

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы

Муқажан Динара Мұсақызы

Қазақстанда ерте кезеңде АҚТҚ жұқпасының диагностикасы үшін
биотехнологиялық әдістерді қолдану

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5В070100 – «Биотехнология»

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы



ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ

БТ кафедра меңгерушісі

PhD, профессор

З.К. Туйебахова

«*06*» *Мамыр* 2019 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Қазақстанда ерте кезеңде АҚТҚ жұкпасының диагностикасы үшін биотехнологиялық әдістерді қолдану»

5B070100 – «Биотехнология»

Орындаған

Муқажан Д.М.

Пікір беруші

химия.ғыл.кан-ы,ассоц.профессор

З.Сакиева Сакиева З.Ж

«*2*» *05* 2019 ж.

Ғылыми жетекші

биол.ғыл.д-ры, ассоц.профессор

Г.В. Курбанова Курбанова Г.В.

«*6*» *Мамыр* 2019 ж.

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы

5B070100 – «Биотехнология»



**Дипломдық жұмыс орындауға
ТАПСЫРМА**

Білім алушы Муқажан Динара Мұсақызы

Тақырыбы : Қазақстанда ерте кезеңде АҚТҚ жұқпасының диагностикасы үшін биотехнологиялық әдістерді қолдану

Университет Ректорының 2018 жылғы «16» қазан №1163- бұйрығымен бекітілген

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі 2019 жылғы «19» сәуір

Дипломдық жұмыстың бастапқы берілістері: Диплом алды өнеркәсіптік практикада алынған материалдар

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі

а) адамның иммунтапшылық вирусының тарихын зерттеу;

б) жаңа қаннан алынған пДНҚ экстракциясы;

в) РНҚ экстракциясы, АмплиСенс АҚТҚ Монитор FRT кезінде реагенттер жиынтығын пайдалану;



г) CobasTaqMan48 реагенттерінің жиынтығын пайдаланған кездегі РНҚ экстракциясы.


Ұсынылатын негізгі әдебиет: 19 атау

Дипломдық жұмысты дайындау
КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кеңесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Әдебиетке шолу	Қаңтар	
Материалдар мен әдістер	Ақпан	
Зерттеу нәтижелері	Наурыз	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кеңесшілері мен норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған
қолтаңбалары

Бөлімдер атауы	Кеңесшілер, аты, әкесінің аты, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Әдеби шолу	биол.ғыл.д-ры, ассоц., профессор Курбанова Г.В.	6.05.2019	
Зерттеу объектісі және әдісі			
Зерттеу нәтижелері			
Норма бақылау	Абильдаева А.Ж ғылыми магистрі	06.05.2019	

Ғылыми жетекші  Курбанова Г.В.

Тапсырманы орындауға алған білім алушы  Мукажан Д. М.

Күні « 06 » 05 2019 ж.

МАЗМҰНЫ

Кіріспе	9
1 Әдеби шолу	10
1.1 Адамның иммунтапшылық вирусының тарихын зерттеу	10
1.2 АҚТҚ-ның құрылымы	10
1.3 АҚТҚ инфекциясының клиникалық ағымы	12
1.4 Әлемдегі АҚТҚ-инфекциясының эпидемиологиялық жағдайы	14
2 Зерттеу материалдары мен әдістер	16
2.1 Зерттеу объектілері және зерттеу әдістері	16
2.2 ИФТ өткізу	16
2.3 Жаңа қаннан алынған пДНҚ экстракциясы	17
2.4 Құрғақ қан тамшысынан пДНҚ-ның экстракциясы	18
2.5 РНҚ экстракциясы, АмплиСенс АҚТҚ Монитор FRT кезінде реагенттер жиынтығын пайдалану	20
2.6 CobasTaqMan48 реагенттерінің жиынтығын пайдаланған кездегі РНҚ экстракциясы	22
2.7 АҚТҚ пДНҚ-сын анықтау үшін амплификация жүргізу	23
2.8 АмплиСенс ВИЧ-Монитор FRT тест-жүйесінде кДНҚ амплификациясы және РНҚ-ның КТ жүргізу	23
2.9 Cobas Taqman 48 тест-жүйесіндегі ПТР-амплификациясы	25
3 Нәтижелер және талқылаулар	27
3.1 ИФТ нәтижелерін есептеу және түсіндіру	27
3.2 Жаңа алынған қанды пайдалана отырып, АҚТҚ пДНҚ анықтаудың салыстырмалы талдауы	29
3.3 АмплиСенс АҚТҚ - мониторы FRT и COBAS TaqMan 48 тест-жүйесін пайдалануын салыстырмалы түрде талдау	34
Қорытынды	37
Қысқартылған терминдер тізімі	38
Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	39

АҢДАТПА

Дипломдық жұмыстың мақсаты АҚТҚ-инфекциясын ерте сатысында анықтау кезінде молекулалық әдістерді қолдану тиімділігін зерттеу болып табылады.

Жұмыста барысында зерттеудің ақпараттық, эпидемиологиялық, биотехнологиялық, графикалық, зертханалық және статикалық әдістері қолданылды. Жүргізілген зерттеу нәтижелері ПТР әдісін нәрестелерде АҚТҚ-ны ерте анықтау үшін қолдану қажет деп есептейтінін көрсетті. ҚҚТ-сы әдісімен ДНҚ АҚТҚ анықтау тиімділігі жаңа алынған қанды талдау әдісімен салыстырғанда 99,9% құрады. АҚТҚ РНҚ - ға зерттелетін тест-жүйелердің жоғары аналитикалық сезімталдығы бар, өте дәл көрсетілген. ҚҚТ-сын зерттеу - табыс деңгейі төмен елдер үшін ыңғайлы әдістеме: бұл әдістің артықшылықтары үлгіні жинау қарапайымдылығын (венепункция талап етілмейді, өйткені ҚҚТ-сын өкшеге шаншу арқылы алуға болады), сондай-ақ төмен температураны талап етпейтін сақтау мен тасымалдауды қамтиды.

Дипломдық жұмыс 32 беттен, 7 кестеден, 16 суреттен, 19 әдебиеттен тұрады.

АННОТАЦИЯ

Целью дипломной работы является изучение эффективности применения молекулярных методов при выявлении ВИЧ - инфекции на ранней стадии.

В работе были использованы информационные, эпидемиологические, биотехнологические, графические, лабораторные и статические методы исследования. Результаты проведенного исследования показали, что использование метода ПЦР для ранней диагностики ВИЧ у младенцев считается необходимым. Эффективность выявления ДНК ВИЧ методом СКК составила 99,9% по сравнению с методом анализа цельной крови. Показано, что исследуемые тест - системы на РНК ВИЧ имеют высокую аналитическую чувствительность, очень точны. Исследование СКК - удобная методика для стран с низким уровнем доходов: преимущества этого метода включают простоту сбора образца (венепункция не требуется, так как СКК можно получить путем укола в пятку), а также хранение и транспортировку, не требующих пониженной температуры.

Дипломная работа изложена на 32 страницах, содержит 7 таблиц, 16 рисунков, 19 литературных источников.

ANNOTATION

The aim of the thesis is to study the effectiveness of molecular methods in the detection of HIV infection at an early stage.

Information, epidemiological, biotechnological, graphic, laboratory and static research methods were used in the work. The results of the study showed that the use of PCR for early diagnosis of HIV in infants is considered necessary. The effectiveness of detection of HIV DNA by CCM was 99.9% compared with the method of whole blood analysis. It is shown that the test systems on HIV RNA have high analytical sensitivity and are very accurate. The CCM study is a convenient technique for low-income countries: the advantages of this method include ease of sample collection (venipuncture is not required, since CCM can be obtained by injection into the heel), as well as storage and transportation that do not require low temperature.

The thesis is presented on 32 pages, contains 7 tables, 16 figures, 19 literature sources.

КІРІСПЕ

АҚТҚ (Адамның Қорғаныш Тапшылығы Қоздырғышы) әлі күнге дейін денсаулық қоғамының жаһандық негізгі мәселесі болып табылады. Шығыс-Еуропа және Орталық Азияда, басқа елдердегідей Қазақстанда да індет негізінен халықтың осал топтарының арасында таралған, оған инемен есірткі қолданатын, жеңіл жүріспен айналысатын, сотталғандар, есірткі тұтынушылардың жыныстық серіктестері жатады. АҚТҚ жұқпасының жыныстық жолмен таралуы жоғарылағандықтан, жалпы АҚТҚ жұқпасымен өмір сүрушілердің арасында әйел адамдар басымырақ болып барады.

01.01.16 жылы (кумулятивті) Қазақстан Республикасында АҚТҚ жұқпасы бойынша 26690 оқиға тіркелді, оның ішінде Қазақстан Республикасының азаматтары – 24427, шет елдік азаматтар – 1705, жасырын түрде тексерілгендер – 558 адам [1,2].

Зерттеу мақсаты: молекулярлық әдісті тиімді пайдалана отырып, АҚТҚ жұқпасын ерте кезден бастап анықтау болып табылады.

Жұмыстың мақсатына жету үшін келесі міндеттер мен тапсырмалар орындалды:

1 АҚТҚ індетін жұқтырған аналардан туылған балалардан АҚТҚ жұқпасын ерте диагностикалау үшін молекулярлық әдістің пайдаланылуын бағалау;

2 ПЦР арқылы АҚТҚ жұқпасын ерте диагностикалау үшін ҚҚТ-ны пайдалануды бағалау;

3 АҚТҚ жұқпасының ағымын бағалау үшін клиникалық тәжірибеде вирустық жүктеме үшін сынақ-жүйесін қолданудың тиімділігін растау.

1 Әдеби шолу

1.1 Адамның иммунтапшылық вирусының тарихын зерттеу

Адамның иммунтапшылық вирусы вирустың мутацияға яғни өзгеріске түсу нәтижесінде пайда болған және де ол Орталық Африкада резервуардағы *Pan troglodytes troglodytes* шимпонзе түрлері үшін патогенді болып есептелінді. Бұл 1930 жылдары болған. Сонымен қатар, 1959 жылы Конго Демократиялық Республикасында. АҚТҚ жұқпасын алғаш адамның жұқтырғаныны туралы деректер бар. Вирус табылған өте көне қан үлгісі Конгодан шыққан Банту тайпасының өкіліне тікелей қатысты (Zhu et al. 1998). Алайда, ЖҚТБ-ның бірінші клиникалық жағдайлары пайда болғанға дейін, осы вирус ұзақ уақытқа дейін белгісіз болды [2].

Ретровирус саласында жұмыс жасайтын ғалымдар ЖҚТБ-ның пайда болу себебі, ретровируспен байланысты екендігіне көз жеткізді. Сол үшін бірқатар себептер болды. Біріншіден, өзінде CD^{+4} антигені бар Т-лимфоциттерінің субпопуляция деңгейінің әжептәуір төмендеуі ЖҚТБ үшін айтарлықтай маңызды. Негізгі вирустың мақсаты – Т-лимфоциттері, олардың бетінде CD^{+4} антигені бар. Бұндай ерекше қасиетке тек лимфотропты ретровирустар ғана ие болуы мүмкін, яғни HTLV вирусы, жыныстық қатынас кезінде қан немесе шырышты гениталий арқылы жұғуы мүмкін. Осының бәрі жеткілікті түрде ЖҚТБ-ның эпидемиологиялық сипаттамасына сәйкес келеді. Американың денсаулық сақтау орталықтары, гемофилиямен ауратын науқастардан ЖҚТБ-ны анықтап, сүзілген қан сарысуын алған. Бұл этиологиялық фактор тек вирустық бөлшектерден үлкен емес микроағза болуы мүмкін екендігін көрсетті.

