

Қазақстан Республикасы
Денсаулық сақтау министрлігінің
Фармация комитеті төрағасының
2019 жылғы «27» қыркүйек
№ N023852 бұйрығымен
БЕКІТІЛГЕН

Медициналық мақсаттағы бұйымды
медицинада қолдану жөніндегі
нұсқаулық

Медициналық мақсаттағы бұйымның атауы

Клиникалық материалдан D гепатиті вирусының (*HDV*) РНҚ гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® *HDV-FL*» реагенттер жинағы

Бұйымның құрамы мен сипаттамасы

Тағайындалуы

«АмплиСенс® *HDV-FL*» реагенттер жинағы клиникалық материалда D гепатиті вирусының (*HDV*) РНҚ гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған. ПТР-ға арналған материал қызметін қан плазмасынан бөліп алынған РНҚ сынамалары атқарады.

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

Әдістің принципі

Тестілеу принципі ІБҮ-мен бірге қан плазмасынан РНҚ экстракциялауға, РНҚ кері транскрипциялау және «ақырғы нүкте» бойынша (FER форматы) немесе «нақты уақыт» режимінде (FRT форматы) гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясын жүргізуге негізделеді. FAM флуорофорына сәйкес келетін арна бойынша, ІБҮ амплификациялау өнімі детекцияланады. JOE флуорофорына сәйкес келетін арна бойынша, *HDV* жДНҚ амплификациялау өнімі детекцияланады. *HDV-rec* ОБҮ экстракциялау сатысының оң бақылау үлгісі FAM (ІБҮ) және JOE (*HDV*) флуорофорларына сәйкес келетін арналар бойынша детекцияланады. Амплификацияға арналған бақылау үлгісі – ІБҮ жДНҚ *HDV-FL* – *HDV* және ІБҮ үшін кешенді болып табылады және осы сияқты,

¹ Еуропа Одағының 98/79/ЕО Директивасына сәйкес.

FAM (ІБҮ) және JOE (HDV) флуорофорларына сәйкес келетін арналар бойынша детекцияланады.

Талдамалық сипаттамалары

Талдамалық сезімталдығы

FER форматы үшін:

- экстракция көлемі 100 мкл болғанда – 500 ХБ/мл;
- экстракция көлемі 200 мкл болғанда – 250 ХБ/мл;
- экстракция көлемі 1000 мкл болғанда – 50 ХБ/мл;

FRT форматы үшін:

- экстракция көлемі 100 мкл болғанда – 100 ХБ/мл;
- экстракция көлемі 200 мкл болғанда – 50 ХБ/мл;
- экстракция көлемі 1000 мкл болғанда – 10 ХБ/мл.

Талдамалық спецификалылығы

Реагенттер жинағының талдамалық спецификалылығын бағалау реакцияға келесі организмдер мен вирустардың: А гепатиті вирусы, В гепатиті вирусы, С гепатиті вирусы, адамның иммунтапшылығы вирусы, цитомегаловирус, Эпштейн-Барр вирусы, 1, 2 типті қарапайым герпес вирусы, желшешек вирусы, адамның 6, 8 типті герпесі вирусы, парвовирус В19, кене энцефалиті вирусы, батыс Ніл қызбасы вирусы, 2, 3, 7 типті аденовирус, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Homo sapiens* геномдық ДНК/РНК қосу арқылы жүргізілді.

Аталған организмдер мен вирустар үшін айқаспалы реакциялар тіркелмеген.

Жинақтың құрамы

FER НҰСҚАСЫ

Реагенттер жиынтығы «РИБО-преп» вариант 50 – клиникалық материалдан РНК/ДНК бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизиске арналған ерітінді	Көгілдір түсті мөлдір сұйықтық ²	15	1 құты
Преципитациялауға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 3	Мөлдір түссіз сұйықтық	25	1 құты

² Лизистейтін ерітіндіні, лизиске арналған ерітіндіні және жуып-шаюға арналған 1 ерітіндіні 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтағанда кристалдар түріндегі тұнба түзілуі мүмкін

Жуып-шаюға арналған ерітінді 4	Мөлдір түссіз сұйықтық	10	1 құты
РНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	4 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 50 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген.

Жиынтықталымының 1 түрінің құрамына 2 дана мөлшерінде кіреді.

«РИБО-сорб» реагенттер жиынтығы 50 нұсқасы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизиске арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық ²	22,5	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 1	Мөлдір түссіз сұйықтық ²	20	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 3	Мөлдір түссіз сұйықтық	50	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 4	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	1 құты
Сорбент	Ақ түсті суспензия	1,25	1 пробирка
РНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	5 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 50 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген.

Жиынтықталымының 2 түрінің құрамына 2 дана мөлшерінде кіреді.

«МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығы 100-1000 нұсқасы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизиске арналған ерітінді МАГНО-сорб	Мөлдір түссіз сұйықтық ³	70	4 құты
Компонент А	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,6	4 пробирка
Жуып-шаюға арналған ерітінді 5	Мөлдір түссіз сұйықтық ³	60	4 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 6	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	4 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 7	Мөлдір түссіз сұйықтық	6,0	4 құты
Магнеттелген силика	Қара түсті суспензия	0,9	4 пробирка

³ Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі мен жуып-шаюға арналған 5 ерітіндіні 20 °С-ден төмен температурада сақтағанда кристалдар түріндегі тұнба түзілуі мүмкін.

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Элюциялауға арналған буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	12 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 100 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген. Зерттелетін материалдың көлемі 1000 мкл.

Жиынтықталымының 3 түрінің құрамына кіреді.

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FEP нұсқасы – D гепатиті вирусының (*HDV*) РНҚ кері транскрипциялау және «ақырғы нүкте бойынша» гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясын жүргізуге арналған реагенттер жиынтығы – **құрамында:**

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
RT-G-mix-2	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,015	4 пробирка
КТ-ПТР-1 қоспа-1-FL HDV	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	4 пробирка
КТ-ПТР-1 қоспа-2-FEP/FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	4 пробирка
ПТР-ға арналған минералды май	Түссіз тұтқыр сұйықтық	4,0	1 құты
Полимераза (TaqF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,02	4 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,01	4 пробирка
ОБУ жДНҚ HDV-FL	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	4 пробирка
Элюциялауға арналған буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, кері транскрипциялау және амплификациялаудың 112 реакциясын жүргізуге есептелген.

Жиынтықталымының 1, 2, 3, 4 түрлерінің құрамына кіреді.

Реагенттер жиынтығына экстракциялау сатысының бақылау үлгілері қоса беріледі:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ТБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	4 пробирка
HDV-rec ОБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,06	4 пробирка
ICZ-rec ІБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,28	4 пробирка

FRT НҮСҚАСЫ

«РИБО-преп» реагенттер жиынтығы 50 нұсқасы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизиске арналған ерітінді	Көгілдір түсті мөлдір сұйықтық ⁴	15	1 құты
Преципитациялауға арналған ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 3	Мөлдір түссіз сұйықтық	25	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 4	Мөлдір түссіз сұйықтық	10	1 құты
РНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	4 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 50 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген.

Жиынтықталымының 1 түрінің құрамына 2 дана мөлшерінде кіреді.

«РИБО-сорб» реагенттер жиынтығы 50 нұсқасы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистейтін ерітінді	Мөлдір түссіз сұйықтық ¹⁰	22,5	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 1	Мөлдір түссіз сұйықтық ¹⁰	20	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 3	Мөлдір түссіз сұйықтық	50	1 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 4	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	1 құты
Сорбент	Ақ түсті суспензия	1,25	1 пробирка
РНҚ-буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,5	5 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 50 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген.

Жиынтықталымының 2 түрінің құрамына 2 дана мөлшерінде кіреді.

⁴ Лизистейтін ерітіндіні, лизиске арналған ерітіндіні және жуып-шаюға арналған 1 ерітіндіні 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтағанда кристалдар түріндегі тұнба түзілуі мүмкін.

«МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығы 100-1000 нұсқасы – клиникалық материалдан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға арналған реагенттер жиынтығы құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі	Мөлдір түссіз сұйықтық ⁵	70	4 құты
Компонент А	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,6	4 пробирка
Жуып-шаюға арналған ерітінді 5	Мөлдір түссіз сұйықтық ¹¹	60	4 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 6	Мөлдір түссіз сұйықтық	20	4 құты
Жуып-шаюға арналған ерітінді 7	Мөлдір түссіз сұйықтық	6,0	4 құты
Магнеттелген силика	Қара түсті суспензия	0,9	4 пробирка
Элюциялауға арналған буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	12 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, 100 сынамадан РНҚ/ДНҚ бөліп алуға есептелген. Зерттелетін материалдың көлемі 1000 мкл.

Жиынтықталымының 3 түрінің құрамына кіреді.

«ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT нұсқасы – D гепатиті вирусының (HDV) РНҚ кері транскрипциялау және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялау реакциясын жүргізуге арналған реагенттер жиынтығы – құрамында:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
RT-G-mix-2	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,015	4 пробирка
КТ-ПТР-1 қоспа-1-FL HDV	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,3	4 пробирка
КТ-ПТР-1 қоспа-2-FER/FRT	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,2	4 пробирка
Полимераза (ТақF)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,02	4 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMV)	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,01	4 пробирка
ПКО жДНҚ HDV-FL	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,1	4 пробирка
Элюциялауға арналған буфер	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	2 пробирка

Реагенттер жиынтығы бақылауларды қоса, кері транскрипциялау және амплификациялаудың 112 реакциясын жүргізуге есептелген.

⁵ Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі мен жуып-шаюға арналған 5 ерітіндіні 20 °С-ден төмен температурада сақтағанда кристалдар түріндегі тұнба түзілуі мүмкін.

Жиынтықталымының 1, 2, 3, 4 түрлерінің құрамына кіреді.

Реагенттер жиынтығына экстракциялау сатысының бақылау үлгілері қоса беріледі:

<i>Реактив</i>	<i>Сипаттамасы</i>	<i>Көлемі, мл</i>	<i>Саны</i>
ТБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	1,2	4 пробирка
HDV-rec ОБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,06	4 пробирка
ICZ-rec ІБҮ	Мөлдір түссіз сұйықтық	0,28	4 пробирка

Қолданылу саласы

Клиникалық зертханалық диагностикада.

Жиынтықталымы

«АмплиСенс® HDV-FL» реагенттер жинағы FER және FRT нұсқаларында жиынтықталымының келесі түрлерімен шығарылады:

FER форматы

Реагенттер жинағы жиынтықталымының 1 түрінде шығарылады:

1 түріне «РИБО-преп» реагенттер жиынтығы 50 нұсқасы– 2 дана, «ПТР-жиынтық» FER нұсқасы кіреді*

2 түріне «РИБО-сорб» реагенттер жиынтығы 50 нұсқасы – 2 дана, «ПТР-жиынтық» FER нұсқасы кіреді.

