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Ауыспалы көлемдегі автоматты дозаторлар.
4. Штативтердегі 200 мкл-ге дейінгі сүзгісімен бір реттік ұштықтар.
5. Көлемі 0,2 мл пробиркаларға арналған штативтер.
6. -16 °С-ден аспайтын температурадағы мұздатқыш камерасымен 2°С-ден 8°С-ге дейінгі температурадағы тоңазытқыш.
7. Жеке халат, қалпақтар, аяқ киімдер және бір реттік қолғаптар ЭН 1.3.2569-09 бойынша.
8. Ұштықтарды тастауға арналған ыдыс.
9. «Нақты уақыт» режимінде флуоресценттік дабылды детекциялау жүйесімен бағдарламаланатын амплификатор (мысалы, Rotor-Gene

3000/6000, (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, АҚШ), Mx3000P (Stratagene, АҚШ), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Ресей) және Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынылған осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда).

10. Көлемі 0,2 мл немесе 0,1 мл ПТР үшін бір реттік полипропилендік пробиркалар:
 - а) Көлемі 0,2 мл РТР дөңес қақпағы бар ПТР үшін жұқа қабырғалы пробиркалар (мысалы, Ахуген, АҚШ) – планшеттік типті аспапты пайдалану кезінде;
 - б) Көлемі 0,2 мл жалпақ қақпағы бар ПТР үшін жұқа қабырғалы пробиркалар (мысалы, Ахуген, АҚШ), немесе Rotor-Gene-ге ПТР үшін пробиркалар, көлемі 0,1 мл стриптердегі 4 данадан қақпақтарымен (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, 2012 ж. әзірлеген «ПТР-диагностика үшін клиникалық материалды алу, тасымалдау, сақтау» әдістемелік ұсынымдарын оқып шығу керек.

Зерттеу жүргізу үшін мыналар пайдаланылады:

1. Антикоагулянт ретінде ЭДТА ерітіндісі бар пробиркаға таңертең ашқарынға жаңа алынған қан. Қаны бар пробирка алғаннан кейін қақпағымен жабылады, 3-4 рет аударып төңкеру арқылы араластырылады және 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 48 сағаттан асырмай сақталады.
Түтікшені қабылдағаннан кейін қан қақпақпен жабылады, 3-4 рет айналдыру арқылы араласады және 2-ден 8 ° С температурада 48 сағаттан аспайды.
2. 903[®] типті қағаз карточкада кептірілген құрғақ қан дақтары (мысалы, Whatman, Германия) немесе соған ұқсас. Құрғақ қан дақтарын дайындау емшарасын ДДҰ ұсынымдарына сәйкес жүргізу керек (WHO/CDS/CSR/EDC/2001.16 Guidelines for Using HIV Testing Technologies in Surveillance, 2009 update). Қанды қағазға жағу емшарасын әр пациент үшін бір карточка болуы керек. Карточканың әр айналымына бір тамшы қан (шамамен 50 мкл) жағылады. Қанды қағазға жағу кезінде тамшы шеңбердің көп бөлігін алып тұруы керек. Кемінде үш шеңбер қанмен дұрыс толтырылған карточка дұрыс толтырылған болып саналады. Карточкаға қан жағылғаннан кейін, картаны 18-25 °С температурада 4-12 сағат ішінде кептіру керек (күн сәулесінің тікелей түсуінен қорғау). Одан кейін тасымалдау немесе сақтау үшін карточкалар кептіргішімен бірге (әр пакетте 10 данадан) Zip-Lock типті пакеттерге (жоғары ылғалдылықтан қорғайтын пакеттер) салынады. Әр пакетке ылғалдылық индикаторын (бір пакетке 1 дана) салу ұсынылады. Бір пакетке 10 жеке карточкаға дейін салуға болады.

Білгалдылығы төмен жерлерде кептірілген және қапталған карточкаларды 2–8 °С температурада 6 ай бойы сақтауға болады. Құрғақ қан дақтары бар карточкаларды бөлме температурасында екі апта ішінде зертханаға тасымалдауға болады.

FRT нұсқасы

ПТР-зерттеуін жүргізу

ПТР-зерттеу келесі кезеңдерден тұрады:

- Зерттелетін үлгілерден алынған ДНҚ экстракциялау.
- «Нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен амплификациялау жүргізу.
- Нәтижелерді талдау және интерпретациялау.

