

Қазақстан Республикасы
Денсаулық сақтау министрлігі
Фармация комитеті Төрағасының
2018 жылғы “11” мамыр
№ N014945 бұйрығымен
БЕКІТІЛГЕН

Медициналық мақсаттағы бұйымды
медицинада қолдану жөніндегі нұсқаулық

Медициналық мақсаттағы бұйымның атауы

Клиникалық үлгілерден алынған сынамаларда *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* (*Parvum* және *Urealyticum* түрлері) *Mycoplasma genitalium* және *Mycoplasma hominis* ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалы тізбекті реакция әдісімен бір мезгілде анықтауға арналған «АмплиСенс® *C.trachomatis/Ureaplasma/M.genitalium/M.hominis* МУЛЬТИПРАЙМ-FL» реагенттер жинағы, FRT нұсқасы

Бұйымның құрамы мен сипаттамасы

Тағайындалуы

«АмплиСенс® *C.trachomatis / Ureaplasma / M.genitalium/ M.hominis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» реагенттер жинағы *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* (*Parvum* және *Urealyticum* түрлері) *Mycoplasma genitalium* және *Mycoplasma hominis* ДНҚ-ларын аталған микроорганизмнің спецификалық ДНҚ фрагментін амплификация өнімдерін ПТР әдісімен гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен бір мезгілде амплификациялау жолымен анықтауға арналған. ПТР жүргізуге арналған материал қызметін урогенитальді жол, тік ішек, ауызжұтқыншақтың шырышты қабықтарынан қырындысынан бөлінген, көз конъюнктивасынан, несеп үлгілерінен, адамның қуықасты безінің сөлінісінен бөлінген қырынды бөлінісінен алынған ДНҚ сынамалары атқарады. ДНҚ клиникалық үлгілерден бөліп алу ісшарасы үшін Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ өндірген немесе ұсынған сәйкесінше реагенттер жинағы пайдаланылады.

Детекция әдісіне және пайдаланылатын құрал-жабдықтардың типіне байланысты клиникалық үлгілердің ПТР-зерттеулерін жүргізудің детализацияланған емшарасы «Клиникалық материалдардың ДНҚ-да ЖЖБИ қоздырғыштарының және ұрпақ өрбіту органдарының басқа

инфекцияларының барын гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар ПТР әдісімен зерттеу» әдістемелік ұсынымдарында баяндалған.

Әдістің принципі

Әдіс *C.trachomatis*, *Ureaplasma (Parvum және Urealyticum түрлері)*, *M.genitalium* және *M.hominis* ДНҚ учаскелерін, сондай-ақ ішкі бақылау үлгісін (ІБҮ) бір мезгілде бір пробиркада амплификациялауға («мультиплекс-ПТР» форматы) және «нақты уақыт» режимінде детекциялауға негізделген. Реакциялық қоспаның құрамында олигонуклеотидтік праймерлер мен флуоресцентті таңбаланған гибридизациялық зондтар (ФТ зондтар) бар, ол амплификацияланатын фрагменттің ішкі спецификалық учаскелеріне комплементарлы. ФТ зонд беретін флуоресцентті сигнал амплификатордың оптикалық блогымен тікелей реакция барысында нақты уақытта детекцияланады. Әр нысанаға арналған ФТ зондтардың өздерінің толқын ұзындығы бар, ол сигналды сәйкесінше өзек бойынша тіркеуге мүмкіндік береді. Төрт қоздырғыш пен ІБҮ детекциялау үшін 5 – 6 арнаны оптикалық блогы бар амплификатор пайдаланылады. Берілген реагенттер жиынтығына тән ерекшелік микроорганизмдердің әрқайсысы үшін, тіпті қалғандарының барлығы бірнеше рет артылып қалса да (мысалы, микстинфекциялар диагностикасында), аналитикалық сезімталдығын сақтауы болып табылады.

Жинақ құрамы

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT нұсқасы – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma (Parvum және Urealyticum түрлері)* *Mycoplasma genitalium* және *Mycoplasma hominis* ДНҚ фрагментін амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

Реактив	Сипаты	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FL C.trachomatis/Ureaplasma/M.genitalium /M.hominis балауыз астына тамызылған	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,01	Көлемі 0,2 мл 110 пробирка
ПТР-қоспа-2-FL-red	Қызыл түсті мөлдір сұйықтық	1,1	1 пробирка
ОБҮ кешенді	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT-100 F нұсқасы – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma (Parvum және Urealyticum түрлері)* *Mycoplasma genitalium* және *Mycoplasma hominis* ДНҚ фрагментін амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