3 түріне «МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығы 100-1000 нұсқасы, «ПТР-жиынтық» FER нұсқасы кіреді.

4 түріне «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FER нұсқасы кіреді.

5 түріне көтерме сатуға арналған, жекелеген реагенттер бойынша буылып-түйілген, көтерме бумасында реагенттер таңбасы бар реагенттер жинақтары кіреді.

Жиынтықталымының 1 түрі клиникалық материалдан преципитациялау әдісімен РНҚ экстракциялауды, РНҚ кері транскрипциялауды жүргізуді және «ақырғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды қоса, толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 2 түрі клиникалық материалдан силикагельге сіндіру әдісімен РНҚ экстракциялауды, РНҚ кері транскрипциялауды жүргізуді және «ақырғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды қоса, толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 3 түрі клиникалық материалдан магниттік сепарациялаумен РНҚ экстракциялауды, РНҚ кері транскрипциялауды жүргізуді және «ақырғы нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды қоса, толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 4 түрі РНҚ кері транскрипциялауды және «ақырғы

нүкте» бойынша гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды жүргізуге арналған. Толық ПТР-зерттеуін жүргізу үшін, РНҚ/ДНҚ экстракциялауға арналған, РоспотребнадзорЭпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет.

Жиынтықталымының 5 түрі өндірістік мақсаттарға арналған, кейіннен тапсырыс берушінің тілінде және жинақтар бойынша жиынтықталуына қарай таңбаланады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Жиынтықталымының 5 түрі тек, РоспотребнадзорЭпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ бекіткен регламентке сәйкес пайдаланылады.

FRT форматы

Реагенттер жинағы жиынтықталымының 1 түрінде шығарылады:

1 түріне «РИБО-преп» реагенттер жиынтықтары 50 нұсқасы – 2 дана, «ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы кіреді.

2 түріне «РИБО-сорб» реагенттер жиынтықтары 50 нұсқасы – 2 дана, «ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы кіреді.

3 түріне «МАГНО-сорб» реагенттер жиынтықтары 100-1000 нұсқасы, «ПТР-жиынтық» FRT нұсқасы кіреді.

4 түріне «ПТР-жиынтық» реагенттер жиынтығы FRT нұсқасы кіреді.

5 түріне көтерме сатуға арналған, жекелеген реагенттер бойынша буылып-түйілген, көтерме бумасында реагенттер таңбасы бар реагенттер жинақтары кіреді

Жиынтықталымының 1 түрі клиникалық материалдан преципитациялау әдісімен РНҚ экстракциялауды, РНҚ кері транскрипциялауды жүргізуді және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды қоса, толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 2 түрі клиникалық материалдан силикагельге сіндіру әдісімен РНҚ экстракциялауды, РНҚ кері транскрипциялауды жүргізуді және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды қоса, толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 3 түрі клиникалық материалдан магниттік сепарациялаумен РНҚ экстракциялауды, РНҚ кері транскрипциялауды жүргізуді және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды қоса, толық ПТР-зерттеуін жүргізуге арналған.

Жиынтықталымының 4 түрі РНҚ кері транскрипциялауды және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен жДНҚ амплификациялауды жүргізуге арналған. Толық ПТР-зерттеуін жүргізу үшін, РНҚ/ДНҚ экстракциялауға арналған, РоспотребнадзорЭпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жиынтықтарын пайдалану қажет.

Жиынтықталымының 5 түрі өндірістік мақсаттарға арналған, кейіннен тапсырыс берушінің тілінде және жинақтар бойынша жиынтықталуына қарай таңбаланады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Жиынтықталымының 5 түрі тек, Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ бекіткен регламентке сәйкес пайдаланылады.

Сақтық шаралары

Жұмыс биологиялық материалда инфекциялық аурулар қоздырғыштарының бар-жоқтығын анықтайтын молекулалық-биологиялық (ПТР) зерттеуді жүргізетін зертханада, СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III–IV тобына жататын микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздік» санитариялық-эпидемиологиялық ережелерін, СанЕжН 2.1.7.2790-10 «Медициналық қалдықтармен жұмыс жасауға қойылатын санитариялық-эпидемиологиялық талаптар» және ӘН 1.3.2569-09 «Құрамында патогенділіктің I–IV топтарына жататын микроорганизмдер бар материалмен жұмыс жасауда нуклеин қышқылдарын амплификациялау әдістерін пайдаланатын зертханалардың жұмысын ұйымдастыру» әдістемелік нұсқауларын сақтай отырып жүргізілуі тиіс.

Жұмыс жасағанда әрдайым келесі талаптарды сақтау қажет:

- Зерттелетін үлгілерді инфекциялық-қауіпті ретінде қарастыру, жұмыс жасау мен сақтауды СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III–IV тобына жататын микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздікке» сәйкес ұйымдастыру керек.
- Төгілген үлгілерді СЕ 1.3.2322-08 «Патогенділіктің (қауіптіліктің) III–IV тобына жататын микроорганизмдермен және паразиттік аурулардың қоздырғыштарымен жұмыс жасаудағы қауіпсіздікке» сәйкес дезинфекциялайтын құралдарды пайдаланып тазалау және дезинфекциялау керек.
- Зертханалық үдеріс бір бағытта жүргізілуі тиіс. талдау бөлек орынжайларда (аймақтарда) жүргізіледі. Жұмысты Экстракциялау Аймағында бастап, Амплификациялау және Детекциялау Аймағында жалғастыру керек. Үлгілерді, жабдықтар мен реагенттерді үдерістің алдыңғы сатысы жүргізілген аймаққа қайта әкелуге болмайды.
- Пайдаланылмаған реагенттерді, жарамдылық мерзімі өтіп кеткен реагенттерді, сондай-ақ пайдаланылған реагенттерді, қаптамасын, биологиялық материал жұққан материалдарды, құралдар мен заттарды қоса, биологиялық материалды, СанЕжН 2.1.7.2790-10 «Медициналық қалдықтармен жұмыс жасауға қойылатын санитариялық-эпидемиологиялық талаптар» талаптарына сәйкес кетіру керек.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Амплификациялаудан кейінгі қалдықтарды (ішінде ПТР өнімдері бар пробиркаларды) жою кезінде пробиркаларды ашуға және ішіндегісін шашыратуға болмайды, өйткені бұл зертханалық аймақтың, жабдықтар мен реагенттердің ПТР өнімдерімен контаминациялануына алып

келуі мүмкін.

- Жинақты қатаң түрде тағайындалуы бойынша, осы нұсқаулыққа сәйкес қолдану керек.
- Жинақпен жұмыс жасауға тек арнайы үйретілген қызметкерге ғана рұқсат беру керек.
- Жинақты жарамдылық мерзімі өткеннен кейін пайдалануға болмайды.
- Үлгілермен және реактивтермен жұмыс жасау кезінде бір реттік қолғаптарды, зертханалық халаттарды пайдалану, көзді қорғау керек. Жұмыс аяқталғаннан кейін қолды әбден жуу керек.
- Буларының деммен ішке тартылуын, теріге, көзге және шырышты қабыққа тиюін болдырмау керек. Жұтып қойған жағдайда зиянды. Тиіп кеткен жағдайда, зақымданған жерді дереу сумен жуып тастау, қажет болған жағдайда медициналық көмекке жүгіну керек.
- Материалдардың қауіпсіздігі жөніндегі парақтарды (MSDS – material safety data sheet) сұрату бойынша алдыруға болады.

Қосымша материалдар және жабдықтар

1 аймақ. Клиникалық материалдан РНҚ экстракциялау

1. Ламинарлық бокс.
2. Центрифуга/вортекс.
3. Көлемдері айнымалы автоматты дозаторлар.
4. Полипропиленнен жасалған, бұралатын немесе тығыз жабылатын, көлемі 1,5 мл бір реттік пробиркалар.
5. Сүзгісі бар, 200 мкл-ге дейінгі және 1000 мкл-ге дейінгі бір реттік ұштықтар.
6. Ұштықтар мен көлемі 1,5 мл пробиркаларға арналған штативтер.
7. 2-ден 8 °С-ге дейінгі тоңазытқыш.
8. ЭН 1.3.2569-09 бойынша бөлек халат, қалпақ, аяқ киім және бір реттік қолғаптар.
9. Дезинфекциялайтын ерітінді құйылған ыдыс.
«РИБО-сорб» (ТШ 9398-004-01897593-2008) немесе «РИБО-преп» (ТШ 9398-071-01897593-2008) реагенттер жиынтығын пайдаланғанда:
 1. «Эппендорф» типті пробиркаларға арналған, 25-тен 100 °С-ге дейінгі термостат.
 2. «Эппендорф» типті пробиркаларға арналған, 12 мың g дейінгі микроцентрифуга.
 3. Тұнбаүстілік сұйықтықты шығарып тастауға арналған қармағыш колбасы бар медициналық вакуумдық сорғыш.
 4. 200 мкл дейінгі бір реттік ұштықтар.
 5. Бір реттік 10-20 мл құты.«МАГНО-сорб» (ТШ 9398-106-01897593-2012) реагенттер жиынтығын пайдаланғанда:
 1. Көлемі 5 мл, диаметрі 12 мм пробиркаларға арналған, 25-тен 100 °С-ге дейінгі термостат.

2. «Эппендорф» типті пробиркаларға арналған, 25-тен 100 °С-ге дейінгі термостат.
3. «Эппендорф» типті 1,5 мл пробиркаларға арналған магнитті штатив.
4. Көлемі 5 мл, диаметрі 12 мм пробиркаларға арналған магнитті штатив.
5. Тұнбаүстілік сұйықтықты шығарып тастауға арналған қармағыш колбасы бар медициналық вакуумдық сорғыш.
6. Полипропиленнен жасалған, бұралатын немесе тығыз жабылатын көлемі 1,5 мл бір реттік пробиркалар.
7. Полипропиленнен немесе полистирольден жасалған, көлемі 5 мл дейінгі, диаметрі 12 мм, түбі дөңгелек бір реттік пробиркалар.
8. Көлемі 5 мл дейінгі, диаметрі 12 мм пробиркаларға арналған, полипропиленнен жасалған бір реттік қақпақтар.
9. 1000-нан 5000 мкл дейін дозалау мүмкіндігімен, көлемі айнымалы автоматты дозатор.
10. 200 мкл дейінгі, 1000 мкл дейінгі және 5000 мкл дейінгі бір реттік ұштықтар.