Пайдаланылған жабдыққа байланысты ПТР-зерттеуін жүргізу емшарасы жөніндегі егжей-тегжейлі ақпарат «АмплиСенс® ДНҚ-АИТВ-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН әдістемелік ұсынымдарында баяндалған.

Зерттелетін үлгілерден алынған ДНҚ экстракциялау

ДНҚ экстракциялау үшін Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынылған реагенттер жиынтықтары пайдаланылады. Реагенттер жиынтықтарымен жұмыс істеу тәртібі осы нұсқаулыққа 1-4 қосымшаларда сипатталған:

- Жаңа алынған қаннан ДНҚ экстракциялау үшін «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланған кезде жұмыс істеу тәртібін «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланған кезде жаңа алынған қаннан ДНҚ экстракциялау» **1 қосымшасында** қараңыз.
- Құрғақ қан дақтарынан ДНҚ экстракциялау үшін «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланған кезде жұмыс істеу тәртібін «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланған кезде құрғақ қан дақтарынан ДНҚ экстракциялау» **2 қосымшасында** қараңыз.
- «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығын пайдаланған кезде жұмыс істеу тәртібін «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығын пайдаланған кезде жаңа алынған қаннан ДНҚ экстракциялау» **3 қосымшасында** қараңыз. Сондай-ақ «АмплиСенс® ДНҚ-АИТВ-FL» реагенттер жинағын қолдану жөніндегі Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН әдістемелік ұсынымдарын қараңыз.

«Нақты уақыт» режимінде детекциялаумен амплификациялауды жүргізу

А. Амплификациялауға арналған пробиркаларды дайындау.

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

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

ДНҚ сынамасының көлемін қоса алғанда – 25 мкл, реакциялық қоспаның жалпы көлемі – 50 мкл.

1. Зерттелетін және бақылау сынамалары ДНҚ амплификациялау пробиркалардың немесе стриптердің қажетті санын таңдау керек.
2. **15** реакцияға реакциялық қоспаны дайындау керек. Ол үшін **АИТВ ПТР-қоспа-1-FRT** бар пробиркаға **160 мкл ОТ-ПТР-қоспа-2-FEP/FRT және 16 мкл полимеразаны (ТақF)** қосып, вортесте мұқият араластыру және пробирканың қақпағынан тамшыларды түндіру керек. Реакциялық қоспаның қалдықтарын тастау керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Егер саны бақылауды қоса алғанда 16 есе емес үлгілерді талдау қажет болған жағдайда, бір сынамаға **15 мкл ПТР-қоспа-1-FRT АИТВ, 10 мкл ОТ-ПТР-қоспа-2-FEP/FRT және 1 мкл полимераза (ТақF)** есебінен 1,5 мл-ге жеке пробиркаға реакциялық қоспаны дайындау ұсынылады. Қоспаны 1 үлгіге артығымен дайындау керек. Реакциялық қоспаны дайындағаннан кейін, оны вортесте мұқият араластыру және пробирканың қақпағынан тамшыларды түндыру керек.

3. Әр пробиркаға дайын реакциялық қоспаны **25 мкл**-ден енгізу керек.
4. Реакциялық қоспасы бар пробиркаға сүзгісі бар ұштықтарды пайдаланып, зерттелетін немесе бақылау үлгілерінен экстракциялау нәтижесінде алынған **ДНҚ сынамаларын 25 мкл**-ден енгізу керек. Тамшуырман ақырын араластыру керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығының көмегімен бөліп алынған ДНҚ-сынамаларын қосқан кезде сорбенттің реакциялық қоспаға түсіп кетуінен аулақ болу керек.

5. Әр панельге 2 бақылау реакциясын қою керек:
 - а) **ПТР теріс бақылауы (Б–)** – пробиркаға **25 мкл ТЕ-буферді** енгізу керек.
 - б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **25 мкл АИТВ-1 ДНҚ ОБУ және адамның ДНҚ-сын** енгізу керек.

Қосылған бақылау үлгілері бар пробиркаларды ауа көпіршіктерінің пайда болуын болдырмас үшін тамшуырман ақырын араластыру керек.