1.2 АҚТҚ-ның құрылымы

АҚТҚ жұқпасының қоздырушысы үлкен ретровирустар отбасының *Lentivirinae* тобындағы АҚТҚ-1 және АҚТҚ-2 лентивирустары болып табылады. Тағы да бір екі ретровирус адамға патогенді – 1 және 2 – ші түрдегі Т – лимфотрофты вирустар, бірақ олар лентивирустар сияқты цитоплазмалық емес, жасушаларды түрлендіре отыра әсер етеді. Көптеген жануарлардың түрлеріне басқа лентивирустар патогенді (мысалы; қойларға, жылқыларға, сиырларға, мысықтарға, маймылдарға, ешкілерге). *Lentivirinae* тобының өкілі орталық жүйке жүйесін зақымдай отырып және вирустың тұрақты түрде көбеюіне, және де ұзақ латентті кезең созылмалы инфекциялар тудырады.

Нуклеокапсидті қоршағанвирустық бөлшектердің матриксі, өз кезегінде, липидті мембранамен қоршалған, ол вирион жасушадан шыққан уақытта пайда болады, және ол «вирустық мембрана» деп аталатын вирионның құрамы жасушалық мембрананың фрагменті болып табылады.

Сонымен қатар, вирус өз иесінен кейбір ақуыздарды ала алады, мысалы, МНС молекулалары (гистокіріктірілген молекулалары немесе HLA –

лейкоцитті АН) вирустық мембрана бетінде жиі кездеседі. Вирустың қабықшаларының ақуыз компоненттері вирустық ақуыз қабықшаларымен (gp41 және gp120) көрсетілген, олар АҚТҚ-ның көбеюінде және оның иммундық жүйемен өзара байланысын да маңызды рөл атқарады [3,4].

1.2.1 АҚТҚ геномы. АҚТҚ-ның әртүрлілігі

Ретровирустар тобындағы вирустарының маңызды ерекшелігі – РНҚ матрицасындағы екі тізбекті ДНҚ синтезінің реакциясын жүзеге асыру мүмкіндігі болып табылады. Бұл процес арнайы түзету механизмдерінен нашар қолдау көрсетілген. Бұл дегеніміз, ОТ кезінде пайда болған әрбір мутация ұрпаққа тіркелуіне мүмкіндігі зор, және шын мәнінде, АҚТҚ-ның репликациясы өздігінен жүретін мутациялардың өте жоғары жиілігімен сипатталады (бір репликациялау циклінде орта есеппен бірден онға дейін қателер кездеседі). Вирустың репликациясын айтарлықтай жылдамдатудың және бір адамның мутация жылдамдығының ұлғаюы нәтижесінде, квазивидам деп аталатын вирустың көптеген түрлері жинақталады.

Ішкі ақуыздарды кодтайтын (group-specific antigen, шамамен 2000 нуклеотидтер) құрылымдық гендер құрамына жатады, pol, өзінің көбеюіне қажетті АҚТҚ-1-дің үш ферментін кодтайды (polymerase, шамамен 2900 нуклеотидтер) және env, gp120 және gp41 (envelope, шамамен 1800 нуклеотидтер) ақуыздар қабықшаларын кодтайды. Функциялары әртүрлі АҚТҚ геномында ақуыздардың құрылымдық емес гендері бар. Олар: tat, rev, vif, nef, vpr және vpx (АҚТҚ-2 –де vpx).

РНҚ молекуласының екі жақ шетінде бірін-бірі қайталаушы тізбектер орналасқан. Бұл тізбектер АҚТҚ-ның көбею қарқынын анықтайтын, АҚТҚ транскрипция промоторының жалғыз және басты рөлі болып табылады [7,8].

АҚТҚ-1 вирусы 10 түрлі түрге бөлінеді: А–D, F–H, J, және K. Вирустың кіші түрлері env гендерінің (30%) және gag гендерінің (14 пайызы) нуклеотидті бірізділігіне байланысты өзара ерекшелінеді. А және F ішкі бөлшектері ішінде қосымша түрлер бөлінеді, А1 және А2, сондай-ақ F1 және F2 сияқты белгіленеді. Аталған сорттар фелогенетикалық тығыз байланысты деп саналады [5].

1.2.3 АҚТҚ-ның өмірлік циклі

АҚТҚ вириондары ағзаның қан мен лимфа жүйесіне еніп, ағзада қан мен лимфа ағымымен қозғалады. CD⁴ жасушасының жанында болған АҚТҚ вириондары CD⁴ рецепторын, оның плазмалық мембранасында байланыстырады.

Gp120 вирусты гликопротеин CD⁴ рецепторын берік байланыстырады. прочно связывает рецептор CD⁴. Gp120 өзара әрекеттесуінің нәтижесінде CXCR4 немесе CCR5 корецепторының молекуласын байланыстыруға мүмкіндік беретін конформациялық өзгерістерге ұшырайды (Т-лимфоциттердің,

макрофагтардың, дендрит жасушаларының және микроглияның бетінде экспрессияланатын). Осы корецепторларды байланыстыру қабілетіне байланысты АҚТҚ-ны R5-тропикалық (тек CCR5 корецепторы байланыстырады), X4-тропикалық (тек CXCR4 корецепторы байланыстырады) және R5X4-тропикалық (екі корецепторлармен өзара әрекеттесуі мүмкін) нұсқаларға жіктейді.

Одан әрі gp41 вирустық ақуыз жасушаның мембранасына өтеді және айтарлықтай конформациялық өзгерістерге ұшырайды, соның есебінен АҚТҚ жасушасының мембранасы мен вирион мембранасы бір-біріне жақындап, содан кейін бірігеді.

Мембрананың қосылуынан кейін вирионның ішіндегісі жасушаның ішіне енеді. Жасушаның ішіндегі вирустық РНҚ капсидтен босатылады. Содан кейін кері транскриптазаның әсерімен кері транскрипция, вирустың біртізбекті геномдық РНҚ-сында ақпарат негізінде ДНҚ синтездеу процесі жүреді.

CD⁴⁺ – лимфоциттегі кері транскрипция аяқталғаннан кейін, құрылмаған ДНҚ-дағы вирусты геном көрсетілген. Иесіне, жасушаның геномына вирустық ДНҚ-ны енгізу үшін және жаңа вирустардың пайда болуы үшін Т-лимфоциттерді белсендіру қажет. CD4+ – лимфоциттерді белсендіру, лимфоидты ұлпада АГ ұсынатын жасушалармен байланыс кезінде болады. Фолликулярлы дендритті жасушалардың бетінде вирустардың болуы және қабынуға қарсы цитокиндердің болуы жұқтырылған жасушаларда АҚТҚ-ның көбеюіне ықпал етеді. Сондықтан лимфоидты ұлпа АҚТҚ репликациясы үшін ең қолайлы орта болып табылады [6].

АҚТҚ вирионының өмірлік циклі мынадай негізгі кезеңдерден тұрады:

- 1) лимфоциттердің рецепторларымен байланыстыру;
- 2) вирустың (РНҚ) жасушаның ішіне кіруі;
- 3) кері транскрипция және ДНҚ провирусінің түзілуі;
- 4) жасуша геномының ДНҚ провирусіне интеграциясы - иесінің;
- 5) вирустың репликациясы, жаңа вирустық бөлшектердің РНҚ праймерлерінің пайда болуы;
- 6) ядродан цитоплазмаға жаңа вирустық бөлшектерді шығаратын РНҚ. Жаңа вирусты бөлшектерді инкапсулирлеу, шығарып алу және қалыптастыру ұлпа сұйықтығына шығарады [7].

1.3 АҚТҚ инфекциясының клиникалық ағымы

АҚТҚ-1 жұқпасынан сероконверсияға дейінгі кезең – инфекцияның өте маңызды кезеңі болып табылады. Бұл кезеңді инфекцияның даму мүмкіндігін немесе вирустың жойылуын анықтайтындығына, сондай-ақ вирустың қанмен берілу мүмкіндігіне (реципиентке-серіктеске) байланысты бірнеше кезеңге бөлуге болады.

Эпидемиологиялық талдауды жинау пациенттен немесе ол ұсынған келесі медициналық құжаттардан тұрады:

1 АҚТҚ-ны жұқтырудың өте жоғары қаупін білдіретін фактілер:

- қан немесе оның препараттарын құю, АҚТҚ жұқтырған адамнан ағзалар мен тіндерді ауыстырып салу;

- АҚТҚ жұқтырған әйелден туылған баланы зерттеген.

2 АҚТҚ жұқтырудың жоғары қаупін білдіретін фактілер:

- АҚТҚ жұқтырған анадан зерттелетін адамның тууы;

- АҚТҚ жұқтырған науқастармен тұрақты қорғалмаған (мүшеқапты пайдаланбастан) жыныстық қатынас немесе онымен бірге психобелсенді заттарды парентеральды қабылдау;

- АҚТҚ жұқтырған баланы емізу;

- баланы АҚТҚ-инфекциясын жұқтырған әйелдің емізуі (емшек сүтін қолдану арқылы).

3 АҚТҚ жұқтырудың белгілі бір қаупін білдіретін фактілер:

- парентеральды араласулар немесе АҚТҚ-мен контаминацияланған құралдармен жүзеге асырылған зақымданулар (яғни АҚТҚ-ның ауруханаішілік және оларға ұқсас кезінде АҚТҚ-инфекциясын парентеральды жолмен немесе АҚТҚ-ның таралу деңгейі жоғары аумақтарда);

- тері жамылғыларының немесе шырышты қабықтарының АҚТҚ-ның контаминирленген құралдарымен зақымдануы (мысалы, АҚТҚ - инфекциясымен ауыратын науқасқа медициналық көмек көрсету кезінде), тексерілушінің зақымданған терісіне немесе АҚТҚ-инфекциясымен ауыратын науқастың шырышты қабықшасына қанның түсуі;

- АҚТҚ жұқтырғандармен бір рет жыныстық қатынас немесе мүшеқапты пайдаланып тұрақты жыныстық қатынас жасау (оны дұрыс пайдаланбау кездері болуы мүмкін);

- жыныстық байланыстар, АҚТҚ қауіпті тобтың ортасында таралған, емделуші жататын, аумақтарда есірткіні парентеральды қабылдау;

- АҚТҚ-ның таралу деңгейі жоғары аумақтарда (барлық халықтың >1 %) қан құю, ағзалар мен тіндерді ауыстырып салу, парентеральды араласу.

4 АҚТҚ-ның жұғу мүмкіндігін куәландыратын фактілер:

- АҚТҚ-ның таралу деңгейі төмен аумақтарда жыныстық байланыс, психобелсенді заттарды қабылдау, парентеральды араласу.