Нуклеин қышқылдарын экстракциялауға арналған автоматты станцияларды пайдаланғанда:

1. РНК/ДНК экстракциялауға арналған автоматты станция (мысалы, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
2. Автоматты станцияға арналған реактивтер мен шығын материалдарының жинағы (мысалы NucliSENS easyMAG (NucliSens экстракциялауға арналған 1 буфер, NucliSens экстракциялауға арналған 2 буфер, NucliSens экстракциялауға арналған 3 буфер, лизистеуге арналған NucliSens буфері, Магнеттелген NucliSens силикасы) (bioMérieux, Франция)).
3. Мысалы, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) автоматты станциясы үшін «ЕМ-плюс» реагенттер жиынтығы (РоспотребнадзорЭпидемиология ОҒЗИ ФБҒФМ, Ресей) қажет болады

2 аймақ. Кері транскрипциялау, ПТР және амплификация өнімдерін гибридизациялық-флуоресцентті детекциялау реакциясын жүргізу

1. Ауа ортасы бактериясыз боксы (ПТР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Көлемдері айнымалы автоматты дозаторлар.
4. Штативтердегі, сүзгісі бар, 200 мкл дейінгі бір реттік ұштықтар.
5. Көлемі 0,2 мл немесе 0,5 мл пробиркаларға (пайдаланылып отырған реагенттер жиынтықтарына сәйкес) арналған штативтер.
6. 2-ден 8 °С-ге дейінгі тоңазытқыш.
7. ЭН 1.3.2569-09 бойынша бөлек халат, қалпақ, аяқ киім және бір реттік қолғаптар.
8. Ұштықтарды тастауға арналған ыдыс.

«ПТР-жиынтықпен» жұмыс жасағанда (FER нұсқасы):

9. Бағдарламаланатын амплификатор (мысалы, «Терцик» («ДНК-Технология», Ресей), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, АҚШ), MaxyGene

(Ахуген, АҚШ) немесе ұқсастары).

10. Флуоресцентті ПТР-детектор (мысалы, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Ресей), «Джин-2» (б.ж. нұсқасы 4.4i-ден төмен емес) («ДНК-Технология», Ресей) немесе ұқсастары).

«ПТР-жиынтықпен» жұмыс жасағанда (FRT нұсқасы):

11. Бағдарламаланатын роторлық типті амплификатор (мысалы, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)) немесе планшеттік типті амплификатор (мысалы, iCycler iQ5 (Bio-Rad, АҚШ), Mx3000P (Stratagene, АҚШ)) және Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒФМ осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарында ұсынғандар.

12. ПТР-ға арналған полипропиленнен жасалған, көлемі 0,2 мл немесе 0,1 мл бір реттік пробиркалар:

а) ПТР-ға арналған, көлемі 0,2 мл, планшеттік типтегі аспапты пайдаланғанда - қақпағы дөңес, жұқа қабырғалы пробиркалар;

б) ПТР-ға арналған, көлемі 0,2 мл, роторлық типтегі аспапты пайдаланғанда - қақпағы жайпақ, жұқа қабырғалы пробиркалар.

Зерттелетін материалды алу, тасымалдау және сақтау

Жұмысты бастар алдында Роспотребнадзор Эпидемиология ФБҒФМ ОҒЗИ әзірлеген «ПТР-диагностикаға арналған клиникалық материалды алу, тасымалдау және сақтау» Мәскеу, 2008 ж. әдістемелік ұсынымдарымен танысып шығу керек.

ПТР-зерттеуін жүргізу үшін шеткері қанның плазмасы пайдаланылады. Қан таңертеңгілік аш қарында, ішінде антикоагулянт ретінде ЭДТА ерітіндісі бар пробиркаға алынады. Қан құйылған жабық пробирканы бірнеше рет аударып-төңкереді. Қан алған сәттен бастап 6 сағат ішінде плазмасын алу және жаңа пробиркаға ауыстырып құю керек. Ол үшін қан құйылған пробирканы 800-1600 g кезінде 20 минут центрифугалайды. Плазманы 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 3 тәуліктен асырмай және – минус 68 °С-ден аспайтын температурада ұзағырақ сақтауға болады.

Жекелеген жағдайларда, қан сарысуын пайдалануға жол беріледі. Бұл материал үшін реагенттер жинағының талдамалық сезімталдығы сақталады, алайда, ұйындыны ретракциялау кезінде вирус бөлшектерінің бірге тұнуына байланысты, клиникалық сезімталдығы айтарлықтай төмендеуі мүмкін. Сарысуды 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 3 тәуліктен асырмай және – минус 68 °С-ден аспайтын температурада ұзағырақ сақтауға болады

FER нұсқасы

ПТР-зерттеуін жүргізу

ПТР-зерттеуі келесі сатылардан тұрады:

- Зерттелетін үлгілерден РНҚ экстракциялау.
- Кері транскрипциялау және амплификациялау реакциясын жүргізу.

- Амплификация өнімдерін «ақырғы нүкте» бойынша флуоресценттік детекциялау.
- Нәтижелерді интерпретациялау

Зерттелетін үлгілерден РНҚ экстракциялау

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! РНҚ-мен жұмыс жасау үшін тек пластиктен жасалған бір реттік стерильді, арнайы «RNase-free», «DNase-free» таңбалары бар шығын материалдарын пайдалану қажет.

РНҚ экстракциялау үшін Роспотребнадзор Эпидемиология ФБҒМ ОҒЗИ ұсынған реагенттер жиынтықтары пайдаланылады:

- «**РИБО-преп**» реагенттер жиынтығын пайдаланғанда жұмыс тәртібін **1 қосымшадан** ««РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялауды» қараңыз.
- «**РИБО-сорб**» реагенттер жиынтығын пайдаланғанда жұмыс тәртібін **2 қосымшадан** ««РИБО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялауды» қараңыз.
- «**МАГНО-сорб**» реагенттер жиынтығын пайдаланғанда 1000 мкл және 200 мкл қан плазмасынан РНҚ экстракциялау үшін жұмыс тәртібін **3 қосымшадан** ««МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялауды» қараңыз.

bioMérieux және Qiagen компанияларының нуклеин қышқылдарын экстракциялауға арналған автоматты станцияларын реагенттер жинағымен бірге пайдаланғанда қан плазмасы мен сарысуының көлемі 0,1 мл-ден 1 мл-ге дейінгі үлгілерінен РНҚ экстракциялауды жүргізуге мүмкіндік беретін хаттамалар мен реагенттерді пайдалану қажет.

Экстракциялау емшарасы автоматты станцияларға берілген нұсқаулыққа сәйкес, сондай-ақ, келесі шарттарды ескере отырып жүргізіледі:

- Бір сынамаға 10 мкл көлемінде экстракциялауды бастағанға дейін үлгілерге немесе лизистейтін ерітіндіге ІБҮ енгізу міндетті шарт болып табылады.
- Үлгіні зерттеулердің бірнеше түрін жүргізу үшін экстракциялаған кезде (*HDV* РНҚ, *HCV* РНҚ, *HGV* РНҚ, *HBV* ДНҚ, АИТВ РНҚ анықтау және *HCV*-генотиптеу үшін нуклеин қышқылдарын бір мезгілде экстракциялауға жол беріледі) барлық қажетті ІБҮ препараттарын (ұқсас) енгізу керек.
- Бағдарламаланатын элюция көлемі – 50-60 мкл (элюция көлемін 100 мкл дейін арттыруға болады).
- NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) автоматты станциясын пайдаланғанда, қосымша «ЕМ-плюс» (Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ өндірген) реагенттер жиынтығын міндетті түрде пайдалану керек. Аспапта (*On-board*) және аспаптан тыс (*Off-board*) лизистеу режимдерін пайдалануға жол беріледі.
- РНҚ экстракциялау аяқталғаннан кейін пробиркаларды аспаптан шығарып алу және КТ-ПТР реакциясын жүргізу керек. Тазартылған РНҚ 2-ден

8 °С-ге дейінгі температурада 4 сағатқа дейін, минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтауға болады.

Сонымен қатар, Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒФМ С гепатиті вирусының (*HCV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HCV*-FL», D гепатиті вирусының (*HDV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HDV*-FL», G гепатиті вирусының (*HGV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HGV*-FL», В гепатиті вирусының (*HBV*) ДНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HBV*-FL» реагенттер жинақтарын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарын қараңыз.

Кері транскрипциялау, амплификациялау және амплификация өнімдерін детекциялау реакциясын жүргізу

Реакция қоспасының жалпы көлемі – 10 мкл РНҚ сынамасының көлемін қоса, 25 мкл.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! РНҚ-мен жұмыс жасағанда тек, пластиктен жасалған бір реттік стерильді, арнайы RNase-free, DNase-free таңбасы бар материалдарды пайдалану қажет.

А. Амплификациялауға арналған пробиркаларды дайындау

Амплификациялауға арналған пробиркалардың таңдалуы пайдаланылып отырған амплификаторға тәуелді.

Пробиркаларға реагенттерді, РНҚ сынамалары мен бақылау үлгілерін енгізу үшін, сүзгілері бар бір реттік ұштықтар пайдаланылады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Реакция қоспасының компоненттерін тура ПТР-зерттеуін жүргізер алдында араластыру керек. Реагенттерді есептеу кестесіне сәйкес, зерттелетін және бақылау үлгілерін тестілеуді қоса, реакциялардың қажетті санына есептеп араластыру қажет (1 кестені қараңыз).

1. Жұмысты бастағанға дейін жинақтың барлық реагенттерін ерітіп, вортексте мұқият араластырыңыз және пробиркалардың қақпақтарындағы тамшыларды тұндырыңыз.
2. Зерттелетін, бақылау үлгілерінің (екі экстракция бақылауы, бір амплификация бақылауы) және «Фон» пробиркаларының санын ескере отырып, амплификациялауға арналған 0,2 мл немесе 0,5 мл пробиркалардың қажетті санын алыңыз. Пробиркалардың типі пайдаланылып отырған аспапқа байланысты таңдалады.
3. **Реакция қоспасын дайындау үшін «Фон» пробиркаларын дайындау қажет болса, бөлек стерильді пробиркада реагенттердіз 1 реакцияға: 10 мкл КТ-ПТР-қоспа-1-FL *HCV*, 5 мкл КТ-ПТР-қоспа-2-FER/FRT және 0,25 мкл RT-G-mix-3 (сонымен қатар 1 кестені, А тармағын қараңыз) есептеп араластыру қажет. Қоспаны вортексте мұқият араластырыңыз және пробирканың қақпағындағы тамшыларды тұндырыңыз.**
4. Екі «Фон» пробиркасына дайындалған қоспаны (полимеразасыз (TaqF) және ТМ-Ревертазасыз (MMlv)) **15 мкл-ден және элюциялауға арналған**

буферді 10 мкл-ден қосып, тамыза отырып араластырыңыз. Үстіне 1 тамшыдан ПТР-ға арналған минералды май тамызыңыз.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Амплификациялауды жүргізгеннен кейін «Фон» үлгілерін при 2-ден 20 °С-ге дейінгі температурада 1 ай бойы сақтауға және бірнеше рет пайдалануға болады. «Фон» пробиркаларын дәл осы сериядағы реагенттер жинағымен, бөліп алуға арналған реагенттердің тура сол типін және ПТР-ға арналған пробиркалардың тура сол типін пайдаланған жағдайда, оларды бірнеше рет пайдалануға жол беріледі.