Реактив	Сипаты	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FL <i>C.trachomatis</i> / <i>Ureaplasma/M.genitalium</i> <i>/M.hominis</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	1 пробирка
ПТР-қоспа-2-FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,06	1 пробирка
ОБУ кешенді	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	1 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 110 реакциясын жүргізуге есептелген

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT-1000 F нұсқасы – «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы бар *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma (Parvum және Urealyticum түрлері)* *Mycoplasma genitalium* және *Mycoplasma hominis* ДНҚ фрагментін амплификациялауға арналған реагенттер жиынтығында **мыналар бар:**

Реактив	Сипаты	Көлемі, мл	Саны
ПТР-қоспа-1-FL <i>C.trachomatis</i> / <i>Ureaplasma/M.genitalium</i> <i>/M.hominis</i>	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	10 пробирка
ПТР-қоспа-2-FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	5 пробирка
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,12	5 пробирка
ОБУ кешенді	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,0	1 пробирка
ДНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауды қоса алғанда амплификацияның 1100 реакциясын жүргізуге есептелген.

Қолданылу саласы

Клиникалық зертханалық диагностика.

Жиынтықталымы
«АмплиСенс® C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium/ M.hominis-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» реагенттер жинағы FRT нұсқасында шығарылады.

Жиынтықталым түрі	FRT нұсқасы
1 түрі	FRT нұсқадағы «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы
2 түрі	FRT-100 F нұсқадағы «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы
3 түрі	FRT-1000 F нұсқадағы «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы
4 түрі	FRT нұсқадағы «АмплиСенс® C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium/M.hominis–МУЛЬТИПРАЙМ-FL» жинағы жиынтықталымына арналған топты реагенттер

«Нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен ПТР әдісімен зерттеу жүргізуге арналған **FRT нұсқасы**. Жинақтың бұл нұсқасын пайдаланғанда спецификалық амплификация өнімінің жинақталуын көрсететін флуоресцентті сигнал детекциясы, тікелей ПТР жүргізу барысында флуоресцентті сигналды детекциялау жүйесі бар амплификатордың көмегімен «Нақты уақыт» режимінде жүзеге асады .

Сақтық шаралары

Жұмыс клиникалық материалда инфекциялық аурулар қоздырғыштарының бар екендігін анықтайтын молекулалы-биологиялық (ПТР) зерттеулерді орындайтын зертханада СЕ 1.3.2322-08 «Патогендігі (қауіптілігі) III–IV топтағы микроорганизмдермен және паразитарлық аурулар қоздырғыштарымен жұмыс істеу қауіпсіздігі» 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.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Амплификациядан кейін ішінде ПТР өнімдері бар пробиркаларды утилизациялау кезінде оларды ашуға және ішіндегісінің шашырауына жол беруге болмайды, өйткені бұл амплификация өнімінің зертхана аймағына, жабдықтар және реагенттермен контаминациясына алып келуі мүмкін.

ПТР-зерттеулерін жүргізуге қажетті құрал-жабдықтар мен материалдар.

1. «Нақты уақыт» режиміндегі флуоресцентті сигналдың детекция жүйесі бар бес арнаны амплификаторымен, мысалы, «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) немесе соған ұқсасы.
2. Стерильді жұмыстарға арналған бокс (ПТР-бокс).
3. Центрифуга/вортекс.
4. Ауыспалы көлемдегі автоматты пипеткалар (дозаторлар) (5-тен 20 мкл-ге

- дейін, FRT-100 F нұсқасы жиынтығымен жұмыс істеген кезде - 5-тен 20 мкл-ге дейін және 20-дан 200 мкл-ге дейін).
5. Бір реттік ұштықтар аэрозольді бөгетімен штативтерде 100 мкл-ге дейін.
 6. Көлемі 0,2 мл микропробиркаларға арналған штативтер.
 7. Көлемі 0,2 мл немесе 0,1 мл ПТР арналған бір реттік полипропиленді микропробиркалар (FRT-100 F нұсқасындағы реагенттер жиынтығымен жұмыс кезінде):
 - Көлемі 0,2 мл (жайпақ қақпақ) ПТР арналған жұқа пробиркалар, немесе Rotor-Gene-ге ПТР арналған пробиркалар, көлемі 0,1 мл стриптерде 4 данадан қақпақтарымен (мысалы, «Corbett Research», Австралия; «Qiagen», Германия).
 8. Тоңазытқыш 2-ден 8 °С-ге дейін, минус 16 °С-ден аспайтын мұздатқыш камерасымен ДНҚ бөлініп алынған сынамаларына арналған.
 9. Жеке халат және бір реттік қолғаптар.
 10. Ұштықтарды тастауға арналған ыдыс.

Гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен ПТР жүргізу.

FRT нұсқасы. Гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен «Нақты уақыт» режиміндегі ПТР

А. ПТР үшін пробиркаларды дайындау

Аmplификацияға арналған пробиркаларды таңдау пайдаланылатын «Нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесі бар амплификаторға байланысты.