АҚТҚ-инфекция сатыларының сипаттамасы:

1-ші кезең - инкубация сатысы – «өткір инфекция» клиникалық көріністер түрінде жұқтыру кезеңінен бастап, ағзаның реакциясы пайда болғанға дейінгі және антиденелерді өндіру кезеңі. Оның ұзақтығы әдетте 4 аптадан 3 айға дейін, бірақ жекелеген жағдайларда 1 жылға дейін созылуы мүмкін. Осы кезең аралығында АҚТҚ-ның белсенді көбеюі жүріп жатады, алайда аурудың клиникалық белгілері жоқ және АҚТҚ-ға АТ әлі анықталмайды. АҚТҚ-инфекция диагнозы осы кезеңде эпидемиологиялық деректер негізінде қойылады, нуклеин қышқылдары, оның АГ-сы, және де ол пациенттің қанында АҚТҚ анықталуынан, зертханалық расталуы мүмкін [6].

2-ші кезең – бастапқы көріністер сатысы. Осы кезеңде АҚТҚ-ның белсенді репликациясы жалғасуда, алайда АТ дайындау және клиникалық

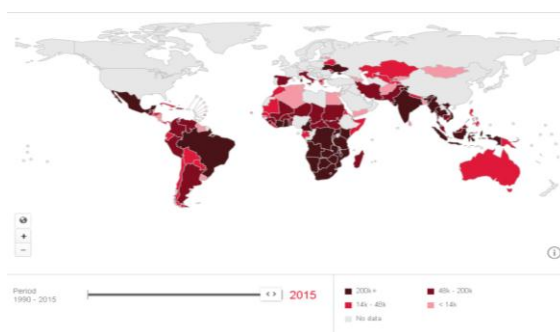
белгілер түрінде қоздырғышты енгізугенде ағзаның бастапқы жауабы байқалады. Науқас сероконверсиядан (ат АҚТҚ-ға пайда болу) кейін, 12 ай аралығында өткір АҚТҚ-инфекция сатысында болады деп саналады [8].

1.4 Әлемдегі АҚТҚ-инфекциясының эпидемиологиялық жағдайы

АҚТҚ жұқпасы Шығыс Еуропа мен Азия елдерінде аса жылдам қарқынмен тарайды, және де Қытай, Үндістан және Индонезия сияқты тығыз қоныстанған елдер ерекше алаңдаушылық тудырады (1-сурет). Кейбір дамыған елдерде ерлер арасындағы жыныстық қарым-қатынастың ауыр зардаптары пайда болды.

Халықаралық қауымдастықтың ЖҚТБ-ның маңызды мәселесіне деген жауабы, қаржы ресурстарының бұрын-соңды болмаған көлемін бөлу болды, алайда, ЖҚТБ-ның тиімді күресуіне қажетті соманың жартысынан кемі.

2005 жылғы ең жоғарғы көрсеткішпен салыстырғанда, ЖҚТБ-мен байланысты өлім саны 45 % - ға төмендеді. 2015 жылы ЖҚТБ-мен байланысты қайтыс болған адамдардың саны бүкіл әлемде 1,1 миллион адамды құрады, 2005 жылы салыстыру үшін бұл сан 2 миллионды құрады [9].



1 Сурет - АҚТҚ-мен өмір сүретін адамдар саны

2015 жылы әлемде АҚТҚ-инфекциясы бар шамамен 36,7 миллион адам болды, ал әлемде 2,1 миллион адам 2015 жылы АҚТҚ-инфекциясын жұқтырды.

Ең зақымдалған аймақ Сахарадан оңтүстікке қарай Африка елі - бұл жерде 2015 жылы АҚТҚ-мен 25,6 миллион адам өмір сүрді. Бұл өңірге сондай-ақ, жаңа АҚТҚ-жұқпаларының жалпы жаһандық санының үштен екісі келеді.

ЮНЭЙДС бағалауының соңғы жаңартуларында, 2020 жылы ЖҚТБ-ға қарсы 26,2 млрд. АҚШ доллары, ал 2030 жылы – 23,9 млрд. АҚШ доллары қажет болды.

АҚТҚжұқтырғандардың 2015 жылға арналған аймақтық статистикасы 1-кестеде көрсетілген [10].

1 Кесте - 2015 жылғы АҚТҚ жұқтырғандардың өңірлік статистикасы

Аймақ	АҚТҚ-мен өмір сүретін адамдар	АҚТҚ жұқтырудың жаңа түрлері			ЖҚТБ-ға байланысты өлім (барлығы)	АРТ алатын адамдардың жалпы саны
		Барлығы	15 жастан жоғарылар	0-14 жас аралығындағылар		
Шығыс және Оңтүстік Африка	19,0 млн. [17,7 млн.- 20,5 млн.]	960 000 [830 000- 1,1 млн.]	910 000 [790 000- 1,1 млн.]	56 000 [40 000- 76 000]	470 000 [390 000- 560 000]	10 млн.
Латын Америкасы және Кариб бассейні	2,0 млн. [1,7 млн.- 2,3 млн.]	100 000 [86 000- 120 000]	100 000 [84 000- 120 000]	2100 [1600- 2900]	50 000 [41 000- 59 000]	1,1 млн.
Батыс және Орталық Африка	6,5 млн. [5,3 млн.- 7,8 млн.]	410 000 [310 000- 530 000]	350 000 [270 000- 450 000]	66 000 [47 000- 87 000]	330 000 [250 000- 430 000]	1,8 млн
Азия-Тынық мұхит аймағы	5,1 млн. [4,4 млн.- 5,9 млн.]	300 000 [240 000- 380 000]	280 000 [220 000- 350 000]	19 000 [1 6 000 - 21 000]	180 000 [150 000- 220 000]	2,1 млн.
Шығыс Еуропа және Орталық Азия	1,5 млн. [1,4 млн.- 1,7 млн.]	190 000 [170 000- 200 000]	190 000 [170 000- 200 000]	*	47 000 [39 000- 55 000]	320 000
Таяу Шығыс және Солтүстік Африка	230 000 [160 000- 330 000]	21 000 [12 000- 37 000]	19 000 [11 000- 34 000]	2100 [1400- 3200]	12 000 [8 700- 16 000]	38 000
Батыс және Орталық Еуропа және Солтүстік Америка	2,4 млн. [2,2 млн.- 2,7 млн.]	91 000 [89 000- 97 000]	91 000 [88 000- 96 000]	*	22 000 [20 000- 24 000]	1,4 млн.

2 Зерттеу материалдары мен әдістері

2.1 Зерттеу объектілері және зерттеу әдістері

Бұл зерттеуде молекулалық тестілерді орындау кезінде келесі маркерлер қолданылды:

- ИФТ (клиникалық материал – сарысу);
- АҚТҚ ДНҚ (клиникалық материал – 119 үлгінің тұтас қаны, 119 үлгінің ҚҚТ);
- АҚТҚ РНҚ (клиникалық материал – плазма);

2.2 ИФТ өткізу

Бұл зерттеуде адам сарысуындағы немесе плазмасындағы АГ р-24 және АТк АҚТҚ1 (М және О топтарын қоса алғанда) және АҚТҚ 2-ні анықтау үшін иммуноферменттік талдау үшін, Дженскрин ультра АГ/АД жиынтығы қолданылды. Жиынтық АҚТҚ АГ үшін де, сондай-ақ анти-АҚТҚ АД бойынша скрининг үшін де пайдаланылуы мүмкін.

Дженскрин ультра АҚТҚ АГ/АД – адамның сарысуындағы немесе плазмасындағы АҚТҚ1 және / немесе АҚТҚ2 вирустарымен байланысты АҚТҚ антигендерін және түрлі антиденелерді анықтау үшін, «сэндвич» әдісінің қағидатына негізделген, иммуноферментті жиынтық.

Талдау келесі қадамдарды қамтиды:

1 Конъюгат 1 (р-24 АҚТҚ1 АГ биотинирленген поликлональды АД) планшетті ұяшықтарға енгіземіз.

2 Зерттелетін сарысулар мен бақылау үлгілері шұңқырларға енгізіледі. Зерттелетін сарысуда АҚТҚ антигені болған жағдайда, оны планшетте сорбцияланған антиденемен байланыстыру жүргізіледі. Зерттелетін сарысуда АҚТҚ1 және/немесе АҚТҚ2 антидене болған жағдайда, оларды планшетте сорбцияланған АҚТҚ1 және/немесе АҚТҚ2 антигендерімен байланыстыру жүргізіледі. Зерттелетін сарысудағы 1 конъюгатты және АГ/АД-ны байланыстыру, сары-жасыл түстен көкке дейін түстің өзгеруі арқылы анықталады (2-сурет).



2 Сурет - Конъюгат 1 және АГ/АТ байланысуы

3 37 °С инкубациядан кейін және кейіннен жуып шаюда 2-ші конъюгатты қосамыз. Стрептавидин АД-АГ-АД биотинденген кешендерімен әрекеттеседі. Пероксидазамен таңбаланған, тазартылған АҚТҚ1 және АҚТҚ2 АГ планшетте сорбцияланған АТ IgG, IgM немесе IgA-мен кезек бойынша байланысады.

4 Инкубациядан кейін 18-30°С 2-ші конъюгаттың байланыспаған фракциясын жуу арқылы алып тастайды. Инкубациядан кейін бөлме температурасында (18-30°С) субстраттың қатысуымен АГ/АД конъюгат кешенінің болуы түстің өзгеруі бойынша анықталады.

5 Реакция тоқта – реагент арқылы тоқтайды және 450/620-700 нм толқын ұзындығы кезінде спектрофотометрді пайдалана отырып, оптикалық тығыздықты өлшейміз. Оптикалық тығыздық, үлгіде өлшенетін, АГ-ның немесе АТ-ның АҚТҚ1 және / немесе АҚТҚ2 болуын немесе болмауын анықтайды[11].

2.3 Жаңа қаннан алынған пДНК экстракциясы

«Нақты уақыт» режимінде амплификация өнімдерінің гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы арқылы, ПТР әдісімен пДНК спецификалық фрагментін амплификациялау жолымен, АҚТҚ пДНК-сын анықтауға арналған «АмплиСенс ДНК-АҚТҚ-FL» реагенттерінің жиынтығын пайдаландық. ПТР жүргізу үшін адам қанынан алынған ДНК сынамасы материал болды.

Талдау жүргізу үшін пайдаланылады:

Таңертең аш қарынға алынған қан, антикоагулянт ретінде, ЭДТА ерітіндісі бар пробиркаға алынған. Қан құйылған түтікшені алғаннан кейін, қақпақпен жабылады, 3-4 рет айналдырып араластырылады және 2-ден 8 °С-қа дейінгі температурада 48 сағаттан артық сақталмайды.

Алынған лейкоциттер тұнбасы минус 16 °С-тан аспайтын температурада екі аптаға, ал минус 68 °С-тан аспайтын температурада ұзақ уақыт, және тез арада лизациялануы немесе мұздатылуы мүмкін.

Клиникалық материалдың лизисі:

1 Оң ОБ қосымша бір пробиркасын таңдаймыз және оған 5 мкл ОБ ДНК АҚТҚ-1 және адам ДНК-сын енгіземіз.

2 Бір қосымша пробиркасын таңдаймыз және оған 5 мкл РНҚ-буферді енгіземіз.

3 Лейкоциттер бар пробиркаларға және бақылау үлгілері бар пробиркаларға лизис үшін 300 мкл ерітіндіні қосыңыз.

4 Пробирканың ішіндегісін вертекспен мұқият араластырып, термостатта 650с болғанда 5 минут қыздырыңыз.

5 Преципитация үшін 400 мкл ерітіндіні пробиркаға қосыңыз, вертекске араластырыңыз.