5. Реакция қоспасының қалған бөлігіне 1 сынамаға есептеп **0,5 мкл полимераза (TaqF) және 0,25 мкл ТМ-Ревертаза (MMIv) (сонымен қатар 1 кестені, А тармағын қараңыз)** қосыңыз. Қоспаны вортексте мұқият араластырыңыз және пробирканың қақпағындағы тамшыларды тұндырыңыз.

Реакция қоспасына қосылған полимераза (TaqF) және ТМ-Ревертаза (MMIv) ферменттерінің 1 кестеде көрсетілген мөлшері, бұған дейін екі «Фон» пробиркасы үшін алынған 30 мкл реакция қоспасын ескере отырып келтірілген.

6. «Фон» үлгілерін қайта пайдаланған жағдайда, бөлек стерильді пробиркада 1 реакцияға: **10 мкл КТ-ПТР-қоспа-1-FL HDV, 5 мкл КТ-ПТР-қоспа-2-FEP/FRT, 0,25 мкл RT-G-mix-2, 0,5 мкл полимераза (TaqF) және 0,25 мкл ТМ-Ревертаза (MMIv) (сонымен қатар 1 кестені, Б тармағын қараңыз)** есептеп араластыру қажет. 1 қоспаны вортексте мұқият араластырыңыз және пробирканың қақпағындағы тамшыларды тұндырыңыз.

7. Пробиркаларға дайын реакция қоспасын 15 мкл-ден енгізіңіз. Үстіне 1 тамшыдан **ПТР-ға арналған минералды май** тамызыңыз.

8. Дайын пробиркаларға клиникалық үлгілерден бөлініп алынған **РНҚ-сынамаларын 10 мкл-ден** енгізіңіз.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» және NucliSENS easyMAG реагенттер жиынтығының көмегімен бөліп алынған РНҚ-сынамаларын қосқан жағдайда, 1 реакция қоспасына сорбенттің түсіп кетуін болдырмау қажет.

9. **Бақылау реакцияларын қойыңыз:**

- а) **оң экстракция бақылауы (ОБ)** – пробиркаға *HDV-rec* ОБҮ үлгісінен бөліп алынған **10 мкл РНҚ сынамасын** енгізіңіз.
- б) **теріс экстракция бақылауы (ТБ)** – пробиркаға ТБҮ үлгісінен бөліп алынған **10 мкл РНҚ сынамасын** енгізіңіз.
- в) **ПТР оң бақылауы (Б+)** – пробиркаға **10 мкл HDV-FL жДНҚ ОБҮ** енгізіңіз.

Контаминациялануы мүмкіндігіне күдіктенген жағдайда да, ПТР теріс бақылауын (Б–) қою қажет. Ол үшін ішінде дайын 1 реакция қоспасы бар пробиркаға элюциялауға арналған **10 мкл буферді** енгізіңіз.

Қойылымның алдында амплификаторда пробиркалардың қабырғаларындағы тамшыларды центрифугада/вортексте азғантай уақыт (1-3 с) центрифугалау арқылы тұндыру ұсынылады.

FEP форматы үшін реакция қоспаларын дайындау кестесі

А. Егер «Фон» пробиркалары дайындалса

		<u>1 саты. Үш компоненттен тұратын қоспа.</u> Көрсетілген үлгілер саны үшін бақылау нүктелері мен 2 «Фон» үлгісін ескере отырып (без полимераза (TaqF) және ТМ-Ревертаза (MMIv)) берілген реактивтердің көлемі, қосымша бір үлгі ескерілген (мкл)			<u>2 саты. Ферменттерді енгізу.</u> Қоспаны 2 «Фон» үлгісі үшін алғаннан кейін, үлгілердің көрсетілген саны үшін қосылатын ферменттер мөлшері (мкл)	
Бір реакцияға арналған реагент көлемі (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Клиникалық үлгілер саны	Зерттелетін нүктелер саны ⁷	КТ-ПТР-1 қоспа-1-FL HDV	КТ-ПТР-1 қоспа-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
6	9	120	60	3,0	5,0	2,5
10 ⁸	13	160	80	4,0	7,0	3,5
22 ⁹	25	280	140	7,0	13,0	6,5
34	37	400	200	10,0	19,0	9,5
46	49	520	260	13,0	25,0	12,5

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Қосылатын полимераза (TaqF) мен ТМ-Ревертаза (MMIv) мөлшері екі «Фон» пробиркасын шегере отырып есептелген.

Б. Егер бұрын дайындалған «Фон» пробиркалары пайдаланылса¹⁰

Бір реакцияға арналған реагент көлемі (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Клиникалық үлгілер саны	Зерттелетін нүктелер саны	КТ-ПТР-1 қоспа-1-FL HDV	КТ-ПТР-1 қоспа-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
6	9	100	50	2,5	5,0	2,5
10	13	140	70	3,5	7,0	3,5
22	25	260	130	6,5	13,0	6,5
34	37	380	190	9,5	19,0	9,5
46	49	500	250	12,5	25,0	12,5

Б. Амплификациялауды жүргізу

1. Амплификаторда сәйкесінше амплификациялау бағдарламасын іске қосыңыз (2 кестені қараңыз). Пробиркаларды амплификатордың ұяшықтарына салып, аспаптың қақпағын жабыңыз және бағдарламаны

⁷ Клиникалық үлгілер саны + РНҚ экстракциялау сатиысының 2 бақылауы + КТТ-ПТР 1 бақылауы, (N+3, N – клиникалық үлгілердің саны).

⁸ Экстракциялауға арналған 12 пробиркадан тұратын панель

⁹ Экстракциялауға арналған 24 пробиркадан тұратын панель

¹⁰ «Фон» пробиркаларын дәл осы сериядағы реагенттер жинағымен, бөліп алуға арналған реагенттердің тура сол типін және ПТР-ға арналған пробиркалардың тура сол типін пайдаланған жағдайда, оларды «ФОН» пробиркаларын қайтадан зерттеуге жол береді.

орындауды іске қосыңыз.

2 кесте

Амплификациялау бағдарламасы

Белсенді реттелетін амплификаторлар үшін ¹¹				Матрицалық реттелетін амплификаторлар үшін ¹²			
Цикл	Температура, °С	Уақыт	Циклдер саны	Цикл	Температура, °С	Уақыт	Циклдер саны
1	50	30 мин	1	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	2	95	15 мин	1
3	95	2 с	45	3	95	10 с	45
	60	10 с			60	15 с	
					72	15 с	
4	10	Сақтау		4	10	Сақтау	

2. Бағдарламаны орындау аяқталған кезде флуоресцентті детекциялауға кірісіңіз.

Амплификация өнімдерін «ақырғы нүкте» бойынша флуоресцентті детекциялау

Детекциялау флуоресцентного ПТР-детектор көмегімен (сәйкесінше аспапқа берілген нұсқаулыққа сәйкес) екі арна бойынша флуоресценттік сигнал қарқындылығын өлшеу жолымен жүргізіледі:

- FAM арнасы (немесе аспаптың моделіне байланысты ұқсас арна) бойынша ІБҮ жДНҚ амплификациялау өнімінің жинақталғандығы туралы сигнал тіркеледі.
- HEX арнасы (немесе аспаптың моделіне байланысты ұқсас арна) бойынша HDV жДНҚ амплификациялау өнімінің жинақталғандығы туралы сигнал тіркеледі.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Детекциялауды жүргізгенге дейін ПТР-детектордың бағдарламалық жасақтамасына сәйкесінше реттеулер енгізілуі және сақталуы тиіс – ПТР-жиынтыққа берілген қосымша парақты, сондай-ақ, Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ С гепатиті вирусының (HCV) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® HCV-FL», D гепатиті вирусының (HDV) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® HDV-FL», G гепатиті вирусының (HGV) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® HGV-FL», В гепатиті вирусының (HBV) ДНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® HBV-FL» реагенттер жинақтарын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарын қараңыз.

¹¹Мысалы, «Терцик» («ДНК-Технология»), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research), MaxyGene (Axygen), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

¹²Мысалы, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra).

Нәтижелерді интерпретациялау

Алынған нәтижелер бақылау үлгілері және клиникалық үлгілерден бөліп алынған РНҚ сынамалары үшін сәйкесінше арналар бойынша фонға қатысты флуоресцентті сигнал деңгейі туралы мәліметтердің негізінде интерпретацияланады. Интерпретациялау пайдаланылып отырған аспаптың бағдарламалық жасақтамасының көмегімен автоматты түрде жүргізіледі. Нәтижелерді интерпретациялау принципі төмендегідей:

- теріс нәтиженің белгіленген шектік мәнінен аз мәндер теріс деп, оң нәтиженің белгіленген шектік мәнінен көп мәндер – оң деп, шектер арасындағысы – күмәнді деп қабылданады.
- HEX/Yellow арнасы бойынша оң нәтиже сынамада *HDV* РНҚ бар екендігін білдіреді.
- егер осы сынама үшін FAM арнасы бойынша сигнал теріс нәтиженің белгіленген шектік мәнінен төмен болса, және HEX арнасы бойынша сигнал белгіленген шектік мәннен төмен болса, зерттеу нәтижесі валидті емес.
- детекциялаудан күмәнді нәтиже алынған жағдайда, осы сынамаға ПТР-зерттеуін қайтадан жүргізу қажет.

Егер 3 кестеге сәйкес, амплификациялау мен экстракциялаулардың оң және теріс бақылауларының жүргізілуінен дұрыс нәтижелер алынса, ПТР-зерттеуінің нәтижесі нақты сенімді деп есептеледі.

3 кесте

ПТР-зерттеуінің түрлі сатыларындағы бақылаулар үшін нәтижелер

Бақылау	ПТР-зерттеуінің бақыланатын сатысы	Автоматты түрде интерпретациялаудың нәтижесі
ТБ	РНҚ экстракциялау, ПТР	FAM/Green – оң HEX/Yellow – теріс
ОБ	РНҚ экстракциялау, ПТР	FAM/Green – оң HEX/Yellow – оң
К+	ПТР	FAM/Green – оң HEX/Yellow – оң
К–	ПТР	FAM/Green – теріс HEX/Yellow – теріс

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!