А1. «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығының FRT нұсқасы көмегімен ПТР жүргізуге арналған пробиркаларды дайындау

Жалпы реакция көлемі – 30 мкл, ДНҚ сынамасының көлемі – 10 мкл.

1. Зерттелетін үлгілер мен бақылау сынамаларының ДНҚ-сын амплификациялау үшін *C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium / M.hominis* ПТР-қоспа-1-FL бар пробиркалардың қажетті санын алып қою керек.
2. Қатып қалған балауыз бетіне **10 мкл ПТР-қоспа-2-FL-red** енгізу керек, бұл орайда ол балауыз астына түсіп кетпеуі және **ПТР-қоспа-2-FL** *C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium / M.hominis*-пен араласпауы тиіс.
3. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін клиникалық немесе бақылау үлгілерінен бөліп алынған ДНҚ сынамаларын **10 мкл-ден** енгізу керек.
4. **Бақылау реакцияларын** қою керек:
 - а) **ПТР теріс бақылауы (Б-)** – дайындалған пробиркаға **10 мкл ДНҚ-буферін** енгізу керек.
 - б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **10 мкл кешенді ОБУ** енгізу керек.
 - в) **бөліп алудың теріс бақылауы (Ба-)** – пробиркаға **ТБҮ-ден бөлініп алынған 10 мкл сынаманы** енгізу керек.

A2. FRT-100 F және FRT-1000 F нұсқаларындағы «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығының көмегімен пробиркаларды амплификация жүргізу үшін дайындау

Реакцияның жалпы көлемі - 25 мкл, ДНҚ сынамасының көлемі – 10 мкл.

1. Зерттелетін және бақылау сынамаларының ДНҚ амплификациялау үшін, пробиркалар мен стриптердің қажетті санын алып қою керек.
2. N реакциясын жүргізу үшін (2 ПТР бақылауын қоса) бөлек пробиркада $10*(N+1)$ мкл ПТР-қоспа-1-FL *C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium / M.hominis*, $5,0*(N+1)$ мкл ПТР-қоспа-2-FRT және $0,5*(N+1)$ мкл полимеразаны (TaqF) араластырыңыз.
3. Дайындалған қоспаны центрифуга/вортексте араластыру және қысқа уақыт центрифугалау арқылы тамшыларды шөктіру керек.
4. Әрбір пробиркаға дайындалған қоспаны **15 мкл-ден** енгізу керек.
5. Дайындалған пробиркаларға зерттелетін немесе бақылау үлгілерінен экстракциялау нәтижесінде алынған ДНҚ сынамасын **10 мкл-ден** енгізу керек.
6. **Бақылау реакцияларын** қою керек:
 - а) **ПТР теріс бақылауы (Б-)** – ДНҚ сынамасының орнына дайындалған пробиркаға 10 мкл ДНҚ-буферін енгізу керек.
 - б) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға 10 мкл кешенді ОБҮ енгізу керек.
 - в) **Бөліп алудың теріс бақылауы (Ба-)** – пробиркаға ТБҮ-ден бөлініп алынған 10 мкл сынаманы енгізу керек.
7. Пробиркаларды реакция модуліне орнату керек.
8. Бұл аспаптың сипаттамасына сәйкес, амплификация мен флуоресцентті сигналды детекциялаудың сәкесінше бағдарламасын орындау үшін бағдарламалау керек.
9. Бағдарламаны орындау аяқталған бойда нәтижелерді есепке алуға кірісіңіз.

ПТР-амплификациясы мен детекциялау, нәтижелерді талдау мен есепке алу «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия) және «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) аспабын пайдаланып жүргізіледі.

«Rotor-Gene» аспабын бағдарламалау және тест шаблонын құру.

«Rotor-Gene» 6000 және «Rotor-Gene Q» аспабымен жұмыс жасау үшін Rotor-Gene 6000 бағдарламасының 1.7 (build 67) немесе одан жоғары нұсқасын пайдалану керек.

Бұдан әрі мәтінде аспаптар мен бағдарламалық жасақтамалардың түрлі нұсқаларына сәйкес келетін терминдер келесі тәртіппен көрсетілген: бағдарламаның ағылшын тіліндегі нұсқасы үшін «Rotor-Gene» 6000 / бағдарламаның орыс тіліндегі нұсқасы үшін «Rotor-Gene» 6000.

1. Бағдарламалау және шаблон құру үшін *New Run /Жаңа тест терезесінде Advanced/Бөлшектік шебер* бағдарламалау *тест* режимін таңдау керек.