6 Микроцентрифугадағы шыны түтіктерді 5 минут бойы 13 мың айн/мин. центрифугадан өткіземіз.

7 Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін сүзгішсіз жеке ұштықты пайдалана отырып, тұнбаны емес тұнба үстіндегі сұйықтықты мұқият алып тастаңыз.

8 Жуу үшін 500 мкл ерітіндісін қосыңыз, қақпақты тығыз жабаңыз, пробиркаларды 3-5 рет айналдыра отыра, тұнбаны абайлап жуаңыз. Процедураны барлық пробиркалар үшін бір мезгілде жүргізуге болады, ол үшін пробиркаларды штативке қақпақпен жауып, оларды қыса отыра, штативпен айналдыру қажет.

9 Микроцентрифугада 1 мин бойы 13 мың айн/мин центрифугада центрифугалау.

10 Тұнбаға тигізіп алмай, вакуумдық сорғышты немесе әр сынама үшін филтрсіз жеке ұштықты пайдалана отырып, тұнбадағы сұйықтықты жинаймыз.

11 Пробиркаларға 200 мкл-ден ерітіндісін қосыңыз, қақпақты тығыз жабаңыз және 3-5 рет пробиркаларды айналдыра бұрап, тұнбаны абайлап жуаңыз.

12 Микроцентрифугада 1 минут ішінде 13 мың айн/мин центрифугалау.

13 Тұнбаға тигізіп алмай, вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін филтрсіз жеке ұштықты пайдалана отырып, тұнба үстіндегі сұйықтықты жинаймыз.

14 Қақпағы ашық пробиркалардағы тұнбаны кептіру үшін 65°C температурада 5 минутқа термостатқа орналастырамыз.

15 Пробиркаларға 50 мкл РНҚ-буфер қосыңыз. Вертекске араластырыңыз. 65 °C температурадағы термостатқа 5 минутқа салып, мезгіл-мезгіл вертекске сілкіңіз.

16 Микроцентрифугада пробиркалар 1 минут ішінде 13 мың айн/мин центрифугаланады. Тұнған сұйықтықта тазартылған ДНҚ бар. Сынамалар ПТР қоюға дайын.

Тазартылған ДНҚ 2-ден 8°C дейінгі температурада және минус 16 °C жоғары емес температурада 1 жыл бойы сақтауға болады.

2.4 Құрғақ қан тамшысынан пДНҚ-ның экстракциясы

Талдау жүргізу үшін 903® Whatman үлгісіндегі қағаз карточкасында кептірілген қан дақтары пайдаланылады. Құрғақ қан дақтарын дайындау процедурасы Әлемдік Денсаулық сақтау Ұйымы ұсыныстарына сәйкес жүргізіледі.

Қағазға қан үлгісін жағу процедурасы: әрбір препаратқа бір карточка келеді. Карточканың әрбір шеңберіне 50 мкл-ге жуық бір тамшы жағылды. Қағазға қан жағу кезінде тамшы шеңбердің көп бөлігін алу қажет. Дұрыс толтырылған карточка кем дегенде үш шеңбер қанмен дұрыс толтырылған болуы керек. Карточкаға қан жағылғаннан кейін картаны 18-ден 25 °C-қа дейінгі температурада 4-12 сағат бойы кептірді (тікелей күн сәулесінен сақтау).

Содан кейін карточкаларды тасымалдау немесе сақтау үшін zip-Lock типті пакеттерге (жоғары ылғалдылықтан қорғайтын пакеттер) кептіргіштермен бірге (пакетке 10 данаға дейін) салынған. Әрбір пакетке ылғалдылық индикаторын салу ұсынылады (пакетке 1 дана). Бір пакетке 10 жеке карточкаға дейін салынуы мүмкін. Кептірілген және буып-түйілген карточкалар ылғалдылығы төмен жағдайларда 2-8 °С кезінде 6 ай бойы сақталуы мүмкін. ҚҚТ карточкалары бөлме температурасында тұрғандары, екі апта бойы зертханаға тасымалдануы мүмкін.

1 Сынамалар мен бақылаулардың қажетті санына сәйкес 1,5 мл шыны түтіктерді дайындаңыз, таңбалаймыз.

2 Алдын-ала стерилденген компостерлердің қажетті санын алыңыз.

3 Әрбір үлгі үшін жеке компостерді пайдалана отырып, тиісті пробиркаларға қанның құрғақ дақтары бар шеңберлерді таңдаймыз. Материалдың жеткілікті мөлшерін алу үшін, компостер арқылы 4-5 кесе отыра, бір бүтін қан дақтарын кесіңіз.

4 ОБ қосымша бір пробиркасын таңбалаймыз және оған 5 мкл ПКО ДНҚ АҚТҚ-1 және адам ДНҚ-сын енгіземіз.

5 Бір қосымша түтікшені белгілейміз және оған 5 мкл РНҚ-буферді енгіземіз.

6 Құрғақ қан дақтары бар қағазға және бақылау үлгілері бар пробиркаларға лизис үшін 700мкл ерітіндіні қосамыз. Жабамыз, пробиркалар мен вортексте пробирка ішіндегілерді араластырамыз.

7 Шыны түтіктерді термостатқа қоямыз, 65 °С кезінде 30 минут қыздырамыз. Инкубация кезінде пробиркаларды әрбір 10 минут сайын вортекспен шайқаңыз.

8 Инкубация кезінде клиникалық үлгілер үшін 1,5 мл жаңа пробиркалардың қажетті санын дайындаңыз және таңбалаймыз.

9 Термостаттан шыны түтіктерді алып, оларды микроцентрифугада 10 мың айн/мин-да 1 минут ішінде центрифугалау.

10 Клиникалық үлгілер үшін отырғызылатын сұйықтықты, таңбаланған жаңа пробиркаларға ауыстырамыз. Сұйықтықтың ең көп мөлшерін аламыз.

11 Преципитация үшін 600 мкл ерітіндіні пробиркаға қосыңыз, вертекске араластырыңыз.

12 Микроцентрифугадағы пробиркаларды 5 минут бойы 13 мың айн/мин центрифугалаймыз.

13 Вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін филтрсіз жеке ұштықты пайдалана отырып, тұнба үстіндегі сұйықтықты мұқият алып тастаңыз.

14 Жууға арналған ерітіндіні 500 мкл-ден қосыңыз, қақпақты тығыз жабамыз, пробиркаларды 3-5 рет айналдыра отыра, тұнбаны абайлап жуамыз.

15 Минут бойы намикроцентрифугада 13 мың айн/мин центрифугалау.

16 Тұнбаға тигізіп алмай, вакуумдық сорғышты және әр сынама үшін филтрсіз жеке ұштықты пайдалана отырып, тұнба үстіндегі сұйықтықты жинаймыз.

17 Пробиркаларға 200 мкл-ден 4-ші жуу ерітіндісін қосамыз, тығыз жабамыз және пробиркаларды 3-5 рет айналдырып, тұнбаларды абайлап жуамыз.

18 Микроцентрифугада 1 минут ішінде 13 мың айн/мин центрифугалау.

19 Абайлаңыз, тұнбаға тигізіп алмай, вакуумды сорғыш және әрбір сынама үшін фильтрсіз жеке ұшын пайдалана отырып, тұнба сұйықтығын бөліп аламыз.

20 Пробиркалардағы тұнбаны кептіру үшін 65 °С температурада 5 минутқа термостатқа орналастырамыз.

21 Пробиркаларға 50 мкл РНҚ – буфер қосамыз. Вертекске араластырыңыз. 65 °С температурадағы термостатқа 5 минутқа салып, мезгіл-мезгіл вертекске сілкіңіз.

22 Шыны түтіктерді микроцентрифугада 1 минут ішінде 13 мың айн/мин-да центрифугалайды. Шөгінді сұйықтықта тазартылған ДНҚ бар. Сынамалар ПТР қоюға дайын.

Тазартылған ДНҚ 2-ден 8 °С дейінгі температурада және минус 16 °С жоғары емес температурада 1 жыл бойы сақтауға болады.

2.5 РНҚ экстракциясы, АмплиСенс АҚТҚ Монитор FRT кезінде реагенттер жиынтығын пайдалану

Талдау жүргізу үшін перифериялық қан плазмасы қолданылды. Қан алу таңертең аш қарынға, 3% ЭДТА ерітіндісі бар пробиркаға, 1:20 есебімен жүргізіледі. Қан бар жабық пробирканы бірнеше рет араластырады. Қан алынған сәттен бастап 6 сағат ішінде плазманы алып, жаңа пробиркаға ауыстыру керек. Бұл үшін қан бар шыны түтікшені 800-1600 g кезінде 20 мин центрифугалайды. Плазманы 2-ден 8 °С дейінгі температурада және минус 68 °С аспайтын температурада ұзақ уақыт сақтауға болады.

«АмплиСенсАҚТҚ-Монитор-FRT» реагенттер жиынтығы гибридизациялық-флуоресцентті детекциясы арқылы, ПТР әдісімен клиникалық материалда АҚТҚ РНҚ-ны анықтауға арналған. ПТР жүргізу үшін материал ретінде РНҚ сынамасы, қан плазмасынан бөлінген.

1 Лизирлейтін ерітіндіні және АҚТҚ-ны жуатын ертіндіні 60 °С температурада кристалдар толық ерігенге дейін қыздырамыз.

2 1,5мл-ге бір рет қолданылатын пробиркалардың қажетті мөлшерін алып тастаймыз. Пробиркаларды маркерлейміз.

3 Әрбір пробирканың түбіне ІБҮ бойынша 10мкл АҚТҚ-М-FRT енгіземіз.

4 12 сынамадан РНҚ экстракциясы кезінде, бакылауларды қоса алғанда, ІБҮ 130мкл АҚТҚ-М-FRT лизирлеуші ерітіндісі бар құтыға қосамыз. Мұқият араластырғаннан кейін, 450мкл қоспаны алдын ала дайындалған пробиркаларға 1,5 мл-ге енгіземіз.

5 Пробиркаларға сүзгіші бар ұштықтарды пайдалана отырып, зерттелетін үлгілердің 100 мкл бойынша енгіземіз. Қақпақты жауып, вертекске

араластырыңыз. Сұйықтықтың тамшысын қақпақтан шығару үшін центрифугаға отырғызамыз.

6 Әрбір панель үшін оң бақылаулар (ОБ-1, ОБ-2). Бұл үшін дайындалған пробиркаға ОБУ-1 лизирлеуші ерітіндісінен 90мкл ТБҮ және 10 мкл ОБУ-1-АҚТҚ қосамыз, ал дайындалған пробиркаға ОБУ-2 лизирлейтін ерітіндісінен 90мкл ТБҮ және 10мкл ОБУ-2-АҚТҚ қосамыз, вортексте пробирка ішіндегіні араластырамыз және қақпақтағы сұйық тамшыларын тұндырамыз.

7 Әрбір панель үшін теріс бақылау (ТБ) қойылды. Ол үшін лизирлеуші ерітіндісі бар пробиркаға 100 мкл ТБҮ қосылды, вортексте араласты және қақпақтан сұйықтықтың тамшылары тұнды.

8 Әрбір түтікке жеке ұштар арқылы 25 мкл ресуспендирленген сорбенттен қосыңыз.

9 Пробирканың ішіндегісін вертексте араластырып, бөлме температурасында 10 минутқа қалдырыңыз, әрбір 2 мин мұқият араластырыңыз.