Б. «Нақты уақыт» режимінде детекциялаумен амплификациялауды жүргізу.

1. «АмплиСенс ДНҚ-АИТВ» амплификациялау мен флуоресцентті дабылды детекциялаудың тиісті бағдарламасын орындау үшін аспапты («нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесі бар амплификаторды) бағдарламалау керек (1 кестені қараңыз).

«АмплиСенс ДНҚ-АИТВ» бағдарламасы

Цикл	Роторлық типті аспаптар ⁶			Планшетті типті аспаптар ⁷ («ДНҚ-Технология» фирмасының аспаптарын қоспағанда)			«ДНҚ-Технология» фирмасының аспаптары ⁸		
	Температура, °С	Уақыты	Циклдар саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдар саны	Температура, °С	Уақыты	Циклдар саны
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	20 с	5	95	20 с	5	95	20 с	5
	52	30 с		52	30 с		52	30 с	
	72	30 с		72	30 с		72	30 с	
3	95	20 с	40	95	20 с	42	95	5 с	42
	55	30 с флуоресц. дабылды детекциялау		55	40 с флуоресц. дабылды детекциялау		60	30 с	
	72	30 с		72	30 с		55	40 с флуоресц. дабылды детекциялау	

Флуоресцентті дабылды детекциялау флуорофорларға арналған FAM/Green және HEX/JOE/Yellow каналдары бойынша тағайындалады.

2. Аспаптың реакциялық модулінің ұяшықтарына пробиркаларын орнату керек.
3. Флуоресцентті дабылды детекциялаумен амплификациялау бағдарламасының орындалуын іс ке қосу керек.
4. Бағдарламаны орындау аяқталғаннан кейін нәтижелерді талдауға және интерпретациялауға кірісу керек.

Нәтижелерді талдау және интерпретациялау

Нәтижелерді талдау «нақты уақыт» режимінде детекциясы бар ПТР жүргізу үшін пайдаланылатын аспаптың бағдарламалық қамтамасыз етуінің көмегімен жүргізіледі.

Флуоресцентті дабылдың жинақталу қисығын екі канал бойынша талдайды:

- флуорофорға арналған FAM каналы бойынша ІБҮ ДНҚ фрагментін амплификациялау өнімінің жинақталуын растайтын дабыл тіркеледі;
- флуорофорға арналған JOE каналы бойынша вирустық АИТВ-1 ДНҚ (ОБҮ) аймағын амплификациялау өнімінің жинақталуын растайтын дабыл

⁶ мысалы, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 және Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынылған осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда.

⁷ мысалы, iCycler iQ, iQ5, Mx3000P және Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынылған осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда.

⁸ мысалы, «ДТ-96» және Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН ұсынылған осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарда.

тіркеледі.

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

Нәтижелерді интерпретациялау принципі келесідей:

- Егер берілген сынама үшін JOE (АИТВ-1 ДНҚ) каналы бойынша нәтижелер кестесінде көрсетілген (шекаралық) мәннен аспайтын *Ct* шектік циклының мәні анықталса және FAM (ІБҮ) каналы бойынша нәтижелер кестесінде көрсетілген шекаралық мәннен аспайтын *Ct* шектік циклының мәні анықталса, **АИТВ-1 ДНҚ-ның анықталғаны**.
- Егер берілген сынама үшін JOE (АИТВ-1 ДНҚ) каналы бойынша нәтижелер кестесінде *Ct* шектік циклының мәні анықталмаса (флуоресценция қисығы шектік сызықты кесіп өтпейді) немесе көрсетілген шекаралық мәннен асатын болса, ал FAM (ІБҮ) каналы бойынша нәтижелер кестесінде көрсетілген шекаралық мәннен аспайтын *Ct* шектік циклының мәні анықталса, **АИТВ-1 ДНҚ-ның анықталмағаны**.
- Егер берілген сынама үшін FAM (ІБҮ) каналы бойынша нәтижелер кестесінде *Ct* шектік циклының мәні анықталмаса (флуоресценция қисығы шектік сызықты кесіп өтпейді) немесе көрсетілген шекаралық мәннен асатын болса, талдау нәтижесі **нақты емес**.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! *Ct* шекаралық мәндері реагенттер жинағына қоса берілген қосымша парақта көрсетілген.