1. Егер оң экстракция бақылауы (ОБ) немесе ПТР оң бақылауы (Б+) үшін HEX/Yellow арнасы бойынша сигнал төмен болса, *HDV* РНҚ анықталмаған барлық үлгілер үшін зерттеуді, РНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау қажет.
2. Егер РНҚ экстракциялаудың теріс бақылауы (ТБ) және/немесе ПТР теріс бақылауы (Б–) үшін HEX/Yellow арнасы бойынша сигнал оң нәтиженің шектік мәнінен жоғары болса, *HDV* РНҚ анықталған барлық үлгілер үшін зерттеуді, РНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау қажет.

FRТ нұсқасы

ПТР-зерттеуін жүргізу

ПТР-зерттеуі келесі сатылардан тұрады:

- Зерттелетін үлгілерден РНҚ экстракциялау.
- Кері транскрипциялауды және «нақты уақыт» режимінде гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен амплификациялауды жүргізу.
- Нәтижелерді талдау және интерпретациялау.

Зерттелетін үлгілерден РНҚ экстракциялау

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! РНҚ-мен жұмыс жасау үшін тек пластиктен жасалған бір реттік стерильді, арнайы «RNase-free», «DNase-free» таңбалары бар шығын материалдарын пайдалану қажет.

РНҚ экстракциялау үшін Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ ұсынған реагенттер жиынтықтары пайдаланылады:

- **«РИБО-преп»** реагенттер жиынтығын пайдаланғанда жұмыс тәртібін **1 қосымшадан** қараңыз. «РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялау».
- **«РИБО-сорб»** реагенттер жиынтығын пайдаланғанда жұмыс тәртібін **2 қосымшадан** қараңыз. «РИБО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялау».
- **«МАГНО-сорб»** реагенттер жиынтығын пайдаланғанда 1000 мкл және 200 мкл қан плазмасынан РНҚ экстракциялау үшін жұмыс тәртібін **3 қосымшадан** қараңыз. «МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялау».

bioMérieux және Qiagen компанияларының нуклеин қышқылдарын экстракциялауға арналған автоматты станцияларын реагенттер жинағымен бірге пайдаланғанда қан плазмасы мен сарысуының көлемі 0,1 мл-ден 1 мл-ге дейінгі үлгілерінен РНҚ экстракциялауды жүргізуге мүмкіндік беретін хаттамалар мен реагенттерді пайдалану қажет.

Экстракциялау емшарасы автоматты станцияларға берілген нұсқаулыққа сәйкес, сондай-ақ, келесі шарттарды ескере отырып жүргізіледі:

- а) Бір сынамаға 10 мкл көлемінде экстракциялауды бастағанға дейін үлгілерге немесе лизистейтін ерітіндіге ІБҮ енгізу міндетті шарт болып табылады.
- б) Үлгіні зерттеулердің бірнеше түрін жүргізу үшін экстракциялаған кезде (*HDV* РНҚ, *HCV* РНҚ, *HGV* РНҚ, *HBV* ДНҚ, АИТВ РНҚ анықтау және *HCV*-генотиптеу үшін нуклеин қышқылдарын бір мезгілде экстракциялауға жол беріледі) барлық қажетті ІБҮ препараттарын (ұқсас) енгізу керек.
- в) Бағдарламаланатын элюция көлемі – 50-60 мкл (элюция көлемін 100 мкл дейін арттыруға болады).
- г) NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) автоматты станциясын

пайдаланғанда, қосымша «ЕМ-плюс» (Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒФМ өндірген) реагенттер жиынтығын міндетті түрде пайдалану керек. Аспапта (*On-board*) және аспаптан тыс (*Off-board*) лизистеу режимдерін пайдалануға жол беріледі.

- д) РНҚ экстракциялау аяқталғаннан кейін пробиркаларды аспаптан шығарып алу және КТ-ПТР реакциясын жүргізу керек. Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 4 сағатқа дейін, минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтауға болады.

Сонымен қатар, Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒФМ С гепатиті вирусының (*HCV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HCV-FL*», D гепатиті вирусының (*HDV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HDV-FL*», G гепатиті вирусының (*HGV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HGV-FL*», В гепатиті вирусының (*HBV*) ДНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HBV-FL*» реагенттер жинақтарын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарын қараңыз.

Кері транскрипциялау, амплификациялау және амплификация өнімдерін детекциялау реакциясын жүргізу
Реакция қоспасының жалпы көлемі – 10 мкл РНҚ сынамасының көлемін қоса, 25 мкл.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! РНҚ-мен жұмыс жасағанда тек, пластиктен жасалған бір реттік стерильді, арнайы RNase-free, DNase-free таңбасы бар материалдарды пайдалану қажет.

А. Амплификациялауға арналған пробиркаларды дайындау
Амплификациялауға арналған пробиркалардың таңдалуы пайдаланылып отырған амплификаторға тәуелді.

Пробиркаларға реагенттерді, РНҚ сынамалары мен бақылау үлгілерін енгізу үшін, сүзгілері бар бір реттік ұштықтар пайдаланылады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Реакция қоспасының компоненттерін тура ПТР-зерттеуін жүргізер алдында араластыру керек. Реагенттерді есептеу кестесіне сәйкес, зерттелетін және бақылау үлгілерін тестілеуді қоса, реакциялардың қажетті санына есептеп араластыру қажет (4 кестені қараңыз).

1. Жұмысты бастағанға дейін жинақтың барлық реагенттерін ерітіп, вортесте мұқият араластырыңыз және пробиркалардың қақпақтарындағы тамшыларды тұндырыңыз.
2. Зерттелетін, бақылау үлгілерінің (екі экстракция бақылауы, бір амплификация бақылауы) санын ескере отырып, амплификациялауға арналған пробиркалардың қажетті санын алыңыз. Пробиркалардың, стриптердің немесе плашкалардың типі пайдаланылып отырған аспапқа байланысты таңдалады.
3. **Реакция қоспасын дайындау үшін бөлек стерильді пробиркада реагенттерді 1 реакцияға: 10 мкл КТ-ПТР-қоспа-1-FL *HDV*, 5 мкл КТ-**

ПТР-қоспа-2-FEP/FRT, 0,25 мкл RT-G-mix-2, 0,5 мкл полимераза (TaqF) және 0,25 мкл ТМ-Ревертаза (MMIv) есептеп араластыру қажет. 1 қоспаны вортексте мұқият араластырыңыз және пробирканың қақпағындағы тамшыларды тұндырыңыз.

4. Пробиркаларға дайын реакция қоспасын 15 мкл-ден енгізіңіз.
5. Дайын пробиркаларға клиникалық үлгілерден экстракциялау нәтижесінде алынған **РНҚ сынамаларын 10 мкл-ден** енгізіңіз.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» және NucliSENS easyMAG реагенттер жиынтығының көмегімен бөліп алынған РНҚ-сынамаларын қосқан жағдайда, реакция қоспасына сорбенттің түсіп кетуін болдырмау қажет.

6. Бақылау реакцияларын қойыңыз:

- а) **оң экстракция бақылауы (ОБ)** – пробиркаға *HDV*-рес ОБҮ үлгісінен бөліп алынған **10 мкл РНҚ-сынамасын** енгізіңіз.
- б) **теріс экстракция бақылауы (ТБ)** – пробиркаға ТБҮ үлгісінен бөліп алынған **10 мкл РНҚ-сынамасын** енгізіңіз.
- в) **ПТР оң бақылауы (К+)** – пробиркаға **10 мкл HDV-FL жДНҚ ОБҮ** енгізіңіз.

Контаминациялануы мүмкіндігіне күдіктенген жағдайда да, ПТР теріс бақылауын (Б–) қою қажет. Ол үшін ішінде дайын реакция қоспасы бар пробиркаға элюциялауға арналған **10 мкл буферді** енгізіңіз.

4 кесте

FRT форматы үшін реакция қоспаларын дайындау кестесі

		Зерттелетін нүктелердің көрсетілген саны үшін реактивтердің көлемі, қосымша бір үлгісімен				
Бір реакцияға арналған реагент көлемі (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Клиникалық үлгілер саны	Зерттелетін нүкте саны ¹³	КТ-ПТР-1 қоспа-1-FL <i>HDV</i>	КТ-ПТР-1 қоспа-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
4	7	80	40	2,0	4,0	2,0
6 ¹⁴	9	100	50	2,5	5,0	2,5
8	11	120	60	3,0	6,0	3,0
10 ¹⁵	13	140	70	3,5	7,0	3,5
12	15	160	80	4,0	8,0	4,0
14 ¹⁶	17	180	90	4,5	9,0	4,5
16	19	200	100	5,0	10,0	5,0
18	21	220	110	5,5	11,0	5,5
20	23	240	120	6,0	12,0	6,0
22 ¹⁷	25	260	130	6,5	13,0	6,5

¹³ Клиникалық үлгілер саны + РНҚ экстракциялау сатысының 2 бақылауы + КТ-ПТР1 бақылауы, (N+3, N – клиникалық үлгілердің саны).

¹⁴ NucliSENS easyMAG аспабында бір стрипті экстракциялау (8 пробирка).

¹⁵ Экстракциялауға арналған 12 пробиркадан тұратын панель.

¹⁶ NucliSENS easyMAG аспабында екі стрипті экстракциялау (16 пробирка).

¹⁷ Экстракциялауға арналған 24 пробиркадан тұратын панель, NucliSENS easyMAG аспабында үш стрипті экстракциялау.

34	37	380	190	9,5	19,0	9,5
46	49	500	250	12,5	25,0	12,5

Б. Нақты уақыт » режимінде детекциялаумен амплификациялауды жүргізу

1. Пробиркаларды аспаптың реакция модулінің ұяшықтарына орналастырыңыз.
2. Аспапты («нақты уақыт» режимінде детекциялау жүйесі бар амплификатор) сәйкесінше амплификациялау және флуоресценттік сигналды детекциялау бағдарламаларын орындау үшін бағдарламалаңыз (5, 6 кестелерді қараңыз).

5 кесте.

Роторлық типтегі аспаптарға арналған «АмплиСенс-2 RG» бағдарламасы¹⁸

Саты	Температура, °C	Сатының ұзақтығы	Флуоресценцияны өлшеу	Циклдар саны
Hold/ Температураны ұстап тұруы	50	15 мин	–	1
Hold/ Температураны ұстап тұруы	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклдеу	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклдеу 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Бұл бағдарламаны пайдалана отырып, бір аспапта бірыңғай бағдарлама бойынша тестілердің кез келген үйлестірілімін бір мезгілде (мысалы, *HBV* анықтауға, *HCV* генотиптеуге арналған тестілермен және т.б. бірге) жүргізуге болады.