10 Микроцентрифугадағы пробиркаларды 7 мың g 1 минут ішінде центрифугадан өткіземіз.

11 Тұнба сұйықтығын әрбір түтіктен бөлек ұштықпен алып тастаңыз.

12 Пробиркаларға АҚТҚ-ны жууға арналған 500 мкл ерітіндіні қосамыз. Сорбентті толық ресуспендирлеуге дейін вертекске араластырыңыз. Микроцентрифугадағы пробиркаларды 1 минут ішінде 7 мың g центрифугадан өткіземіз. Шөгінді сұйықтықты алып тастаңыз.

13 3-ші жуу үшін 500 мкл ерітіндісін пробиркаларға қосыңыз. Сорбентті толық ресуспендирлейміз. Микроцентрифугадағы пробиркаларды 1 минут ішінде 7 мың g центрифугадан өткіземіз. Әрбір пробиркадан жеке ұштықпен жуу үшін, 3 ерітіндісін іріктеп аламыз.

14 3-ші жуу үшін ерітіндімен жууды қайталаңыз.

15 Шыны түтіктерге 500 мкл 7 жуу ерітіндісін қосыңыз. Сорбентті ресуспендирлейміз. Микроцентрифугадағы пробиркаларды 1 минут ішінде 7 мың g центрифугадан өткіземіз. Әрбір пробиркадан жеке ұштықпен 7 жуу-ші үшін ерітіндіні толығымен алып тастаңыз.

16 Сорбентті кептіріңіз, 60 °C температурада 10 минутқа ашық қақпағы бар пробиркаларды термостатқа орналастырыңыз.

17 Әрбір пробиркаға элюция үшін 50 мкл буферді қосамыз және сорбентті ресуспендирлейміз. Термостатта 60 °C температурада 5 минут қыздырамыз, вертексте араластырыңыз және 12 мың g 1 минут бойы сорбентті центрифугада тұндырамыз.

РНҚ-сынамалар тазартылған РНҚ алғаннан кейін бірден жүргізуге болады және де ТБ-ПТР реакциясын қоюға дайын.

Препаратты ұзақ уақыт сақтау үшін сорбентке тигізбей, отырғызылатын сұйықтықты стерильді пробиркаға тасымалдау және минус 16 °C-тан аспайтын температурада 1 ай бойы немесе минус 68 °C-тан аспайтын температурада бір жыл бойы сақтау қажет [12,13].

2.6 CobasTaqMan48 реагенттерінің жиынтығын пайдаланған кездегі РНҚ экстракциясы

- 1 Қажетті реагенттерді дайындаймыз:
 - Wash-буфер 80мл 96% спирт қосыңыз;
 - IRB 20мл 96% спирт қосыңыз;
 - ELB-ға 1,5мл-ден 2 пробиркаға құямыз, 70°C жылы термостатқа қойыңыз;
 - РК-ға 5мл қыздырылмаған ELB қосып, араластырыңыз;
 - CAR 500мкл қыздырылмаған ELB қосып, араластырыңыз.
- 2 24 анықтамаға колбада лизирлейтін жұмыс ерітіндісін дайындаймыз:
 - 14мл лизирлейтін ерітінді (жасыл қақпақ)
 - 280мкл CAR;
 - 168 HIV 1QS;
 - 2,8мл РК.
- 3 Қолмен 10 рет араластырыңыз.
- 4 Ақ плашкаларды алып, I және II қол қоямыз, 1-6, 7-12 нөмірін белгілейміз.
- 5 Барлық шұңқырларға 625мкл лизирлеуші жұмыс ерітіндісін қосыңыз.
- 6 Алғашқы үш шұңқырға 500мкл бақылау, содан кейін 500мкл сынама қосамыз.
- 7 Вертексте араластырыңыз.
- 8 Су моншасына 50°C қою, экспозиция 10 минут.
- 9 Алыңыз, судан арылтамыз, 4600айн/мин 20 секунд центрифугалаймыз
- 10 350мкл изопропил спиртін қосып, вертексте араластырыңыз, 4600айн/мин. 20 секунд центрифугалаймыз.
- 11 Сары плашкаларды нөмірлеңіз, нөмірлеуге сәйкес әрбір шұңқырға 750 мл-ден алып, 4600 айн/мин кезінде 2 минутты центрифугалау.
- 12 Қалған 700мкл үлгісін қосыңыз, 4600 айн / мин 2 минут центрифугалау.
- 13 Тіреуішті аққа ауыстырамыз, 400 мкл IRB қосамыз, 4600 айн/мин 2 минут центрифугалау.
- 14 Сүзгішке 700 мкл WASH-буферді қосамыз, 4600 айн/мин кезінде 2 минут центрифугалаймыз.
- 15 Тіреуішті ауыстырамыз, сүзгіге 700мкл WASH-буферді қосамыз, 4600айн / мин. 3 минут центрифугалаймыз.
- 16 Көгілдір плашкаларды алыңыз. Сары плашка сүзгісін көк тірекке ауыстырып, фильтрге тигізбей, әрбір шұңқырдың ортасына 75мкл қыздырылған ELB қосамыз.
- 17 Бөлме температурасында 3 минут инкубациялаңыз.
- 18 4600 айн / мин. 3 минут центрифугалаймыз.
- 19 Сүзгіні алып тастап, көк қақпақтармен жабамыз.
- 20 Үлгілер кері транскрипция өткізуге дайын [14].

2.7 АҚТҚ пДНҚ-сын анықтау үшін амплификация жүргізу

1 Зерттелетін және бақылау сынамаларының ДНҚ амплификациясы үшін пробиркалардың қажетті санын таңдаймыз.

2 15 реакцияға реакциялық қоспаны дайындаймыз. Ол үшін пробиркаға ПТР-қоспасы бар -1-FRT АҚТҚ-ға 160 мкл КТ-ПТР-қоспасы-2-FEP/FRT және 16 мкл полимераза (TaqF) қосып, вертексте мұқият араластырыңыз және пробирканың қақпағынан тамшыларды тұндырыңыз. Реакциялық қоспаның қалдықтарын тастаймыз.

Реакциялық қоспаны дайындағаннан кейін, оны вертексте мұқият араластырыңыз және пробирканың қақпағынан тамшыларды тұндырыңыз.

3 Әр пробиркаға 25 мкл дайын реакциялық қоспадан енгіземіз.

4 Реакциялық қоспасы бар пробиркаларға, сүзгіші бар ұштықтарды пайдалана отырып, зерттелетін немесе бақылау үлгілерінен экстракция нәтижесінде алынған ДНҚ сынамаларын 25мкл бойынша енгіземіз. Пипеттеу арқылы мұқият араластырыңыз.

5 Әрбір панель үшін 2 бақылау реакцияларын қойыңыз:

а) ПТР (K-) теріс бақылауды - пробиркаға 25мкл ТЕ-буферді енгіземіз.

б) ПТР (K+) оң бақылау - пробиркаға 25мкл ОБУ ДНҚ АҚТҚ-1 және адам ДНҚ енгіземіз.

6 Бақылау үлгілері қосылған пробиркаларға, көпіршіктердің пайда болуына жол бермей, пипетирлеумен абайлап араластырыңыз.

7 Үлгілері Rotor Geen 6000 аппаратын жүктеуге дайын (2-кесте).

2 Кесте - Роторлық үлгідегілер үшін «АмплиСенс ДНҚ - АҚТҚ» амплификация бағдарламасы

Кезең	Температура °с	Кезеңнің жалғасы	Флуоресцен-циннің өлшемі	Циклдің саны
Hold/ Темп-ны ұстап тұру	95	15 мин	-	1
Cycling/циклирлеу	95	20 с	-	5
	52	30 с	-	
	72	30 с	-	
Cycling/циклирлеу	95	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	40
	55	30 с		
	72	30 с		

2.8 АмплиСенс ВИЧ-Монитор FRT тест-жүйесінде кДНҚ амплификациясы және РНҚ-ның КТ жүргізу

1 Жұмыс басталғанға дейін ерітеміз, барлық реагенттер жиынтығын вертексте араластырамыз және пробиркалардың қақпақшаларындағы тамшыларды тұндырамыз.

2 Зерттелетін, бақылау үлгілері мен калибраторлардың санын есепке ала отырып, амплификация үшін пробиркалардың қажетті санын іріктеп аламыз.

3 DTT лиофилизирленген пробиркаға реакциялық қоспаны дайындау үшін, КТ-2-FEP/FRT қоспасы бар, пробирканың барлық ішіндегісін қосамыз. Вертексте қоспаны мұқият араластырыңыз және пробирка қақпағынан тамшыны аз уақыт центрифугалау арқылы тұндырамыз.

4 Дайын реакциялық қоспаны 25 мкл пробиркаларға енгіземіз.

5 Сүзгіші бар ұштықты пайдалана отырып, реакциялық қоспасы бар пробиркаларға зерттелетін немесе бақылау үлгілерінен экстракция нәтижесінде алынған РНҚ сынамаларын 25 мкл-ден енгіземіз. Пробирканың ішіндегісін пипеттерлеп, мұқият араластырыңыз, ауа көпіршігінің пайда болуына жол бермейміз.

6 Бақылау реакцияларын қойыңыз:

а) экстракцияның оң бақылауы (ОБ-1) - ОБУ-1-АҚТҚ үлгісінен бөлінген РНҚ сынамасын 25 мкл пробиркаға енгіземіз;

б) экстракцияның оң бақылауы (ОБ-2) - ОБУ-2-АҚТҚ үлгісінен бөлінген РНҚ сынамасын 25 мкл пробиркаға енгіземіз;

в) экстракцияны (ТБ) теріс бақылау - ТБҮ үлгісінен бөлінген РНҚ сынамасын 25 мкл пробиркаға енгіземіз;

г) ПТР (К+1) оң бақылау - 25 мкл ДНҚ-калибратор КВ1 АҚТҚ бойынша екі пробиркаға енгіземіз;

д) ПТР (К+2) оң бақылау-АҚТҚ КВ2 ДНҚ-калибраторынан 25мкл екі пробиркаға енгіземіз.

7 Пробиркаларды штатив шұңқырларына қойыңыз.

8 Пробиркалардың қақпақтарын тығыз жабамыз және олардың бәрі жақсы жабық екенін көзбен тексереміз.

9 Үлгілер Rotor Gene 6000 термоциклерінде «нақты уақыт» режимінде детекциямен амплификация жүргізуге дайын. Термоциклерді бағдарламалаймыз (3-кесте).

3 Кесте - Роторлық үлгідегілерге арналған «АҚТҚ-Монитор-FRT» амплификациялау бағдарламасы

Кезең	Температур а °С	Кезеңнің жалғасы	Флуоресценцияны өлшеу	Циклдің саны
Hold/темп.ұстап қалу	50	30 мин	-	1
Hold/темп.ұстап қалу	95	15 мин	-	1
Cycling/циклирлеу	95	20 с	-	5
	52	30 с	-	
	72	30 с	-	
Cycling/циклирлеу 2	95	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	40
	55	30 с		
	72	30 с		

2.9 Cobas Taqman 48 тест-жүйесіндегі ПТР-амплификациясы

Дайындалған үлгілерді амплификациялық қоспаға кері транскрипция және ПТР-амплификация өтетін амплификация (К-пробиркалар) үшін пробиркаларға енгіземіз.