Егер бақылау реакцияларының нәтижелерін бағалау кестесіне сәйкес амплификациялау мен экстракциялаудың оң және теріс бақылаулары үшін дұрыс нәтижелер алынған болса, ПТР-зерттеулерінің нәтижесі сенімді деп саналады (2 кестені қараңыз).

2 кесте

ПТР-зерттеулерінің әр түрлі кезеңдеріндегі бақылауларға арналған нәтижелер

Бақылау	ПТР-зерттеуінің бақыланатын кезеңі	Шектік цикл мәні, <i>Ct</i>	
		Флуорофорға арналған JOE каналы бойынша	Флуорофорға арналған FAM каналы бойынша
ТБ	ДНҚ экстракциялау	Мәні жоқ	Мәні жоқ или Шекаралықтан артық мән анықталған
ОБ	ДНҚ экстракциялау	Шекаралықтан кем мән анықталған	Шекаралықтан кем мән анықталған
Б-	ПТР	Мәні жоқ	Мәні жоқ
Б+	ПТР	Шекаралықтан кем мән анықталған	Шекаралықтан кем мән анықталған

Талдау нәтижелері келесі жағдайларда есепке алынбайды:

1. Егер ДНҚ (ОБ) экстракциясының оң бақылауы бар сынамада қандай да бір детекциялау каналы бойынша оң дабыл болмаса. Ықтимал себебі: ДНҚ экстракциясы кезіндегі қателер. Экстракцияны тағы да жүргізу керек.
2. Егер ПТР (Б+) оң бақылауы бар сынамада қандай да бір детекциялау каналы бойынша оң дабыл болмаса. Ықтимал себебі: ПТР орнату кезеңінде жіберілген қателер. Барлық үлгілер үшін ПТР-ды тағы да жүргізу керек.
3. Егер осы үлгі үшін FAM (ІБҮ) каналы бойынша *Ct* шектік цикл мәні анықталмаса немесе көрсетілген мәннен асатын *Ct* мәні алынса. Ықтимал себебі: ДНҚ жоғалуына немесе ПТР тежелуіне әкелетін клиникалық материалды дайындау емшарасындағы қате. Осы үлгі үшін экстракциялау кезеңінен бастап талдауды қайтадан жүргізу талап етіледі.
4. Егер экстракцияны немесе ПТР (ТБ, Б-) теріс бақылау кезінде шекаралық мәннен кем *Ct* анықталса, онда реактивтер немесе сынамалар ластанған. Бұл жағдайда барлық сынамалар бойынша талдау нәтижелері жарамсыз болып саналады. Сынамаларды талдауды қайталау, сондай-ақ ластану көзін анықтау бойынша шаралар қабылдау қажет.

Қысқарту тізімі

Осы нұсқаулықта келесі қысқартылған сөздер мен мәндері қолданылады:

АИТВ-1	- вирус иммунодефицита человека типа 1 типті адам имунтапшылығы вирусы
ІБҮ	- ішкі бақылау үлгісі
Б-	- ПТР теріс бақылауы
Б+	- ПТР оң бақылауы
ТБ	- экстракцияның теріс бақылауы
ТБҮ	- теріс бақылау үлгісі
ОБ	- экстракцияның оң бақылауы
ОБҮ	- оң бақылау үлгісі
ПТР	- полимеразалық тізбекті реакция
Роспотребнадзор эпидемиология ҒЗИ ФБУН	- Тұтынушылардың құқықтарын қорғау және адамның әл-ауқаты саласындағы қадағалау жөніндегі федералды қызметі «Эпидемиология орталық ғылыми-зерттеу институты» Федералды бюджеттік ғылыми мекемесі
FL	- флуоресценттік детекция
FRT	- «нақты уақыт» режиміндегі флуоресценттік детекция

Сақтау шарттары

Құрғақ қан дақтарына арналған шығын материалдарының жиынтығы 15 °С-ден 25 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығын ТБҮ-ні қоспағанда 2 °С-ден 25 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын және «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығынан ТБҮ-ні 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығын -16 °С-ден аспайтын

температурада сақтау керек. **АИТВ-1 ДНҚ ОБУ және адам ДНҚ-сын** екі реттен артық мұздатып қатыруға/жібітуге жол берілмейді, **АИТВ-1 ДНҚ ОБУ және адам ДНҚ-сын** жібіткеннен кейін 6 айдан асырмай 2°C-ден 8 °C-ге дейінгі температурада сақтау керек. **ПТР-қоспа-1-FRT АИТВ, ОТ-ПТР-қоспа-2-FEP/FRT және полимеразаны (TaqF)** жібіткеннен кейін сақтау керек. ПТР-қоспа-1-FRT АИТВ жарықтан қорғалған жерде сақтау керек.