Редакциялау үшін кез-келген шаблонды таңдаңыз (мысалы, *Hydrolysis probes/ Флуоресцентті зондтар (TaqMan)*) және *New/ Жаңа* түймесін басыңыз. Келесі терезеден *36-Well Rotor/36-ойықшалы ротор* немесе *72-Well Rotor/ 72-ойықшалы ротор* типін таңдаңыз.

2. Роторды таңдау терезесінен кейінгі терезеде реакциялық қоспа көлемі *Reaction Volume (µL)/ 25-ке* тең болатын *реакция көлемін* белгілеңіз. Бұл қажетті опцияны белсенділендіру үшін бокстың *15 µL oil layer volume/15 µL май/балауыз көлемі* жолына қанат белгі қойыңыз.
3. *Edit Profile/ Бейін редакторы* терезесіне «АмплиСенс-1» бағдарламасын беру керек:

«АмплиСенс-1» бағдарламасы:

«АмплиСенс-1» бағдарламасы:

1. Hold/Темп. ұстап тұру 95 °С – 15 мин
2. Cycling/Циклдау 95 °С – 5 с
60 °С – 20 с
72 °С – 15 с
Cycle repeats/Циклды – 5 times/рет қайталау керек.
3. Cycling 2/Циклдау 2 95 °С – 5 с
60 °С – 20 с – Детекция¹
72 °С -15 с
Cycle repeats/Циклды қайталау – 40 times/рет.

«АмплиСенс-1» бағдарламасы ЖЖБЖ мен репродуктивтік органдардың басқа инфекциялардың ДНҚ қоздырғыштарын анықтау үшін адам папилломасы вирустарын анықтау және сипаттауға арналған (АПВ ВКР) барлық тестілерді қоса «ПТР-жиынтық реагенттер жиынтығының көмегімен» (Ресейтұтынуқадағалау «Эпидемиология ОҒЗИ» ФБҒМ өндірген) әмбебап болып табылады (2008 ж. «Клиникалық материалда ЖЖБЖ қоздырғыштарының ДНҚ болуына ПТР әдісімен гибридизациялық-флуоресцентті детекциямен зерттеу жүргізу әдістемесін» қараңыз). Сондықтан тестінің барлық осы сатыларын немесе олардың кез-келген үйлесімін бір мезгілде бір аспапта жүргізуге болады.

4. «gain»/«сигналды күшейту» параметрін таңдау үшін, автоматты калибрлеуді таңдаңыз. Ол үшін *Channel Setup/ Арнасының орнатылуы* терезесінен *Gain Optimisation /Сиг. Опт. деңгейі түймесін таңдаңыз*. Ашылған *Auto Gain Calibration Setup/Сигнал деңгейін авто-оңтайландыру терезесінен Optimise Acquiring/ Детек-рдың опт.*

¹ Флуоресценция детекциясы (*Acquiring to Cycling A/Детек. Cycling A*) Green, Yellow, Orange, Red және Crimson өзектері бойынша циклдеудің екінші блогының екінші қадамында (60 °С) қосылады.

түймесін басыңыз, *Perform Optimisation Before 1-st Acquisition/ Оңтайландыруды орындау жолындағы детекцияның 1-ші қадамы кезіндегі* боксқа қанат белгі қойыңыз. *Green* арнасы үшін *Min Reading/ Ең төм. Сигнал* бағанынан **5** мәнін таңдаңыз, ал *Max Reading/ Ең жоғ. Сигнал* бағанынан **10** мәнін таңдаңыз. *Yellow* арнасы үшін *Min Reading/ Ең төм. Сигнал* бағанынан **4** мәнін таңдаңыз, ал *Max Reading/ Ең жоғ. Сигнал* бағанынан **8** мәнін таңдаңыз. *Orange* арнасы үшін *Min Reading/ Ең төм. Сигнал* бағанынан **4** мәнін, ал *Max Reading/ /Ең жоғ. Сигнал* бағанынан **8** мәнін көрсету керек. *Red* арнасы үшін *Min Reading/ Ең төм. Сигнал* бағанынан **4** мәнін, ал *Max Reading/ Ең жоғ. Сигнал* бағанынан **8** мәнін көрсету керек. *Crimson* арнасы үшін *Min Reading/ Ең төм. Сигнал* бағанынан **4** мәнін, ал *Max Reading/ Ең жоғ. Сигнал* бағанынан **8** мәнін көрсету керек. *Tube position/ Сынауық позициясы* бағанында сынауық нөмірі көрсетілген, одан автоматты түрде «*gain*»/«*сигналды күшейту*» параметрі таңдалады. Үнсіз келісім бойынша бұл ротордағы 1-інші сынауық. Сондықтан ротордағы 1-інші позицияға реакциялық қоспасы бар (кез-келген) сынауық қойылуы тиіс². *Auto Gain Calibration Setup/ Сигнал деңгейін автооңтайландыру* терезесін жабыңыз.