Реакциялық қоспа қызады, соның нәтижесінде АҚТҚ-1 РНҚ және АҚТҚ-1 сандық стандартының РНҚ дәйектілігіне, кері праймердің арнайы енуі жүреді. Mn^{2+} иондарының қатысуымен полимераза ZO_5 және дезоксинуклеотидтердің (dNTPs) трифосфаттарының артықтығынан - дезоксиаденозин трифосфаттары, дезоксигуанозин, дезоксицитидин, дезоксиуридин, комплементарлық РНҚ-нысана, ДНК (кДНК) тізбегінің түзілуі арқылы қосылған праймерді ұзартады.

1 1-платформаны К-платформаға арналған тірекке орналастырамыз.

2 К-пробиркасымен штатив аламыз.

3 К-пробиркаларды әрбір тестілеуші үлгі үшін, бір пробиркадан к-платформаға жылжытамыз.

4 К-пробиркаға арналған кілт көмегімен барлық К-пробиркадан қақпақты аламыз. К-пробиркаларының қақпақтарына арналған қақпақтарды тұрақты штативке орналастырамыз.

5 Реакциялық қоспаны дайындаңыз: 170мл Mn^{2+} MMS-ге апарып, қолмен 10 рет араластырыңыз.

6 Әрбір К-пробиркаға қолмен дозатордың көмегі арқылы, көлемі 50мкл бөлінген нуклеин қышқылын енгіземіз.

7 Әрбір К-пробиркаға дозатордың көмегімен көлемі 50 мкл реакциялық қоспаны енгіземіз және көпіршіктер түзілместен дозатормен пипетирлаймыз.

8 К-пробиркаларға арналған кілттің көмегімен барлық К-пробиркаларды қақпақпен жабамыз.

9 Үлгілер Cobas Taqman 48 аппаратын жүктеуге дайын.

10 Компьютерде тиісті пайдаланушы аты мен паролін пайдалана отырып, AMPLILINK программасын ашаңыз.

11 К-платформаларға арналған тапсырмаларды қою үшін Orders (тапсырмалар) белгісін басыңыз. Sample (үлгілер) қойындысын таңдап, New (Жаңа) түймесін басыңыз және пернетақта немесе код сканері арқылы әр үлгіге нөмірді енгізіңіз. COBAS^o TaqMan^o HIV-1 Test, v2 сынағын таңдаймыз. 0 For Use With The High Pure System test Definition бөлімінде. Әрбір үлгі үшін қайталаймыз. Save (Сақтау) түймесін басыңыз.

12 Бұл үшін orders терезесінде Quality Control бөлімін аша отырып, сапаны бақылау деректерін енгіземіз. Жаңа түймесін басып, COBAS TaqMan HIV-1 Test, v2 бақылау парағынан ақпаратты енгізіңіз. 0 For Use With The High Pure System, әрбір жиынтыққа қоса. Көрсетілген терезелерде COBAS taqman HIV-1 Test, v2 теру сериясының нөмірін енгіземіз. 0 For Use With The High Pure System, жарамдылық мерзімі, төмен және жоғары дәлдікті оң бақылау шамалары, және әрбір лот үшін тән калибрлеу коэффициенттері. "OK" түймесін басыңыз.

13 Orders терезесінде k-carrier (K-планшет) бөлімін таңдап, қойылымдағы K-планшет нөмірін енгіземіз. K-carrier терезесінде New түймесін басыңыз. "K-carrier ID" көрсеткішінің оң жағындағы ұяшыққа k-планшет нөмірін енгіземіз. Тест терезесінің төменгі жағында COBAS^o TaqMan^o HIV-1 Test, v2 сынағын таңдаймыз. 0 For Use With The High Pure System.

14 Worklist (жұмыс парағы) бөлімінде Type (T) бағандарының бірінші қатарын таңдаңыз. Ашылмалы мәзірге кіру үшін осы өрісті таңдап, қажетті бақылау түрін таңдаңыз. Содан кейін сол қатарда Sample ID өрісін екі рет басыңыз. Бақылау тізімі бар LookUp Control терезесі пайда болады. Бақылау таңдалған соң, Information панелінің оң жағында тиісті калибрлеу және бақылау мәндері пайда болады. Барлық бақылаулар үшін осы әрекеттерді қайталаңыз.

15 Үлгі туралы деректерді жұмыс парағына енгіземіз, ол үшін деректерді енгізу үшін бірінші позицияда (қатарда) екі рет басыңыз. Үлгіге тағайындалған тест үлгісі көрсетілген Lookup Sample терезесі пайда болады.

16 K-планшет үшін таңдалған тапсырманы сақтаңыз, Save түймесін басыңыз.

17 Жүйе бөлімінде Systems таңбашасын таңдаймыз; Термоциклерді ашу үшін Open басыңыз. Термоциклердің қақпағы толығымен ашылғаннан кейін Systems терезесінде "Ready to Load" белгісі пайда болады, анализатордың сыртқы қақпағын көтеріп, оны ашық қалдырамыз. K-планшетке арналған тасымалдағыштың көмегімен k-планшетті жұмыс шебері және енгізілген үлгілер мен бақылаулар бар жабық k-пробиркалары бар, термоциклерге көшіреміз. Біз талдаушының сыртқы қақпағын түсіреміз.

18 Start басыңыз.

19 COBAS TaqMan 48 анализаторында амплификация және детекция автоматты түрде жүреді [15,16].

3 Нәтижелер және талқылаулар

3.1 ИФТ нәтижелерін есептеу және түсіндіру

АҚТҚ АГ немесе антиденелердің АҚТҚ 1 немесе АҚТҚ 2 болуы немесе болмауы, әрбір үлгі үшін өлшенетін, оптикалық тығыздықтың қатынасымен анықталады.

1) Теріс бақылау үлгісінің орташа оптикалық тығыздығын есептеу (ОП R3) формула бойынша орташа (1):

$$(OT R3) \text{ орташа} = \frac{OT (C1) + OT (D1) + OT (E1)}{3} \quad (1)$$

2) Критикалық оптикалық тығыздықтың мәнін есептеу. Критикалық оптикалық тығыздықтың (кесу деңгейінің) мәнін мына формула арқылы есептейді (2):

$$CO = (OT R3) \text{ ор.} + 0,200 \quad (2)$$

3) Талдаудың дұрыстығы

Әрбір теріс бақылау үлгісінің OT мәні (R3) 0.170 кем болуы тиіс: $OT R3 < 0.170$

Егер теріс бақылау үлгілерінің біреуінің OT-ның мәні осы шартты қанағаттандырмаса, бұл мәнді алып тастауға болады. Осыдан кейін қалған екі мән бойынша OT-ның орташа теріс бақылауын қайта есептеу қажет. Теріс бақылаудың бір ғана OT-ның мәнін алып тастауға болады.

Теріс бақылау үлгісінің OT орташа мәні (R3) 0.150-ден кем болуы тиіс: $(R3 OT) \text{ ор.} < 0.150$

Оң бақылау үлгісінің OT мәні (R4) 0.9 жоғары болуы тиіс: $O R4 > 0,90$

АҚТҚ-1 (R5) антигенінің бақылау үлгісінің OT мәні 0.90 жоғары болуы тиіс: $OT R5 > 0,90$

4) Нәтижелерді түсіндіру

Оптикалық тығыздықтың критикалық мәніне қарағанда, оптикалық тығыздық деңгейі аз сынамалар Дженскрин ультра АҚТҚ АГ/АД тестіне сәйкес теріс деп бағаланады.

Оптикалық тығыздықтың (10% $< OT < CO$ дейін) критикалық мәнінен төмен нәтижелер, алайда сақтықпен түсіндірілуі тиіс (егер бұл зертхана ресурстары мүмкіндік берсе, тиісті үлгілердің қайталанатын сынамаларын пайдалана отырып, зерттеуді қайталау ұсынылады).

Оптикалық тығыздықтың критикалық мәнінің үлкен немесе шамасына тең OT көрсеткіші бар сынамалар бастапқы оң нәтиже ретінде бағаланады. Соңғы қорытынды шығарғанша екі шұңқырдағы сынамалар осындай жағдайда қайта зерттелуі тиіс.

Егер қайта зерттеулер жүргізілгеннен кейін тиісті үлгідегі екі қайталанатын сынамадан алынған ОТ шамасы оптикалық тығыздықтың критикалық мәнінен аз болса, бастапқы нәтиже расталмайды, сынама АҚТҚ-теріс деп бағаланады.

Нәтижелердің дұрыс шықпауы:

- планшеттерді жеткілікті емес шаю;
- сарысудағы теріс бақылау үлгілері
- АҚТҚ-1 немесе АҚТҚ-2 антиденелерінің жоғары титрі бар плазмамен;
- субстратты ерітіндінің тотықтандыратын заттармен ластануы
- (ағартқыштар, металл иондар, және т. б.);
- стоп-реагенттің ластануы

Егер қайталама талдау жүргізілгеннен кейін шұңқырдың біреуіндегі ОТ шамасы оптикалық тығыздықтың критикалық мәніне тең немесе асып кетсе, бастапқы нәтиже расталады және үлгінің Дженскрин тестіне сәйкес ультра АҚТҚ АГ/АД қою туралы қорытынды шығарылады (3-сурет) [17].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NCL1	T4										
	POS	POS										
B	NCL2	T5										
	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	NCL3	T6										
	POS	POS	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	PC1	T7										
	POS	POS	0.004	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
E	PC2	T8										
	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001
F	T9	T9										
	POS	POS	0.000	0.000	0.002	0.001	0.001	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000
G	T10	T10										
	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
H	T11	T11										
	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

3 Сурет - Дженскрин ультра АГ/АД хаттамасы

АҚТҚ жұқтырған аналарда, балаларда жүргізілетін АҚТҚ антиденелеріне ИФТ-ны нәрестелерде 15-18 айға дейін, яғни ана антиденелері олардың қанында айқындалмаған сәтке дейін (көп жағдайда бұл шамамен 12 ай болады) АҚТҚ-инфекциясының түпкілікті диагнозын қоюға әрдайым мүмкіндік бермейді (4,5-сурет).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1	T4	T12									
	POS	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	PC2	T5	T13									
	POS	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	NCL1	T6	T14									
	POS	POS	NEG	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000
D	NCL2	T7	T15									
	POS	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000
E	NCL3	T8	T16									
	POS	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	T9	T9	T17									
	POS	POS	POS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
G	T10	T10										
	POS	POS	POS	0.029	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
H	T11	T11										
	POS	POS	POS	0.661	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

4 Сурет - 18 айға дейінгі балалардың ИФТ нәтижесі

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1	T4	T12	T20							
	1.588	POS зәңгілә	пек 0.124 зәңгілә	POS зәңгілә	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	PC2	T5	T13	T21							
	1.401	POS зәңгілә	POS зәңгілә	POS зәңгілә	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	NC1	T6	T14	T22							
	0.096	POS зәңгілә	POS зәңгілә	POS зәңгілә	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
D	NC2	T7	T15	T23							
	0.097	POS зәңгілә	POS зәңгілә	POS зәңгілә	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001
E	NC3	T8	T16	T24							
	0.083	POS зәңгілә	POS зәңгілә	POS зәңгілә	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	T1	T9	T17	T25							
	3.473	POS зәңгілә	POS зәңгілә	POS зәңгілә	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
G	T2	T10	T18	T26							
		POS зәңгілә	POS зәңгілә	POS зәңгілә	0.000	0.002	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000
H	T3	T11	T19	T27							
	3.445	POS 0.850	POS 3.462	POS 0.734	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

5 Сурет - 18 айға дейінгі балалардың ИФТ нәтижесі

3.2 Жаңа алынған қанды пайдалана отырып, АҚТҚ пДНҚ анықтаудың салыстырмалы талдауы

Құрғақ тамшы әдісін апробациялау және ҚҚТ-нан пДНК-сын бөлудің модификацияланған әдістемесін бағалау үшін, біз ЖҚТБ-ның өңірлік орталықтарындағы АҚТҚ жұқтырған аналардан туылған 119 баладан жаңа алынған қан мен ҚҚТ үлгілерін жинадық.