Тасымалдау

Реагенттер жинағын 2 °C-ден 8 °C-ге дейінгі температурада 5 тәуліктен асырмай тасымалдау керек. Алған кезде сақтауға ұсынылған температураға сәйкес дереу жиынтықтау 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		Ішіндегісі тесттердің n- санын жүргізу үшін жеткілікті
	In vitro диагностикаға арналған бұйым		дейін пайдалану керек
	Өзгерген күні		Пайдалану жөніндегі нұсқаулыққа жүгініңіз



Температуралық
ауқым



Күн сәулесінің
түсуіне жол
бермеу керек



Температураның
жоғары шектемесі



Дайындалған
күн



Өндіруші

Осыған сәйкес медициналық мақсаттағы бұйым өндірілген нормативтік құжат

Клиникалық материалдағы адам иммунтапшылығы вирусы (АИТВ-1) вирустық ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалы тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® ДНҚ-АИТВ-FL» реагенттер жинағы.

Техникалық шарттары ТШ 9398-007-01897593-2012.

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)

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).

«АмплиСенс» өнімдері туралы пікірлер мен ұсыныстарды тұтынушы сауалнамасын толтырып, www.amplisens.ru сайтында қалдыруға болады.

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

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

1 ҚОСЫМША. «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланылған кезде жаңа алынған қаннан ДНҚ экстракциялау.

ДНҚ экстракциясы үшін клиникалық материалдың көлемі – 0,1 мл немесе 0,25 мл.

Ескертпе – Лизиске арналған ерітінді (егер ол 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақталса) 65 °С температурада кристалдар толығымен ерігенше қыздыру керек.

Қаннан ДНҚ экстракциясы кезінде клиникалық материалды дайындау

1. Сынамалар мен бақылаулардың қажетті санын өңдеу үшін бұрандалы қақпағы бар 1,5 мл пробиркаларды алып, таңбалау керек.

Клиникалық сынамаларға арналған пробиркаларға таңбалауға сәйкес жеке ұштықтармен гемолитикті **1,0 мл-ден** және зерттелетін жаңа алынған қанды **0,25 мл-ден** енгізу керек. Егер жаңа туылған нәрестелердің қаны зерттелсе, **1,0 мл гемолитикке 0,1 мл қан** қосу керек. Пробиркаларды жабу және пробиркалардың ішіндегісін вортексте ақырын араластыру керек.

2. Пробиркаларды бөлме температурасында 5 минутқа қалдыру, содан кейін пробиркалардың ішіндегісін вортексте тағы да ақырын араластыру және 5 минутқа қалдыру керек.

3. Пробиркаларды микроцентрифугада минутына 8 мың айналым 2 мин бойы центрифугалау керек. Тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты вакуумдық сорғыштың көмегімен алу керек.

Алынған лейкоциттер тұнбасын екі аптаға -16 °С-ден аспайтын температурада, ал ұзақ уақыт бойы -68 °С-ден аспайтын температурада дереу лизирлеуге немесе мұздатып қатыруға болады.

Клиникалық материалдың лизисі

1. Бір қосымша оң бақылау (ОБ) пробиркасын таңбалап, оған **5 мкл АИТВ-1 ДНҚ ОБУ және адамның ДНҚ-сын** енгізу керек.

2. Бір қосымша теріс бақылау (ТБ) пробиркасын таңбалап, оған **5 мкл РНҚ-буферді** енгізу керек.

3. Лейкоциттері бар пробиркаларға және бақылау үлгілері бар пробиркаларға **лизиске арналған ерітіндіні 300 мкл-ден** енгізу керек.