5. Келесі терезеге көшіңіз. Тестіні орындаудың бағдарламаланған шаблонын сақтаңыз. Ол үшін *Save Template/Шаблонды сақтау* түймесін басыңыз. Онда берілген «**АмплиСенс-1**» амплификациялау және детекциялау бағдарламасының атауына сәйкес келетін шаблон файлына атау беріңіз. Ұсынылған папка файлын: *Templates/Шаблондар* және одан *Quick Start Templates* папкасын сақтаңыз *New Run Wizard/Жаңа Тест Шебері терезесін* жабыңыз. Содан кейін *New Run/Жаңа тест* терезесіндегі шаблондар тізімінде тестінің бағдарламаланған шаблонны пайда болады.

Дайын шаблонды пайдаланып, амплификация және детекциялауды жүргізу

1. Пробиркаларды роторға орнатыңыз. Бұл кезде бірінші позицияда реакциялық қоспасы бар талдау үшін дайындалған пробиркалардың бірі орнатылуы тиіс. Бекіткіш сақинаны орнатып, бекіткіш пен бекіткіштің тесіктерін үйлестіріп, роторды бекітіңіз, аспаптың қақпағын жабыңыз.
2. Дайын шаблонды пайдаланып іске қосу үшін, *New/ Жаңа* мәзірін, *New Run/ Жаңа тест* терезесінің үстіндегі *Advanced Start/ Бөлішектік шебер* қосымша бетін таңдаңыз, сосын бұл терезедегі шаблондар тізімінде қажетті, алдыңғы бөлімге сәйкес бағдарламаланған, «**АмплиСенс-1**»

- амплификациялау және детекциялау шаблонын таңдаңыз. Келесі терезеге өту үшін, *Next/ Ары қарай* түймесін пайдаланыңыз.
3. Роторды таңдау терезесінен **36-Well Rotor/36-ойықшалы ротор** немесе **72-Well Rotor/72-ойықшалы ротор** типін таңдаңыз. *Locking Ring Attached/ Сақина бекітілді* боксына қанат белгі қойыңыз. *Next/Ары қарай* түймесін басып келесі терезеге өтіңіз. Бұл қажетті опцияны орнату үшін бокстың жолына қанат белгі қойыңыз
 4. Келесі терезеде бұл опцияны белсенділендіретін **15 μ L oil layer volume/15 μ L май/балауыз көлемі** боксына қанат белгі қойылғанына, және жоғарыда реакциялық қоспаның *Reaction Volume (μ L)/Реакция көлемі* **25-ке тең** көлемі көрсетілгеніне көз жеткізіңіз.
 5. Келесі терезеден амплификациялау және детекциялау бағдарламасы мен 1 тармаққа сәйкес шаблонда берілген «gain» /«сигналды күшейту» параметрін автоматты түрде таңдау шарттарының, дұрыстығын тексеріңіз. *Next/ Ары қарай түймесін басып келесі терезеге көшіңіз.*
 6. Старт алдындағы соңғы терезеден, терезенің төменгі бөлігіндегі **Start Run/Старт** түймесінің көмегімен аспаппен орындалатын бағдарламаны іске қосу керек. Бұл кезде ротор бекітілген және қақпағы жабық болуы тиіс. Нәтижелер сақталатын файлдың атын беріңіз және **Save/ Сақтау** түймесін басыңыз.
 7. Үлгілер кестесі терезесінде оның әр үлгіге арналған атын (идентификатор) және *Unknown/ Үлгі* типін көрсете отырып, ротордағы үлгілердің орналасу ретін беріңіз. **Finish/OK** түймесін басыңыз.
 8. Амплификация бағдарламасын орындауды аяқтаған соң нәтижелерді есептеуге кірісіңіз.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Амплификациялау бағдарламасы аяқталған соң пробиркаларды ротордан алып тастайды және жояды.

Ескерту - Роторды толтыру үшін, бұрын амплификациялаудан өткен ПТР-қоспа бар пробиркаларды пайдалануға болмайды. Ротор ұяшығын бос пробиркалармен толтыру немесе толтырылмаған күйі қалдыру қажет.

Нәтижелерді талдау және есепке алу.

Алынған мәліметтер – флуоресцентті сигнал жинақталуының бес арна бойынша қисықтары – «Rotor-Gene» **6000** немесе «Rotor-Gene Q» аспабының бағдарламалық жасақтамасының көмегімен талданады. *C.trachomatis* ДНҚ фрагментінің амплификация өнімдерінің жинақталғанын көрсететін сигнал **Green** арнасы бойынша, *Ureaplasma* ДНҚ учаскесі – **Yellow** арнасы бойынша, *M.genitalium* ДНҚ учаскесі – **Orange** арнасы бойынша, *M.hominis* ДНҚ учаскесі – **Crimson** арнасы бойынша

детекцияланады. ІБҮ ДНҚ амплификациясы өнімінің жинақталуы **Red** арнасы бойынша детекцияланады.