Ескертпе – егер «мультипрайм» форматында ROX/Orange және Cy5/Red арналары пайдаланылатын тестілер жүргізілсе, бұл арналар қамтылады.

¹⁸ Мысалы, Rotor-Gene 3000 немесе 6000 (Corbett Research, Австралия)

**Планшеттік типтегі аспаптарға арналған «АмплиСенс-2 iQ»
бағдарламасы¹⁹**

Саты	Температура, °С	Сатының ұзақтығы	Флуоресценцияны өлшеу	Циклдар саны
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! Бұл бағдарламаны пайдалана отырып, бір аспапта бірыңғай бағдарлама бойынша тестілердің кез келген үйлестірілімін бір мезгілде (мысалы, *HBV* анықтауға, *HCV* генотиптеуге арналған тестілермен және т.б. бірге) жүргізуге болады.

Ескертпе – егер «мультипрайм» форматында ROX/Orange және Cy5/Red арналары пайдаланылатын тестілер жүргізілсе, бұл арналар қамтылады.

Бағдарламаны орындау аяқталған кезде нәтижелерді талдау мен интерпретациялауға кірісіңіз.

Нәтижелерді талдау және интерпретациялау

Нәтижелерді талдау «нақты уақыт» режимінде детекциялаумен ПТР жүргізу үшін пайдаланылып отырған аспаптың бағдарламалық жасақтамасының көмегімен жүргізіледі. Флуоресценттік сигналдың екі арна бойынша жинақталған қисықтары талданады:

- FAM флуорофорына арналған арна бойынша ІБҮ жДНҚ амплификациялау өнімінің жинақталғанын білдіретін сигнал тіркеледі,
- JOE флуорофорына арналған арна бойынша *HDV* жДНҚ фрагментін амплификациялау өнімінің жинақталғанын білдіретін сигнал тіркеледі.

Нәтижелер флуоресценция қисығының сәйкесінше деңгейде шектік сызықпен қиылысуының болуы (немесе болмауы) негізінде интерпретацияланады (логарифмдік шкала бойынша оң бақылаудың флуоресценция өрлеуінің сызықтық бөлігінің ортасында анықталады), бұдан нәтижелер кестесінің сәйкесінше бағанында аталған сынама үшін шектік цикл мәнінің *Ct* бар (немесе жоқ) екендігі анықталады.

Егер қисық флуоресценцияның айқын өрлеуі аймағындағы шектік сызықпен бір рет қиылысса, арна бойынша амплификациялау нәтижесі *оң* деп, шектік сызықпен қиылысуы болмаған (*Ct* немесе *Ср* мәні жоқ) жағдайда *теріс* деп, қалған барлық жағдайларда *күмәнді* деп есептеледі.

¹⁹ Мысалы, iCycler iQ5 (BioRad, АҚШ), Mx3000P (Stratagene, АҚШ), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Ресей) және РоспотребнадзорЭпидемиология ОФЗИ ФБФМ осы реагенттер жинағын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарында ұсынғандары.

Нәтижелерді интерпретациялау принципі төмендегідей:

- егер JOE/HEX/Yellow арнасында шектік циклдың *Ct* көрсетілген (шектік) мәннен аспайтын мәні алынса, үлгі *HDV* РНҚ болуына қатысты **оң** деп есептеледі.
- егер JOE/HEX/Yellow арнасында *Ct* мәні болмаса немесе көрсетілген (шектік) мәннен үлкен *Ct* мәні алынса, ал ІБҮ арнасы бойынша ол үшін шектік циклдың *Ct*, көрсетілген (шектік) мәнінен аспайтын мәні анықталса, үлгі *HDV* РНҚ болуына қатысты **теріс** деп есептеледі.
- арналардың кез келгені бойынша күмәнді нәтиже алынған жағдайда, үлгі **күмәнді** деп есептеледі. Сәйкесінше үлгіне қайтадан ПТР-зерттеуін жүргізу ұсынылады.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! *Ct* шектік мәндері ПТР-жиынтыққа берілген қосымша парақта көрсетілген. Сонымен қатар, «нақты уақыт» режиміндегі ПТР-ға арналған сәйкесінше аспаптарға берілген нұсаулықтарды және Роспотребнадзор Эпидемиология ОҒЗИ ФБҒФМ С гепатиті вирусының (*HCV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HCV*-FL», D гепатиті вирусының (*HDV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HDV*-FL», G гепатиті вирусының (*HGV*) РНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HGV*-FL», В гепатиті вирусының (*HBV*) ДНҚ анықтауға арналған «АмплиСенс® *HBV*-FL» реагенттер жинақтарын қолдану жөніндегі әдістемелік ұсынымдарын қараңыз.

Егер бақылау реакцияларының нәтижелерін бағалау кестесіне сәйкес, бақылау үлгілерінің жүргізілуінен дұрыс нәтижелер алынса, ПТР-зерттеудің нәтижелері дұрыс болып есептеледі (7 кестені қараңыз).

7 кесте

ПТР-зерттеуінің түрлі сатылары үшін бақылауларға арналған нәтижелер

Бақылау	ПТР-зерттеуінің бақыланатын сатысы	Арна бойынша амплификациялау нәтижесі	
		FAM/Green	JOE/HEX/Yellow
ТБ	РНҚ экстракциялау, ПТР	оң	теріс
ОБ	РНҚ экстракциялау, ПТР	оң	оң
К+	ПТР	оң	оң
К–	ПТР	теріс	теріс

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ!

1. Егер экстракциялау сатысының оң бақылауы (ОБ) немесе ПТР сатысының оң бақылауы (Б+) үшін HEX/Yellow арнасы бойынша *Ct* мәні болмаса немесе көрсетілген (шектік) мәннен асып кетсе, *HDV* РНҚ анықталмаған барлық үлгілер үшін ПТР-зерттеуін РНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау қажет.
2. Егер РНҚ экстракциялау сатысының теріс бақылауы (ТБ) және/немесе ПТР теріс бақылауы (Б–) үшін HEX/Yellow арнасы бойынша *Ct* мәні алынса, *HDV* РНҚ анықталған барлық үлгілер үшін ПТР-зерттеуін РНҚ экстракциялау сатысынан бастап қайталау қажет.

Қысқартылған сөздердің тізімі

Осы нұсқаулықта келесі қысқартулар мен белгілер қолданылады:

ІБҮ	– ішкі бақылау үлгісі
Б+	– ПТР оң бақылауы
Б–	– ПТР теріс бақылауы
ТБҮ	– теріс бақылау үлгісі
ТБ	– теріс экстракция бақылауы
КТ	– кері транскрипциялау
ОБҮ	– оң бақылау үлгісі
ОБ	– оң экстракция бақылауы
ПТР	– полимеразалық тізбекті реакция
РоспотребнадзорЭпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ	– Тұтынушылардың құқығы мен адамның әл-ауқатын қорғау саласындағы Федералдық қызметтің «Эпидемиология Орталық ғылым-зерттеу институты» Федералдық бюджеттік ғылым мекемесі
FER	– «ақырғы нүкте» бойынша флуоресцентті детекциялау
FRT	– «нақты уақыт » режимінде
HBV	– В гепатиті вирусы
HCV	– С гепатиті вирусы
HDV	– D гепатиті вирусы («Дельта»)
HGV	– G гепатиті вирусы

Сақтау шарттары

«РИБО-сорб», «РИБО-преп» реагенттер жиынтықтарын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақтау керек. «МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығын 2-ден 25 °С дейінгі температурада сақтау керек. «ПТР-жиынтықты» минус 16 °С-ден аспайтын температурада сақтау керек. ОБҮ жДНҚ HDV-FL, ОБҮ HDV-rec және ІБҮ ICZ-rec екі реттен артық мұздатып қатыруға/ерітуге жол берілмейді, ОБҮ жДНҚ HDV-FL, ОБҮ HDV-rec және ІБҮ ICZ-rec еріткеннен кейін 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 6 айдан асырмай сақтау керек. КТ-ПТР-1 қоспа-1-FL HDV жарықтан қорғалған жерде сақтау керек.

Тасымалдау

Реагенттер жинағын 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада 5 тәуліктен асырмай тасымалдау керек. Алған кезде жиынтығын көрсетілген сақтау температураларына сәйкес ашу керек.

Босатылу шарттары

Емдеу-профилактика мекемелері және санитариялық-профилактикалық мекемелер үшін.

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 өнімінде пайдаланылатын символдар

	Каталогтағы нөмірі		Сақ болыңыз! Ілеспе құжаттаманы қараңыз
	Партиясының коды		Тестілердің ең көп саны
	In vitro диагностикаға арналған бұйым		Жарамдылық мерзімі
	Өзгертілген күні		Пайдалану жөніндегі нұсқаулықты қараңыз
	Температура шектелімі		Күн сәулесінің түсуіне жол бермеу керек
	Температураның жоғарғы шегі		Дайындалған күні
	Өндіруші		

Медициналық мақсаттағы бұйым осыған сәйкес өндірілген нормативтік құжат

Клиникалық материалда D гепатиті вирусының (HCV) РНҚ гибридизациялық-флуоресцентті детекциялаумен полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) әдісімен анықтауға арналған «АмплиСенс® HDV-FL» реагенттер жинағы

Техникалық шарттар ТШ 9398-178-01897593-2012

Өндіруші

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

Реагенттер жинағының сапасына білдірілген наразылықтарды дайындаушы

кәсіпорын РоспотребнадзорЭпидемиология ОҒЗИ ФБҒМ (111123, Мәскеу қ., Новогиреевск к-сі, 3а үй) наразылықтармен жұмыс және оқытуды ұйымдастыру бөліміне жіберу керек (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

«АмплиСенс» өнімі туралы пікірлер мен ұсыныстарды www.amplisens.ru сайтында тұтынушы анкетасын толтыру арқылы қалдыруға болады.

Қазақстан Республикасы аумағында тұтынушылардан медициналық мақсаттағы бұйымның сапасына қатысты 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

Өтінім беруші:

«КБ Диагностик» ЖШС
директоры

Калимбаев К.А.

1 қосымша.

«РИБО-преп» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялау Жұмыс тәртібі

1. Лизистеуге арналған ерітіндіні (егер ол 2-ден 8 °С-ге дейінгі температурада сақталса) 65 ° С-ге дейінгі температурада кристалдары толық ерігенше қыздырыңыз.
2. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса) алыңыз. Пробиркаларды таңбалаңыз.
3. Әрбір пробирканың түбіне **10 мкл-ден ICZ-гес ІБҮ** енгізіңіз.
4. Пробиркаларға **300 мкл-ден лизистеуге арналған ерітіндіні** енгізіңіз. Пробиркаларды таңбалаңыз.