4. Пробиркалардың ішіндегісін вортексте мұқият араластыру және термостатта **65 °С** температурада **5 минут** қыздыру керек.

5. Пробиркаларға 400 мкл **преципитацияға арналған ерітіндіні 400 мкл-ден** қосып, вортексте араластыру керек.

6. Пробиркаларды микроцентрифугада минутына **13 мың айналым 5 мин** бойы центрифугалау керек.

7. Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты мұқият алу керек.

8. Пробиркаларға **3 шаюға арналған ерітіндіні 500 мкл-ден** қосып, қақпақтарды тығыз жабу, пробиркаларды 3-5 рет аударып төңкеріп, тұнбаны абайлап шаю керек. Емшараны барлық пробиркаларға бір мезгілде жүргізуге болады, ол үшін штативтегі пробиркаларды үстінен

- қақпақпен немесе басқа штативпен жауып, оларды басып, штативті аударып төңкеру керек.
9. Микроцентрифугада минутына **13 мың айналым 1-2 мин** бойы центрифугалау керек.
 - 10.Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты мұқият алу керек.
 - 11.Пробиркаларға **4 шаюға арналған ерітіндіні 200 мкл-ден** қосып, қақпақтарды тығыз жабу, пробиркаларды 3-5 рет аударып төңкеріп, тұнбаны абайлап шаю керек.
 - 12.Микроцентрифугада минутына **13 мың айналым 1-2 мин** бойы центрифугалау керек.
 - 13.Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты мұқият алу керек.
 - 14.Тұнбаны кептіру үшін пробиркаларды термостатқа **65 °С** температурада **5 минутқа** қою керек (сонымен бірге пробиркалардың қақпақтары ашық болуы керек).
 - 15.Пробиркаларға **50 мкл РНҚ-буферді** қосу керек. Вортексте араластыру керек. Вортексте мезгіл-мезгіл сілкіп, термостатқа **65 °С** температурада **5 минутқа** қою керек.
 - 16.Пробиркаларды микроцентрифугада минутына **13 мың айналым 1 мин** бойы центрифугалау керек. Тұнба үстіндегі сұйықтықта тазартылған ДНҚ бар. Сынамалар ПТР қойылымына дайын.
- Тазартылған ДНҚ-ны бір апта бойы 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада және 1 жыл бойы -16 °С-ден аспайтын температурада сақтауға болады.**

2 ҚОСЫМША. «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдалану кезінде құрғақ қан дақтарынан ДНҚ экстракциялау.

ДНҚ экстракциясы үшін клиникалық материалдың көлемі – 1 құрғақ қан дағы.

Ескертпе – Лизиске арналған ерітінді (егер ол 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақталса) 65 °С температурада кристалдар толығымен ерігенше қыздыру керек.

1. Сынамалар мен бақылаулардың қажетті санын өңдеу үшін 1,5 мл пробиркаларды алып, таңбалау керек.
2. Алдын ала стерилизацияланған компостерлердің қажетті санын алу керек (диаметрі 6 мм).
3. Әр үлгі үшін бөлек компостер пайдалана отырып, тиісті пробиркаларға құрғақ қан дақтары бар шеңберлерді шығару керек. Компостермен жеткілікті мөлшерде материал алу үшін кезекпен 4-5 кесік жасап, қанның бір тұтас дағын кесіп тастау керек.
4. Бір қосымша оң бақылау (ОБ) пробиркасын таңбалау, оған **5 мкл АИТВ-1 ДНҚ ОБУ және адамның ДНҚ-сын** енгізу керек.
5. Бір қосымша теріс бақылау (ТБ) пробиркасын таңбалау, оған **5 мкл РНҚ-буферді** енгізу керек.

Ішінде құрғақ қан дақтарымен қағаз және бақылау үлгілері бар пробиркаға лизиске арналған ерітіндіні **700 мкл-ден** қосу керек. Пробиркаларды жауып, пробиркалардың ішіндегісін вортексте мұқият араластыру керек.