Chlamydia trachomatis, *Ureaplasma (Parvum және Urealyticum түрлері)*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* ДНҚ және ІБҮ ДНҚ фрагменттері амплификациясының нәтижелері талданады. Нәтижелер флуоресценция қисығының сәйкесінше деңгейде белгіленген шектік сызықпен қиылысуының болуына (немесе жоқ болуы) интерпретацияланады, бұл берілген ДНҚ сынамасы үшін нәтижелер кестесіндегі сәйкесінше бағанда «Ct» шектік циклы мәнінің бар болуын (немесе жоқ болуын) анықтайды.

1. Бас мәзірден *Analysis/ Талдау* мәзір жұлдызшасын таңдаңыз, төмендегі мәзірден *Quantitation/ Сандық* қосымша бетін таңдаңыз. Green арнасының мәліметтері үшін, «*Cycling A Green*» жолағын, Yellow арнасының мәліметтері үшін, «*Cycling A Yellow*» жолағын, Orange арнасының мәліметтері үшін, «*Cycling A Orange*» жолағын, Crimson арнасының мәліметтері үшін, «*Cycling A Crimson*» жолағын, сосын Red арнасының мәліметтері үшін, «*Cycling A Red*» жолағын таңдай отырып операция жүргізіңіз
2. Green арнасы бойынша детекцияланатын *C.trachomatis* ДНҚ амплификациясы нәтижесін талдау. **Green** арнасы бойынша қалыпқа түсірілген флуоресценция қисықтарының кестені тінтуір түймесімен шертіңіз. Мәзірдегі кестенің үстінде *Dynamic Tube/ Динамик.фон* түймесі қосылуы тиіс (үнсіз келісіммен қойылған). Шектік сызық деңгейін беріңіз – *CT Calculation/ CT есенмен шығару* мәзірінен *Threshold/Шек* жолағына **0,1** мәнін енгізіңіз. *Outlier Removal/ Қалдықтарды жою* түймесін басып, мәтін жолағына **0** (0 %) мәнін енгізіңіз. Төменде кестенің астында Green арнасы бойынша әр үлгіге арналған («*Quant. Resultes – Cycling A. Green*»)/«*Сандық нәтижелер – Cycling A. Green*») *Ct* шектік циклының мәні көрсетілген нәтижелер кестесі пайда болады.
3. Yellow арнасы бойынша детекцияланатын *Ureaplasma* ДНҚ амплификациясы нәтижелерін талдау (*Parvum* және *Urealyticum* түрлері). **Yellow** арнасы бойынша қалыпқа түсірілген флуоресценция қисықтарының кестесіндегі тінтуірдің түймесін шертіңіз. Мәзірде кестенің астында *Dynamic Tube/Динамик. фон* (үнсіз келісіммен қойылған) түймесі қосылуы тиіс. Шектік сызық деңгейін беріңіз – *CT Calculation/ CT есенмен шығару* мәзірінен *Threshold/ Шек* мәтін жолағына **0,1** мәнін енгізіңіз. *Outlier Removal/ Қалдықтарды жою* түймесін басып, мәтін жолағына **5** (5 %) мәнін енгізіңіз. Төменде кестенің астында әр үлгіге арналған Yellow арнасы бойынша («*Quant. Resultes–Cycling A. Yellow*»)/«*Сандық нәтижелер – Cycling A. Yellow*») *Ct* шектік циклының мәні көрсетілген нәтижелер кестесі пайда болады.
4. Orange арнасы бойынша детекцияланатын *M.genitalium* ДНҚ амплификациясы нәтижелерін талдау. **Orange** арнасы бойынша қалыпқа түсірілген флуоресценция қисықтарының кестесіндегі тінтуірдің түймесін шертіңіз. Мәзірде кестенің астында *Dynamic Tube/ Динамик. фон* (үнсіз келісіммен қойылған) түймесі қосылуы тиіс. Шектік сызық деңгейін

беріңіз – *CT Calculation/ CT Ecenmen шығару* мәзірінен *CT Threshold/ Шек* мәтін жолағына **0,1** мәнін енгізіңіз. *Outlier Removal/ Қалдықтарды жою* түймесін басып, мәтін жолағына **5** (5 %) мәнін енгізіңіз. Төменде кестенің астында әр үлгі үшін Orange арнасы бойынша («*Quant. Resultes – Cycling A. Orange*»)/«*Сандық нәтижелер – Cycling A. Orange*») *Ct* шектік циклының мәні көрсетілген нәтижелер кестесі пайда болады.