«АмплиСенс ДНҚ АҚТҚ-FL» жиынтығын пайдалана отырып, нақты уақытта ПТР әдісімен АҚТҚ пДНК-ның Алдын ала жаңа алынған қанның барлық үлгілері сыналды. Амплификация жүргізу нәтижесінде 11 оң үлгі анықталды. Осы емделушілерден ҚҚТ-ның үлгілерін АҚТҚ пДНК анықтау үшін ПТР әдісімен зерттелді, бұл ретте «РИБО-преп» жиынтығының негізінде пДНК-ны бөлудің әдістері қолданылды. ПТР нәтижелерін АҚТҚ және ІБҮ-рі бойынша салыстырды. АҚТҚ-1 пДНК учаскесін амплификациялау өнімінің жинақталуы JOE/Yellow арнасы бойынша, ал ІБҮ ДНҚ амплификация өнімінің жинақталуы fam/Green флуорофорының детекциясына арналған арна бойынша детектеледі. ПТР-зерттеудің нәтижесі, егер ДНҚ-ны оң және теріс бақылау және экстракциялау үшін оң және теріс нәтижелер алынған болса, егер бақылау реакциялары нәтижелерінің бағаларына сәйкес келсе, дұрыс болып саналады (4-кесте).

4 Кесте - ПТР-зерттеудің әр түрлі кезеңдерін бақылауға арналған нәтижелер

Бақылау	ПТР зерттеуінің – бақыланатын кезеңі	Бастапқы циклдің мәні, Ct	
		JOE/Yellow арнасы б-ша	FAM/Green арнасы б-ша
ТБ	ДНҚ экстракциясы	Мәні жоқ	Мәні жоқ немесе кө мәні анықталды
ОБ	ДНҚ экстракциясы	Аз мәні анықталды	Аз мәні анықталды
К-	ПТР	Мәні жоқ	Мәні жоқ
К+	ПТР	Аз мәні анықталды	Аз мәні анықталды

Клиникалық үлгілерде зерттелетін нәтижелерді есепке алу:

- Егер осы сынама үшін JOE/Yellow (АҚТҚ-1 ДНҚ) арнасы бойынша нәтижелер кестесінде көрсетілген (шекаралық) мәннен аспайтын Ct шекті циклінің мәні анықталса және fam/Green (ІБҮ) арнасы бойынша нәтижелер кестесінде көрсетілген шекаралық мәннен аспайтын Ct шекті циклінің мәні анықталса, АҚТҚ-1 ДНҚ анықталған.

- Егер осы сынама үшін JOE/Yellow (АҚТҚ-1 ДНҚ) арнасы бойынша нәтижелер кестесінде Ct шекті циклінің мәні анықталмаса (флуоресценцияның қисығы шекті сызықты кесіп өтпесе) немесе көрсетілген шекаралық мәннен асып кетсе, ал fam/Green (ІБҮ) арнасы бойынша нәтижелер кестесінде көрсетілген шекаралық мәннен аспайтын Ct шекті циклінің мәні анықталса, АҚТҚ-1 ДНҚ –сы анықталмайды.

- Егер FAM/Green (ІБҮ) арнасы бойынша нәтижелер кестесінде берілген сынама үшін Ct шекті циклінің мәні анықталмаса немесе көрсетілген шекаралық мәннен асып кетсе, талдау нәтижесі дұрыс емес.

Ct шекаралық мәндері, реагенттер жиынтығына қоса, берілетін қосымша бетте көрсетілген.

Талдау нәтижелері мынадай жағдайларда есепке алынбайды:

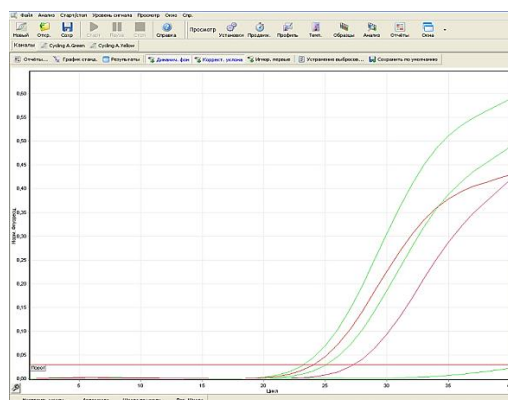
1 Егер ДНҚ экстракциясының оң бақылауы сынамада жоқ болса, кез келген детекция арналары бойынша оң сигнал.

2 Егер ПЦР оң бақылауындағы сынақта кез келген детекция арналары бойынша оң сигнал болмаса.

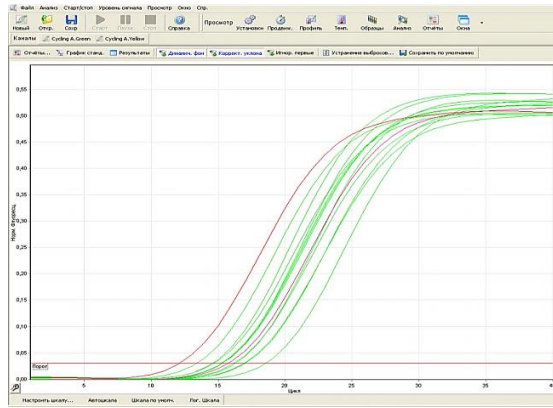
3 Егер осы үлгі үшін FAM/Green (ІБҮ) арнасы бойынша Ct шекті циклінің мәні анықталмаса немесе көрсетілген мәннен асатын Ct мәні алынса.

4 Егер теріс бақылауда оң сигнал анықталса, онда реактивтер мен сынамалардың контаминациясы орын алды. Бұл жағдайда барлық сынамалар бойынша талдау нәтижелері жарамсыз деп саналады.

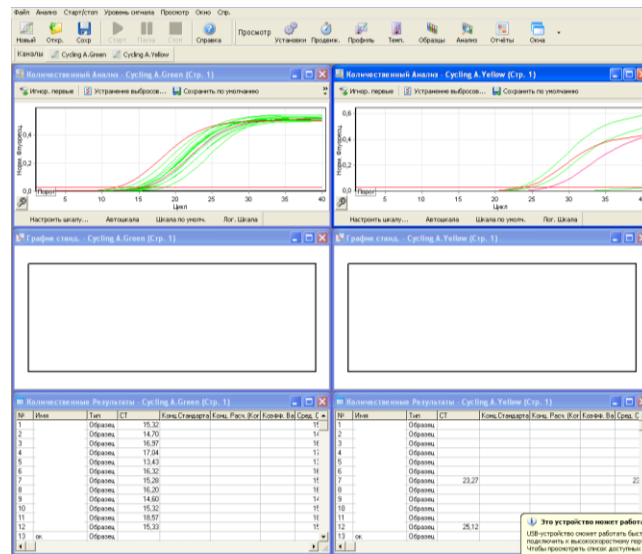
Алынған нәтижелердің мысалдары (6-8 - суреттер).



6 Сурет - АҚТҚ-1 ДНҚ бар, JOE/Yellow арнасы бойынша деректер-үлгілер



7 Сурет - ІБҮ ДНҚ бар, FAM/Green арнасы бойынша деректер- үлгілер

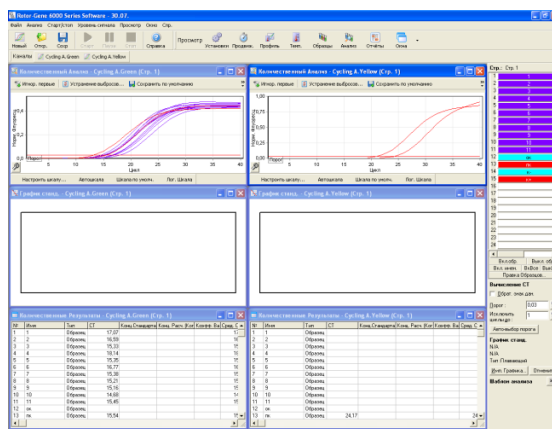


8 Сурет - JOE/Yellow арнасы бойынша және FAM/Green арнасы бойынша деректер

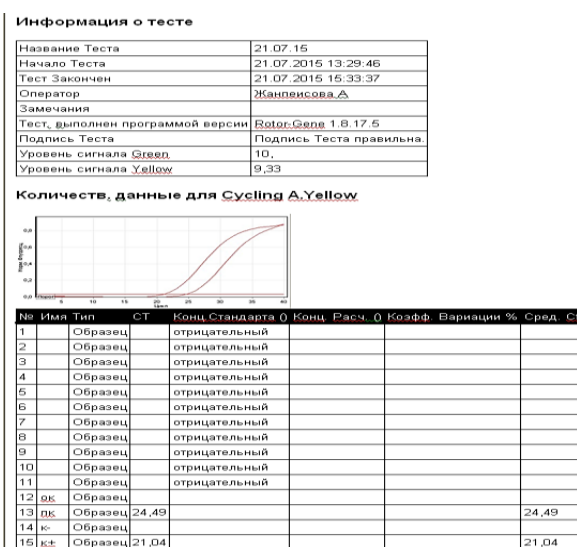
119 жаңа алынған қан үлгісі зерттелді, оның 108 теріс үлгісі (9,10-суреттер) және 11 оң үлгісі (11,12-суреттер) анықталды; 119 ҚҚТ үлгілерін зерттеу кезінде, 107 теріс үлгісі (13,14-суреттер), 11 оң үлгісі (15,16-суреттер), 1 жалған оң үлгісі (5-кесте).