Ескертпе – Үлгілердің көлемі көп болған жағдайда, экстракциялау емшарасын жеңілдету үшін, бөлек стерильді құтыда лизистеуге арналған ерітінді мен **ІБҮ** (бір үлгіге 300 мкл лизистейтін ерітінді және 10 мкл ІБҮ есебінен) араластырып, ары қарай **300 мкл қоспадан** алдын ала дайындалған 1,5 мл пробиркаларға бөліп құюға жол беріледі.

Үлгіні зерттеулердің бірнеше түрін жүргізу үшін экстракциялаған кезде (*HDV* РНҚ, *HCV* РНҚ, *HGV* РНҚ, *HBV* ДНҚ, АИТВ РНҚ анықтау және *HCV*-генотиптеу үшін нуклеин қышқылдарын бір мезгілде экстракциялауға жол беріледі) барлық қажетті ІБҮ препараттарын (ұқсас) енгізу керек.

5. Сүзгісі бар бір реттік ұштықтарды пайдалана отырып, пробиркаларға зерттелетін үлгілерді **100 мкл-ден** енгізіңіз. Қақпақтарын жабыңыз және вортексте араластырыңыз. Қақпағындағы сұйықтық тамшыларын кетіру үшін центрифугада тұндырыңыз.
6. Әр панель үшін **оң экстракция бақылауын (ОБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **90 мкл ТБҮ** мен **10 мкл HDV-гес ОБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз және қақпағындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз.
7. Әр панель үшін **теріс экстракция бақылауын (ТБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **100 мкл ТБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз және қақпағындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз.
8. Пробиркалардың ішіндегісін **65 °С** термостатта **5 минут** қыздырып, вортексте араластырыңыз және қақпағындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз (8 тармақты тек, С гепатитінің РНҚ және В гепатитінің ДНҚ және/немесе D гепатитінің РНҚ бір мезгілде экстракциялаған жағдайда ғана орындау керек).
9. Пробиркаларға **преципитациялауға арналған ерітіндіні 400 мкл-ден** қосып, вортексте араластырыңыз.
10. Пробиркаларды микроцентрифугада 2 мың g кезінде (мысалы, MiniSpin, Eppendorf центрифугасы үшін 13400 айналым) 5 минут бойы центрифугалаңыз.
11. Абайлап, тұнбаға тиіп кетпей, вакуумды сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдалана отырып, тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз.
12. Пробиркаларға **жуып-шаюға арналған 3 ерітіндіні 500 мкл-ден** қосып,

- қақпақтарын тығыз жабыңыз, пробиркаларды 3-5 рет аударып-төңкере отырып, тұнбаны абайлап жуып-шайыңыз.
13. Микроцентрифугада **12 мың g кезінде 1-2 минут** бойы центрифугалаңыз.
 14. Абайлап, тұнбаға тиіп кетпей, вакуумды сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдалана отырып, тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз.
 15. Пробиркаларға **жуып-шаюға арналған 4 ерітіндіні 200 мкл-ден** қосып, қақпақтарын тығыз жабыңыз, пробиркаларды 3-5 рет аударып-төңкере отырып, тұнбаны абайлап жуып-шайыңыз.
 16. Микроцентрифугада **12 мың g кезінде 2 минут** бойы центрифугалаңыз.
 17. Абайлап, тұнбаға тиіп кетпей, вакуумды сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдалана отырып, тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз.
 18. Тұнбаны кептіру үшін, пробиркаларды **65 °С** температурадағы термостатқа **5 минутқа** салыңыз (бұл кезде пробиркалардың қақпақтары ашық болуы тиіс).
 19. Пробиркаларға **50 мкл-ден РНҚ-буфер** қосыңыз. Вортексте араластырыңыз. **65 °С** температурадағы термостатқа **5 минутқа** салып, вортексте жүйелі түрде араластырып отырыңыз.
 20. Пробиркаларды микроцентрифугада 12 мың g кезінде 1 минут бойы центрифугалаңыз. Тұнбаүстілік сұйықтықтың құрамында тазартылған РНҚ бар. Сынамалар кері транскрипциялау және ПТР реакциясын қоюға дайын.

Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °С-ге ейінгі температурада 4 сағатқа дейін сақтауға болады. Ұзағырақ сақтау үшін препаратты, минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С- ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау қажет.

«РИБО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялау

Жұмыс тәртібі

1. Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі мен жуып-шаюға арналған 5 ерітінді 60 ° С температурада, кристалдары толық ерігенге дейін қыздырыңыз.
2. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса) алыңыз. Пробиркаларды таңбалаңыз.
3. Әрбір пробирканың түбіне **10 мкл-ден ICZ-rec ІБҮ** енгізіңіз.
4. Пробиркаларға **450 мкл-ден лизистейтін ерітіндіні** енгізіңіз. Пробиркаларды таңбалаңыз.

Ескертпе – Үлгілердің көлемі көп болған жағдайда, экстракциялау емшарасын жеңілдету үшін, бөлек стерильді құтыда лизистейтін ерітінді мен ІБҮ (бір үлгіге 450 мкл лизистейтін ерітінді және 10 мкл ІБҮ есебінен) араластырып, ары қарай **450 мкл қоспадан** алдын ала дайындалған 1,5 мл пробиркаларға бөліп құюға жол беріледі.

Үлгіні зерттеулердің бірнеше түрін жүргізу үшін экстракциялаған кезде (*HDV* РНҚ, *HCV* РНҚ, *HGV* РНҚ, *HBV* ДНҚ, АИТВ РНҚ анықтау және *HCV*-генотиптеу үшін нуклеин қышқылдарын бір мезгілде экстракциялауға жол беріледі) барлық қажетті ІБҮ препараттарын (ұқсас) енгізу керек.

5. Сүзгісі бар бір реттік ұштықтарды пайдалана отырып, пробиркаларға зерттелетін үлгілерді **100 мкл-ден** енгізіңіз. Қақпақтарын жабыңыз және вортексте араластырыңыз. Қақпағындағы сұйықтық тамшыларын кетіру үшін центрифугада тұндырыңыз.
6. Әр панель үшін **оң экстракция бақылауын (ОБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **90 мкл ТБҮ** мен **10 мкл HDV-rec ОБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз және қақпағындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз.
7. Әр панель үшін **теріс экстракция бақылауын (ТБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **100 мкл ТБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз және қақпағындағы сұйықтық тамшыларын тұндырыңыз.
8. Ішінде үлгілері мен бақылаулары бар пробиркаларды 60 °С температурадағы термостатқа 10 минутқа салыңыз. Қақпағындағы конденсат тамшыларын кетіру үшін центрифугада тұндырыңыз.
9. Вортексте қатты араластыра отырып, сорбентті қайта суспензиялаңыз. Әр пробиркаға бөлек ұштықпен **25 мкл-ден қайта суспензияланған сорбент** қосыңыз.
10. Пробиркалардың ішіндегісін вортексте араластырыңыз және әр 2 минут сайын мұқият араластыра отырып, бөлме температурасында 10 минутқа қалдырыңыз.
11. Пробиркаларды микроцентрифугада 7 мың g кезінде (мысалы, MiniSpin, Eppendorf центрифугасы үшін 10000 айналым) 1 минут бойы центрифугалаңыз.

12. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, әрбір пробиркадағы тұнбаүстілік сұйықтықты бөлек ұштықпен шығарып тастаңыз.
13. Пробиркаларға **жуып-шаюға арналған 1 ерітіндіні 400 мкл-ден** қосыңыз. Вортексте сорбенті толығымен қайта суспензияланғанша араластырыңыз. Пробиркаларды микроцентрифугада 7 мың g кезінде 1 минут бойы центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, әрбір пробиркадағы тұнбаүстілік сұйықтықты бөлек ұштықпен шығарып тастаңыз.
14. Пробиркаларға **жуып-шаюға арналған 3 ерітіндіні 500 мкл-ден** қосыңыз. Вортексте сорбенті толығымен қайта суспензияланғанша араластырыңыз. Пробиркаларды микроцентрифугада 7 мың g кезінде 1 минут бойы центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, әрбір пробиркадағы жуып-шаюға арналған 3 ерітіндіні бөлек ұштықпен шығарып тастаңыз.
15. Пробиркаларға **жуып-шаюға арналған 4 ерітіндіні 400 мкл-ден** қосыңыз. Вортексте сорбенті толығымен қайта суспензияланғанша араластырыңыз. Пробиркаларды микроцентрифугада 7 мың g кезінде 1 минут бойы центрифугалаңыз. Вакуумды сорғышты пайдалана отырып, әрбір пробиркадағы жуып-шаюға арналған 4 ерітіндіні бөлек ұштықпен шығарып тастаңыз.
16. 60 °C температурадағы термостатта пробиркалардың қақпақтарын **10 минут бойы** ашық қалдырып, сорбентін кептіріңіз.
17. Сорбентті **50 мкл РНҚ-буферде** қайта суспензиялаңыз. 60 °C температурадағы термостатта 5 минут қыздырып, вортексте араластырыңыз және сорбентті центрифугада минутына 12 мың g кезінде (мысалы, MiniSpin, Eppendorf центрифугасы үшін 13 400 айналым) 1 минут бойы тұндырыңыз.

Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °C-ге ейінгі температурада 4 сағатқа дейін сақтауға болады. Препаратты ұзағырақ сақтау үшін, сорбентке тиіп кетпей, тұнбаүстілік сұйықтықты стерильді пробиркаға ауыстыру және минус 16 °C-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °C-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау қажет. Сорбенттің лайлану белгілері пайда бола, центрифугада 12 мың g кезінде 1 минут бойы қайта тұндыру қажет.

«МАГНО-сорб» реагенттер жиынтығын пайдаланып РНҚ экстракциялау

А. 1000 мкл плазма үлгісінен экстракциялау

Жұмыс тәртібі

1. Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі мен жуып-шаюға арналған 5 ерітінді 60 ° С температурада, кристалдары толық ерігенге дейін қыздырыңыз.
2. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса) дайындаңыз және оларды таңбалаңыз.
3. 24 үлгіден РНҚ экстракциялау кезінде:

- а) ішінде лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі (70 мл) бар құтыға 0,28 мл ICZ-рес ІБҮ, ішінде А компоненті бар (0,6 мл) пробирканың ішіндегісін түгел және ішінде магнеттелген силика (0,9 мл) бар пробирканың ішіндегісін түгел енгізіңіз.

Ескертпе – Үлгіні зерттеулердің бірнеше түрін жүргізу үшін экстракциялаған кезде (*HDV* РНҚ, *HCV* РНҚ, *HGV* РНҚ, *HBV* ДНҚ, АИТВ РНҚ анықтау және *HCV*-генотиптеу үшін нуклеин қышқылдарын бір мезгілде экстракциялауға жол беріледі) барлық қажетті ІБҮ препараттарын (ұқсас) енгізу керек.