6. Пробиркаларды термостатқа қойып, **65 °С** температурада **30 минут** қыздыру керек. Инкубация кезінде пробиркаларды вортексте әр 8-10 минут сайын сілкіу керек.
7. Инкубация кезінде клиникалық үлгілер үшін 1,5 мл-ге жаңа пробиркалардың қажетті санын дайындап, таңбалау керек.
8. Пробиркаларды термостаттан шығарып алу және оларды микроцентрифугада минутына 10 мың айналым 1 минут бойы центрифугалау керек.
9. Клиникалық үлгілер үшін тұнба үстіндегі сұйықтықты тиісті таңбаланған жаңа пробиркаларға енгізу керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Сұйықтықтың ең жоғары мөлшерін енгізу керек. Ол үшін сұйықтықты ұштықпен алу кезінде тұнбадағы қағазды сығып алу керек. Алынған сұйықтықпен бірге аз мөлшерде қағаздың жаңа пробиркаларға бірге енуіне жол беріледі.

10. Пробиркаларға **преципитацияға арналған ерітіндіні 600 мкл-ден** қосу, вортексте араластыру керек.
11. Пробиркаларды микроцентрифугада **минутына 13 мың айналым 5 минут** бойы центрифугалау керек.
12. Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты мұқият алу керек.
13. Пробиркаларға **3 шаюға арналған ерітіндіні 500 мкл-ден** қосып, қақпақтарды тығыз жабу, пробиркаларды 3-5 рет аударып төңкеріп,

тұнбаны абайлап шаю керек. Емшараны барлық пробиркаларға бір мезгілде жүргізуге болады, ол үшін штативтегі пробиркаларды үстінен қақпақпен немесе басқа штативпен жауып, оларды басып, штативті аударып төңкеру керек.

14. Микроцентрифугада **минутына 13 мың айналым 1-2 минут** бойы центрифугалау керек.
15. Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты мұқият алу керек.
16. Пробиркаларға **4 шаюға арналған ерітіндіні 200 мкл-ден** қосып, қақпақтарды тығыз жабу, пробиркаларды 3-5 рет аударып төңкеріп, тұнбаны абайлап шаю керек.
17. Микроцентрифугада **минутына 13 мың айналым 1-2 минут** бойы центрифугалау керек.
18. Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты мұқият алу керек.
19. Тұнбаны кептіру үшін пробиркаларды термостатқа **65 °С** температурада **5 минутқа** қою керек (сонымен бірге пробиркалардың қақпақтары ашық болуы керек).
20. **РНҚ-буферді 50 мкл-ден** қосу керек. Вортексте араластыру керек. вортексте мезгіл-мезгіл сілкіп, термостатқа **65 °С** температурада **5 минутқа** қою керек.
21. Пробиркаларды микроцентрифугада **минутына 13 мың айналым 1 минут** бойы центрифугалау керек. Тұнба үстіндегі сұйықтықта тазартылған ДНҚ бар. Сынамалар ПТР қойылымына дайын.

Тазартылған ДНҚ-ны бір апта бойы 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада және 1 жыл бойы -16 °С-ден аспайтын температурада сақтауға болады.

3 ҚОСЫМША. «ДНҚ-сорб-В» реагенттер жиынтығын пайдалану кезінде жаңа алынған қаннан ДНҚ экстракциялау. ДНҚ экстракциясы үшін клиникалық материалдың көлемі – 0,1 мл немесе 0,25 мл.

Ескертпе – Лизистейтін ерітінді және 1 шаюға арналған ерітінді (егер ол 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақталса) 65 °С температурада кристалдар толығымен ерігенше қыздыру керек.