5. *Crimson* арнасы бойынша детекцияланатын *M.hominis* ДНҚ амплификациясы нәтижелерін талдау. **Crimson арнасы бойынша** қалыпқа түсірілген флуоресценция қисықтарының кестесіндегі тінтуірдің түймесін шертіңіз. Мәзірде кестенің астында *Dynamic Tube/ Динамик. фон* (үнсіз келісіммен қойылған), *Slope Correct /Бағытты реттеу* түймесін қосыңыз. Шектік сызық деңгейін беріңіз – мәзірге *CT Calculation/ CT ecenmen шығару мәзірінен Threshold/ Шек* мәтін жолағына **0,1** мәнін енгізіңіз. *Outlier Removal/ Қалдықтарды жою* түймесін басып, мәтін жолағына **10** (10 %) мәнін енгізіңіз. Төменде кестенің астында әр үлгіге арналған *Crimson* («*Quant. Resultes – Cycling A. Crimson*»)/«*Сандық нәтижелер – Cycling A. Crimson*») арнасы бойынша *Ct* шектік циклының мәні көрсетілген нәтижелер кестесі пайда болады.
6. *Red* арнасы бойынша детекцияланатын ДНҚ *IBU* амплификациясы нәтижелерін талдау. **Red арнасы бойынша** қалыпқа түсірілген флуоресценция қисықтарының кестесіндегі тінтуірдің түймесін шертіңіз, *Dynamic Tube/ Динамик.фон* түймесі кестесінің үстіндегі мәзірге(үнсіз келісіммен қойылған), \ *Slope Correct/ Бағытты реттеу* түймесін, сосын *Outlier Removal/ Қалдықтарды жою* түймесін қосыңыз және мәтін жолағына **5** (5 %) мәнін енгізіңіз. *CT Calculation/ CT ecenmen шығару мәзіріне* шектік сызық деңгейін беру керек, *Threshold/ /Шек* мәтін жолағына **0,07** мәнін енгізіңіз. Төмендегі кестенің астында әр үлгі үшін *Red* арнасы бойынша шектік цикл мәні көрсетілген нәтижелер кестесі пайда болады («*Quant. Resultes – Cycling A. Red*»)/«*Сандық нәтижелер – Cycling A. Red*»).

Нәтижелер келесідегідей интерпретацияланады:

- Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесіндегі *Green* арнасы бойынша («*Quant. Resultes – Cycling A. Green*»)/«*Сандық нәтижелер – Cycling A. Green*») *Ct* шектік циклының мәні анықталса, *Chlamydia trachomatis* ДНҚ-сының анықталғаны. Бұл орайда берілген сынама флуоресценциясының қисығы флуоресценцияның экспоненциальді жоғарылауы тән учаскедегі шектік түзуді қиып өтуі тиіс.
- Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесіндегі *Yellow* арнасы бойынша («*Quant. Resultes – Cycling A. Yellow*»)/«*Сандық нәтижелер – Cycling A. Yellow*») *Ct* шектік циклының мәні анықталса, *Ureaplasma (Parvum және Urealyticum түрлері)* ДНҚ-сының анықталғаны. Бұл орайда берілген сынама флуоресценциясының қисығы флуоресценцияның экспоненциальді жоғарылауы тән учаскедегі шектік түзуді қиып өтуі тиіс.

- Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесіндегі Orange арнасы бойынша («*Quant. Resultes – Cycling A. Orange*»)/«Сандық нәтижелер – *Cycling A. Orange*») *Ct* шектік циклының мәні анықталса, ***Mycoplasma genitalium* ДНҚ-сының анықталғаны.** Бұл орайда берілген сынама флуоресценциясының қисығы флуоресценцияның экспоненциальді жоғарылауы тән учаскедегі шектік түзуді қиып өтуі тиіс.
 - Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесіндегі Crimson арнасы бойынша («*Quant. Resultes – Cycling A. Crimson*»)/«Сандық нәтижелер – *Cycling A. Crimson*») *Ct* циклының шектік мәні анықталса, ***Mycoplasma hominis* ДНҚ-сының анықталғаны.** Бұл орайда берілген сынама флуоресценциясының қисығы флуоресценцияның экспоненциальді жоғарылауы тән учаскедегі шектік түзуді қиып өтуі тиіс.
 - Егер берілген сынама үшін нәтижелер кестесіндегі Green, Yellow, Orange және Crimson арналары бойынша *Ct* шектік циклының мәні анықталмаса (жоқ болса) (флуоресценция қисықтары шектік сызықты кесіп өтпейді), ал нәтижелер кестесінде Red арнасы бойынша *Ct* шектік циклының 33-тен аспайтын мәні анықталса, ***Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma (Parvum және Urealyticum түрлері)*, *Mycoplasma genitalium* және *Mycoplasma hominis* ДНҚ-сының анықталмағаны.**
 - Егер берілген сынама детекциялауға арналған Red арнасы бойынша *Ct* циклының шектік мәні анықталмаса (жоқ болса) немесе 33-тен асса Green, Yellow, Orange және Crimson арналары бойынша *Ct* циклының шектік мәні 35-тен асатын болса, талдау нәтижесі нақты емес. Бұл жағдайда берілген сынама үшін қайтадан ПТР жүргізу қажет. Егер осыған ұқсас нәтиже қайтадан алынса, сәйкесінше клиникалық үлгіні зерттеуді ДНҚ бөліп алу сатысынан бастап қайталау қажет.
7. Егер ДНҚ бөліп алу амплификациясының оң және теріс бақылаулары үшін, бақылау реакцияларының нәтижелерін бағалау кестесіне сәйкес оң нәтижелер алынса, нәтиже нақты болып саналады (1 кестені қараңыз).