- б) құтының қақпағын жабыңыз және көбік түзілуін болдырмай, 5-7 рет аударып-төңкере отырып **абайлап** араластырыңыз.

- в) 5 мл пробиркаларға лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісінің, ІБҮ, А компоненті мен магнеттелген силиканың дайындалған қоспасын **2,6 мл-ден** енгізіңіз.

4. 24 үлгіден аз РНҚ экстракцияланған кезде:

- а) көлемі 1,5 мл бөлек стерильді пробиркада **ICZ-рес ІБҮ, А компоненті мен магнеттелген силиканы** бір нүктеге 10 мкл ICZ-рес ІБҮ, 20 мкл А компоненті және 30 мкл магнеттелген силика есебінен араластырыңыз. Есептеп шығарған кезде қосымша – бір нүктеге артық есептеу қажет, мысалы:

РНҚ экстракциялауға арналған үлгілер саны	ICZ-рес ІБҮ, мкл	А компоненті, мкл	Магнеттелген силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

Ескертпе – Үлгіні зерттеулердің бірнеше түрін жүргізу үшін экстракциялаған кезде (*HDV* РНҚ, *HCV* РНҚ, *HGV* РНҚ, *HBV* ДНҚ, АИТВ РНҚ анықтау және *HCV*-генотиптеу үшін нуклеин қышқылдарын бір мезгілде экстракциялауға жол беріледі) барлық қажетті ІБҮ препараттарын (ұқсас) енгізу керек.

- б) 1,5 мл пробиркаларға ICZ-рес ІБҮ, А компоненті мен магнеттелген силиканың дайындалған қоспасын **60 мкл-ден** енгізіңіз.

- в) 5 мл пробиркаларға лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісін **2,6 мл-ден** енгізіңіз.

5. Ішінде лизистейтін ерітіндісі бар әрбір зерттеудегі плазма үлгісінің **1 мл**

- қосыңыз және тамыза отырып араластырыңыз, қақпағын жабыңыз.
6. Әрбір панель үшін **оң экстракция бақылауын (ОБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **90 мкл ТБҮ және 10 мкл HDV-rec ОБҮ** қосып, тамыза отырып араластырыңыз, қақпағын жабыңыз.
 7. Әрбір панель үшін **теріс экстракция бақылауын (ТБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **100 мкл ТБҮ** қосып, тамыза отырып араластырыңыз, қақпағын жабыңыз.
 8. Пробиркаларды 60 °С температурадағы термостатқа 10 минутқа салыңыз.
 9. Пробиркаларды **6 минутқа** магнитті штативке ауыстырыңыз.
 10. Сүзгісіз 1000 мкл ұштықтарды пайдала отырып, абайлап, пробиркалардың ішкі қабырғасын бойлай, вакуумды сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдаланып тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз. Пробиркаларды әдеттегі штативке ауыстырыңыз.
 11. Пробиркаларға **700 мкл-ден жуып-шаюға арналған 5 ерітіндіні** қосып, пробиркалардың қақпағын жабыңыз.
 12. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын алыңыз (теріс оң экстракция бақылауларын қоса) және оларды таңбалаңыз.
 13. Қабырғаларындағы магнеттелген силиканы абайлап вортекстей отырып, содан соң тамыза отырып қайта суспензиялаңыз, және сұйықтықты түгелімен, дайындалған 1,5 мл пробиркаларға ауыстырып құйыңыз.
 14. Пробиркаларды магнитті штативке ауыстырып қойыңыз және **2 минут** инкубациялаңыз.
 15. Тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз және пробиркаларды әдеттегі штативке ауыстырыңыз.
 16. **Жуып-шаюға арналған 5 ерітіндінің 700 мкл** қосып, магнеттелген силиканы қайта суспензиялаңыз, және 14-15 қосалқы тармақтарды қайталаңыз.
 17. Сол сияқты, **жуып-шаюға арналған 6 ерітіндінің 700 мкл-мен** бір рет жуып-шайыңыз.
 18. **Жуып-шаюға арналған 7 ерітіндінің 200 мкл** қосып, араластырыңыз, содан соң тамшыларын вортексте тұндырыңыз. Пробиркаларды әдеттегі штативке қойыңыз және қақпақтарын ашыңыз.
 19. Пробиркаларды **1 минутқа** магнитті штативке ауыстырып салыңыз, содан соң тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз.
 20. Магнитті штативте пробиркалардың қақпақтарын **10 минут бойы** ашық қалдырып, сорбентін кептіріңіз.
 21. **70 мкл элюциялауға арналған буфер** қосыңыз және вортексте араластырыңыз.
 22. Пробиркаларды 60 ° С температурадағы термостатқа 5 минутқа салып, 2 минуттан соң вортексте араластырыңыз.
 23. Тамшыларын қысқа уақытта вортексте тұндырыңыз және пробиркаларды магнитті штативке ауыстырып салыңыз. 2 минут инкубациялаңыз.

Тұнбаүстілік сұйықтықтың құрамында тазартылған РНҚ мен ДНҚ бар.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! КТ-ПТР үшін тазартылған РНҚ алу пробиркаларды магнитті штативтен алмай-ақ жүзеге асырылады.

Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °С-ге ейінгі температурада 4 сағатқа дейін сақтауға болады. Препаратты ұзағырақ сақтау үшін, сорбентке тиіп кетпей, тұнбаүстілік сұйықтықты стерильді пробиркаға ауыстыру және минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау қажет.

Б. 200 мкл плазма үлгісінен экстракциялау

Жұмыс тәртібі.

1. Лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісі мен жуып-шаюға арналған 5 ерітінді 60 ° С температурада, кристалдары толық ерігенге дейін қыздырыңыз.
2. Бір реттік 1,5 мл пробиркалардың қажетті санын (теріс және оң экстракция бақылауларын қоса) дайындаңыз және оларды таңбалаңыз.
3. Көлемі 1,5 мл бөлек стерильді пробиркада **ICZ-rec ІБҮ, А компоненті мен магнеттелген силиканы** бір 10 мкл **ICZ-rec ІБҮ, 10 мкл А компоненті** және 20 мкл магнеттелген силика есебінен аралыстырыңыз. Есептеп шығарған кезде қосымша – бір нүктеге артық есептеу қажет, мысалы:

РНҚ экстракциялауға арналған үлгілердің саны	ICZ-rec ІБҮ, мкл	А компоненті, мкл	Магнеттелген силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

Ескертпе – Үлгіні зерттеулердің бірнеше түрін жүргізу үшін экстракциялаған кезде (*HDV* РНҚ, *HCV* РНҚ, *HGV* РНҚ, *HBV* ДНҚ, АИТВ РНҚ анықтау және *HCV*-генотиптеу үшін нуклеин қышқылдарын бір мезгілде экстракциялауға жол беріледі) барлық қажетті ІБҮ препараттарын (ұқсас) енгізу керек.

4. Пробиркаларға **ICZ-rec ІБҮ, А компоненті мен магнеттелген силиканың** дайындалған **40 мкл** қоспасын енгізіңіз.
5. Пробиркаларға **лизистейтін МАГНО-сорб ерітіндісінің 900 мкл** енгізіңіз.
6. Ішінде лизистейтін ерітіндісі бар әрбір пробиркаға **зерттеудегі 200 мкл плазма үлгісін** қосыңыз және вортексте араластырыңыз.
7. Әрбір панель үшін **оң экстракция бақылауын (ОБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **90 мкл ТБҮ мен 10 мкл HDV-rec ОБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз.
8. Әрбір панель үшін **теріс экстракция бақылауын (ТБ)** қою қажет. Ол үшін ішінде лизистейтін ерітіндісі бар пробиркаға **100 мкл ТБҮ** қосып, вортексте араластырыңыз.
9. Пробиркаларды 60 ° С температурадағы термостатқа 10 минутқа салыңыз.
10. Пробиркаларды **2 минутқа** магнитті штативке ауыстырып салыңыз.
11. Абайлап, пробиркалардың ішкі қабырғасын бойлай, вакуумды сорғышты және әр сынама үшін бөлек ұштықты пайдаланып тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз. Пробиркаларды әдеттегі штативке ауыстырып салыңыз.
12. Пробиркаларға **жуып-шаюға арналған 5 ерітіндінің 700 мкл** қосыңыз.
13. Магнеттелген силиканы вортекстеу арқылы жуып тастаңыз, содан соң

- тамшыларын қысқа уақыт центрифугалау арқылы тұндырыңыз.
14. Пробиркаларды әдеттегі штативке қойып, қақпақтарын ашыңыз және магнитті штативке ауыстырып салыңыз. **2 минут** инкубациялаңыз.
 15. Тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз және пробиркаларды әдеттегі штативке ауыстырып салыңыз.
 16. **Жуып-шаюға арналған 5** ерітіндімен жуып-шайыңыз (12-15 қосалқы тармақтары).
 17. Сол сияқты, **жуып-шаюға арналған 6 ерітіндінің 700 мкл-мен** бір рет жуып-шайыңыз.
 18. **Жуып-шаюға арналған 7 ерітіндінің 200 мкл** қосып, араластырыңыз, содан соң тамшыларын вортексте тұндырыңыз. Пробиркаларды әдеттегі штативке қойыңыз және қақпақтарын ашыңыз.
 19. Пробиркаларды **1 минутқа** магнитті штативке ауыстырып салыңыз, содан соң тұнбаүстілік сұйықтығын алыңыз.
 20. Магнитті штативте пробиркалардың қақпақтарын **10 минут бойы** ашық қалдырып, сорбентін кептіріңіз.
 21. **70 мкл элюциялауға арналған буфер** қосыңыз және вортексте араластырыңыз.
 22. Пробиркаларды 60 ° С температурадағы термостатқа 5 минутқа салып, 2 минуттан соң вортексте араластырыңыз.
 23. Тамшыларын қысқа уақытта вортексте тұндырыңыз және пробиркаларды магнитті штативке ауыстырып салыңыз. 2 минут инкубациялаңыз. Тұнбаүстілік сұйықтықтың құрамында тазартылған РНҚ мен ДНҚ бар.

НАЗАР АУДАРЫҢЫЗ! КТ-ПТР үшін тазартылған РНҚ алу пробиркаларды магнитті штативтен алмай-ақ жүзеге асырылады.

Тазартылған РНҚ 2-ден 8 °С-ге ейінгі температурада 4 сағатқа дейін сақтауға болады. Препаратты ұзағырақ сақтау үшін, сорбентке тиіп кетпей, тұнбаүстілік сұйықтықты стерильді пробиркаға ауыстыру және минус 16 °С-ден аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °С-ден аспайтын температурада жыл бойы сақтау қажет.