Қаннан ДНҚ экстракциясы кезінде клиникалық материалды дайындау

1. Сынамалар мен бақылаулардың қажетті санын өңдеу үшін бұрандалы қақпағы бар 1,5 мл пробиркаларды алып, таңбалау керек. Клиникалық сынамаларға арналған пробиркаларға таңбалауға сәйкес жеке ұштықтармен гемолитикті 1,0 мл-ден және зерттелетін жаңа алынған қанды 0,25 мл-ден енгізу керек. Пробиркаларды жабу және пробиркалардың ішіндегісін вортексте ақырын араластыру керек. Егер жаңа туылған нәрестелердің қаны зерттелсе, 1,0 мл гемолитикке 0,1 мл қан қосу керек.
2. Пробиркаларды бөлме температурасында 3 минутқа қалдыру, содан кейін пробиркалардың ішіндегісін вортексте тағы да ақырын араластыру және 3 минутқа қалдыру керек.
3. Пробиркаларды микроцентрифугада минутына 8 мың айналым 2 минут бойы центрифугалау керек. Тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты вакуумдық сорғыштың көмегімен алу керек.
4. Тұнбаға 0,5 мл гемолитикті қосу, вортексте араластыру және 3 минутқа қалдыру керек.
5. Пробиркаларды микроцентрифугада минутына 8 мың айналым 2 минут бойы центрифугалау керек. Тұнбаны қозғамай, тұнба үстіндегі сұйықтықты вакуумдық сорғыштың көмегімен алу керек.
6. Лейкоциттерді гемолитикпен шаюды қайталау керек. Соңғы шайғаннан кейін жасушалардың тұнбасы ақ болуы керек, тұнбаның астында қызғылт түсті шағын қақ қана болуына жол беріледі (бұзылған эритроциттердің қалдықтары).

Алынған лейкоциттер тұнбасын екі аптаға -16 °С-ден аспайтын температурада, ал ұзақ уақыт бойы -68 °С-ден аспайтын температурада дереу лизистеуге немесе мұздатып қатыруға болады.

Клиникалық материалдың лизисі

1. Әрбір пробиркаға лейкоциттердің тұнбасына лизислейтін ерітіндіні 300 мкл-ден қосу, жасушаларды толығымен суспензиялағанша вортексте араластыру керек.
2. Оң бақылауды (ОБ) дайындау. Оң бақылауға арналған жеке пробиркаға 300 мкл лизирлейтін ерітіндіні, 95 мкл ТБҮ және 5 мкл АИТВ-1 ДНҚ ОБҮ және адамның ДНҚ-сын қосу керек.
3. Теріс бақылауды (ТБ) дайындау. Теріс бақылауға арналған жеке пробиркаға 300 мкл лизислейтін ерітіндіні және 5 мкл ДНҚ элюциясы үшін 5 мкл ТЕ-буферді қосу керек.
4. Әмбебап сорбентті вортексте мұқият қайтадан суспензиялау керек.

- Әрбір пробиркаға жеке ұштықпен қайтадан суспензияланған әмбебап сорбентті **25 мкл**-ден қосу керек. Вортексте араластырып, тұнбаны әрбір екі минут сайын араластырып, штативке 10 минутқа қою керек.
5. Пробиркалардағы әмбебап сорбентті минутына 5 мың айналым кезінде 30 с бойы центрифугалаумен тұндыру керек. Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнба үстіндегі сұйықтықты алып тастау керек.
 6. Пробиркаларға **1 шаюға арналған ерітіндіні 300 мкл**-ден қосу, әмбебап сорбент толығымен қайтадан суспензияланғанға дейін вортексте араластыру керек. Әмбебап сорбентті центрифугалаумен микроцентрифугада минутына 5 мың айналым кезінде 30 с бойы тұндыру керек. Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнба үстіндегі сұйықтықты алып тастау керек.
 7. Пробиркаларға **2 шаюға арналған ерітіндіні 500 мкл**-ден қосып, сорбент толығымен қайтадан суспензияланғанға дейін вортексте араластыру, микроцентрифугада минутына 10 мың айналым кезінде 30 с центрифугалау керек. Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгісіз жеке ұштықты пайдаланып, тұнба үстіндегі сұйықтықты алып тастау керек.
 8. 7 тармағын қайталау керек.
 9. Әмбебап сорбентті кептіру үшін пробиркаларды термостатқа **65 °С** температурада **5 минутқа** қою керек. Сонымен бірге пробиркалардың қақпақтары ашық болуы керек.
 10. Пробиркаларға **ДНҚ элюциясы үшін ТЕ-буферді 50 мкл**-ден қосу керек. Вортексте араластыру керек. Термостатқа 65 °С температурада 5 минутқа қою керек.
 11. Пробиркаларды микроцентрифугада ең жоғары айналымдарда 1 мин бойы центрифугалау керек. Тұнба үстіндегі сұйықтықта тазартылған ДНҚ бар. Сынамалар ПТР қойылымына дайын.
- Тазартылған ДНҚ-ны бір апта бойы 2 °С-ден 8 °С-ге дейінгі температурада және 1 жыл бойы -16 °С-ден аспайтын температурада сақтауға болады.**