1 кесте.

Бақылау реакцияларының дұрыс нәтижелері

Бақылау реакциясы	ПТР-зерттеуінің бақыланатын сатысы	Green, Yellow, Orange және Crimson арналары бойынша <i>Ct</i>	Red арнасы бойынша <i>Ct</i>
Ба-	ДНҚ бөліп алу	Мәні жоқ	33-тен аз мән анықталды
Б-	ПТР	Мәні жоқ	Мәні жоқ
Б+	ПТР	35-тен аз мән анықталды	33-тен аз мән анықталды

Болуы мүмкін қателер.

Флуоресценция сызбасында ДНҚ сынамасы үшін анықталған шектік сызықпен қиылысуы экспоненциальді көтерілуіне тән бөлігі жоқ (сызбашамамен тік сызық түрінде келеді) оң нәтиже. Бұл шектік сызық деңгейінің немесе негізгі сызықты есептеу параметрлерінің дұрыс

берілмегенін көрсетеді. Мұндай нәтиже оң нәтиже ретінде қарастырылмауы тиіс. Егер ол шектік сызық деңгейі дұрыс кезде алынса, бұл үлгі үшін қайтадан ПТР жүргізу қажет.

Реагенттер жинағын утилизациялау

Реагенттер жинағын утилизациялауды СП 2.1.7.728-99-ға сәйкес жүргізеді.

Жарамдылық мерзімі

Сақтау мерзімі - 9 ай.

Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін қолдануға болмайды.

Сақтау шарттары

Реагенттер жинағын 2°C-ден 8°C-ге дейінгі температурада сақтау керек. ПТР-қоспа-1-FL C.trachomatis / Ureaplasma/ M. genitalium/M.hominis-ті жарықтан қорғалған жерде сақтау керек. ПТР-қоспа-2-FRT мен полимеразаны (TaqF) минус 16 °C-ден аспайтын температурада сақтау керек.

Қысқарту тізімі

Осы нұсқаулықта келесі қысқартылған сөздер мен мәндері қолданылады:

ПТР	Полимеразды тізбекті реакция
ЖЖБИ	Жыныс жолымен берілетін инфекциялар
ОБҮ	Оң бақылау үлгісі
ІБҮ-FL	Жинаққа арналған ішкі бақылау үлгісі гибридизациялық-флуоресцентті детекциясымен
ТБҮ	Теріс бақылау үлгісі
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

Тасымалдау

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

Босатылу шарттары

Емдеу-профилактикалық және санитарлық-профилактикалық мекемелерге арналған.

Баспа өнімдерінде пайдаланылатын символдар

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

Осыған сәйкес медициналық мақсаттағы бұйым өндірілген нормативтік құжат

Клиникалық үлгілерден алынған сынамаларда Chlamydia trachomatis, Ureaplasma (Parvum және Urealyticum түрлері) Mycoplasma genitalium және Mycoplasma hominis ДНҚ-сын гибридизациялық-флуоресценттік детекциялаумен полимеразалы тізбекті реакция әдісімен бір мезгілде анықтауға арналған «АмплиСенс® C.trachomatis/Ureaplasma/M.genitalium/M.hominis МУЛЬТИПРАЙМ-FL» реагенттер жинағы, FRT нұсқасы

Техникалық шарттары ТШ 9398-092-01897593-2009.

Өндіруші

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

Реагенттер жинағының сапасына қатысты шағымдарды дайындаушы кәсіпорынға Ресейтұтынуқадағалау Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ (111123,

Мәскеу қ., Новогиреевская к-сі, 3а үй) шағымдармен жұмыс істейтін және оқуды ұйымдастыратын бөлімге жіберіңіз (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

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

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

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