5 Кесте - Алынған нәтижелердің салыстырмалы кестесі

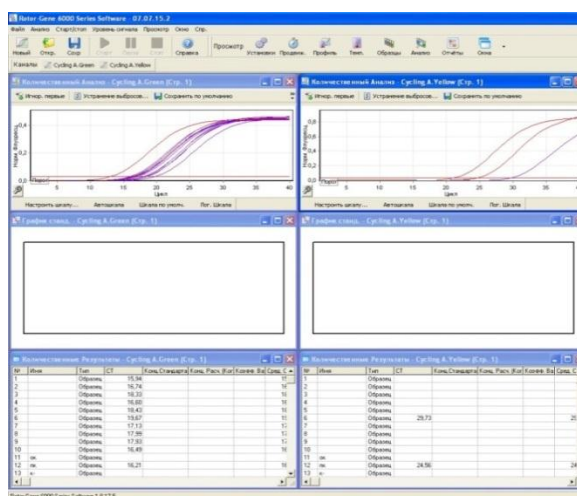
№ үлгі	Жаңа қаннан алынған ПТР талдауының нәтижесі	ҚҚТ алынған ПТР талдауының нәтижесі
1	теріс	теріс
2	теріс	теріс
3	теріс	теріс
4	теріс	теріс
5	оң	оң



9 Сурет - Жаңа алынған қаннан алынған «нақты уақыт» режиміндегі талдау нәтижелері



10 Сурет - Алынған нәтижелердің хаттамасы

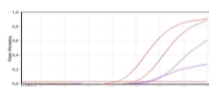


11 Сурет - Жаңа алынған қаннан алынған «нақты уақыт» режиміндегі талдау нәтижелері

Информация о тесте

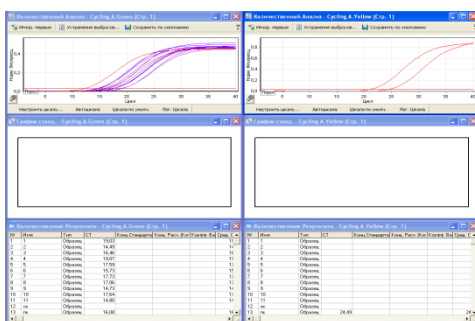
Название Теста	15.07.15
Начало Теста	15.07.2015 16:31:15
Тест Закончен	15.07.2015 18:37:17
Оператор	Жапписова А
Замечания	
Тест, выполнен программой версии	Rotor-Gene 1.9.17.5
Подпись Теста	Подпись Теста правильна
Уровень сигнала	Green
Уровень сигнала	Yellow

Количество, данные для Cycling A.Yellow



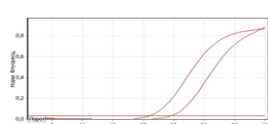
№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	0	Конц. Расч.	0	Коэфф. Вариации	%	Сред.	Ст
1	Образец		отрицательный								
2	Образец		27,93	положительный						27,93	
3	Образец		отрицательный								
4	Образец		отрицательный								
5	Образец		отрицательный								
6	Образец		отрицательный								
7	Образец		отрицательный								
8	Образец		отрицательный								
9	Образец		отрицательный								
10	Образец		отрицательный								
11	Образец		27,10	положительный						27,10	
12	ок	Образец									
13	ок	Образец	24,63							24,63	
14	к-	Образец									
15	к+	Образец	20,95							20,95	

12 Сурет - Алынған нәтижелердің хаттамасы



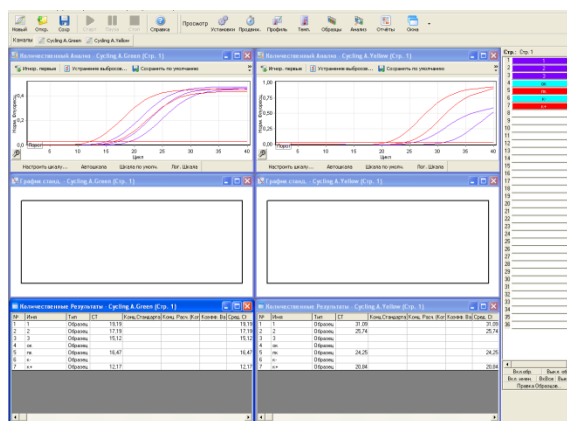
13 Сурет - ҚҚТ-нан алынған «нақты уақыт» режиміндегі талдау нәтижелері

Количество, данные для Cycling A.Yellow



№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	0	Конц. Расч.	0	Коэфф. Вариации	%	Сред.	Ст
1	Образец		отрицательный								
2	Образец		отрицательный								
3	Образец		отрицательный								
4	Образец		отрицательный								
5	Образец		отрицательный								
6	Образец		отрицательный								
7	Образец		отрицательный								
8	Образец		отрицательный								
9	Образец		отрицательный								
10	Образец		отрицательный								
11	Образец		отрицательный								
12	ок	Образец									
13	ок	Образец	24,49							24,49	
14	к-	Образец									
15	к+	Образец	21,04							21,04	

14 Сурет - Алынған нәтижелер хаттамасы



15 Сурет - ҚҚТ-нан алынған «нақты уақыт» режиміндегі талдау нәтижелері



16 Сурет - Алынған нәтижелер хаттамасы

3.3 АмплиСенс АҚТҚ – монитормы FRT и COBAS TaqMan 48 тест-жүйесін пайдалануын салыстырмалы түрде талдау

FAM/Green арнасы бойынша ІБҮ амплификация өнімі детектеледі. JOE/Yellow арнасы бойынша кДНҚ/АҚТҚ ДНҚ амплификациясының өнімі детектеледі. Нәтижелер флуоресценция қисығының шекті сызықпен қиылысуының негізінде түсіндіріледі (логарифмдік шкалада оң бақылау флуоресценциясының өсу сызықтық учаскесінің ортасында белгіленеді), бұл нәтижелердің кестесіндегі тиісті бағанда, Ct шекті циклінің мәнінің болуы (немесе болмауына) сәйкес келеді.

Бақылау үлгілеріндегі және зерттелетін шоғырлануды есептеу.

Ct шекті циклінің мәндерінің негізінде (тиісті деңгейде белгіленген шекті сызықпен флуоресценция қисығының қиылысуы) және KB1 және KB2 калибраторларының берілген мәндеріне сүйене отырып, автоматты түрде калибрлеу қисығын құру және ПТР-сынамада кДНҚ ОБҮ (JOE/Yellow арнасы

бойынша) және ІБҮ (FAM/Green арнасы бойынша) көшірмелерінің мәндерін есептеу жүргізіледі. В коэффициенті (ІБҮ/мл плазма көшірмелерінің саны) реагенттер жиынтығының осы сериясында, қосымша бетте көрсетіледі және басқа сериялардың реагенттерін пайдалана отырып, талдау кезінде алынған нәтижелерді есептеу үшін пайдалануға болмайды [18,19].

ПТР-зерттеу нәтижесі, егер бақылау үлгілері үшін дұрыс нәтижелер алынса, бақылау реакцияларының нәтижелерін бағалау кестесіне (6-кесте) сәйкес дұрыс деп есептеледі.

6 Кесте - ПТР-зерттеудің әр түрлі кезеңдерін бақылауға арналған нәтижелер

Бақылау	ПТР зерттеуінің бақылау кезеңдері	Бастапқы циклдің мәні, Ct	
		FAM/Green арнасы б-ша	JOE/Yellow арнасы б-ша
		Оң (ІБҮ концентрациясы көп)	теріс(Ct мәні жоқ)
ОБ-1	ПТР,РНҚ экстракциясы	Оң (ІБҮ концентрациясы көп)	оң (ІБҮ арқылы есептеу нәтижелері бойынша қосымша беттің ауқымына орналасуы тиіс көшірмелер/мл)
ОБ-2	ПТР,РНҚ экстракциясы	Оң (ІБҮ концентрациясы көп)	оң (ІБҮ арқылы есептеу нәтижелері бойынша қосымша беттің ауқымына орналасуы тиіс көшірмелер/мл)
К+ ₁	ПТР	оң	оң
К+ ₂	ПТР	оң	оң
К-	ПТР	теріс(Ct мәні жоқ)	теріс(Ct мәні жоқ)

Бақылау үлгілері үшін ІБҮ концентрациясының шекті мәндері осы сериядағы «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» реагенттер жиынтығына қоса берілген қосымша бетте көрсетілген.

Егер:

1 JOE/Yellow арнасы бойынша РНҚ экстракциясын теріс бақылау және/немесе FAM/Green және JOE/Yellow арналары бойынша ПТР (К -) теріс бақылау үшін Ct шекті циклінің мәні алынды.

2 ІБҮ шоғырлануы тиісті арна бойынша нәтижелер кестесінде қосымша парақтар көрсетілгеннен кем.

3 0.98-ден кем калибрлеу тік салғанда R2 корреляция коэффициенті: барлық сынамалар үшін ПТР орнын ауыстыру қажет.

4 ОБҮ-1-АҚТҚ және ОБҮ-2-АҚТҚ есептелген шоғырлануы қосымша парақта көрсетілген ауқымға жатқызылмайды.

COBAS taqman HIV-1 Test, v2.0 тестінде, High Pure System жүйесімен қолдану үшін нақты уақыт режимінде ПТР әдісі қолданылады. АҚТҚ-1 РНҚ және РНҚ амплификация нәтижелерін әртүрлі толқын ұзындығында АҚТҚ-1

сандық стандарты тәуелсіз өлшенеді. Бұл процессте циклдердің берілген саны қайталанады, әрбір циклмен әрбір репортер бояғыш эмиссиясының қарқындылығы күшейтіледі, бұл АҚТҚ-1 РНҚ және АҚТҚ-1 сандық стандартының РНҚ тәуелсіз анықтамасын жүргізуге мүмкіндік береді. ПТР циклі, флуоресценттік сигналдың жинақталу қисығының өсуі экспоненциалды болып, ПТР басында енгізілген бастапқы материалдың санымен анықталады.

АҚТҚ-1 титрі үлгісінде жоғары болған сайын, соғұрлым АҚТҚ-1 зондының репортер белгісі флуоресценциясының деңгейінен асып түседі.

5 log10 интервалында вирусты көбейту сериясына арналған нысана санының өсу сызықтары көрсетілген. Вирустың концентрациясы ұлғайған кезде, сызықтардың ерте циклдерге қарай жылжуы орын алады. Сол жақ шеткі қисық вирустың ең үлкен титріне сәйкес келеді, ал шеткі оң жақ қисық - ең кіші титрге сәйкес келеді.

РНҚ қолмен экстракциялау және оны одан әрі амплификациялау кезінде CobasTaqMan 48 тест-жүйесінде үлкен сезімталдықғы анықталды. Зерттелетін плазманың көлемі неғұрлым көп болса, тест-жүйенің сезімталдығы соғұрлым жоғары (7-кесте).

7 Кесте - Зерттелетін үлгілердің тест-жүйелері

№ үлгі	Тест-жүйенің атауы (плазманың қолданылатын көлемі)	
	АмплиСенс АҚТҚ-Монитор FRT (100мкл)	Cobas TaqMan 48 (500 мкл)
1	500 кем көшірме/мл	34 кем көшірме/мл
2	500 кем көшірме/мл	детектерленбейді
3	2093 көшірме /мл	5691 көшірме /мл
4	10 297 көшірме /мл	40 954 көшірме мл
5	10 000 000 көп көшірме мл	10 000 000 көп көшірме /мл

ҚОРЫТЫНДЫ

Клиникалық тәжірибеде вирусты жүктемеде тест-жүйелерді пайдалану тиімділігін салыстырмалы талдау барысында, оларды параллельді пайдаланудың маңызы зор екендігі анықталды. Cobas TaqMan тест-жүйесін пайдалану үшін плазманың қажетті көлемі 500 мкл құрайды, бірақ әрдайым облыстық ЖҚТБ орталықтары плазманың қажетті көлемін ұсына алмайды. Сондықтан да, АмплиСенс АҚТҚ-Монитор FRT тест-жүйесі қолданылады, және де ол АҚТҚ РНҚ-сын өлшеудің жоғары сызықтық диапазонына ие, және өзіндік құны төмен.

Жұмыстың нәтижесі бойынша келесі қорытындылар жасалды:

- Ерте диагностика үшін ПТР әдісін пайдалану қажет деп саналады.
- ҚҚТ әдісімен АҚТҚ пДНҚ анықтаудың тиімділігі тұтас қанмен салыстырғанда 99,9 % құрады.
- АҚТҚ РНҚ-сындағы зерттелетін тест-жүйелері жоғары аналитикалық сезімталдыққа ие.

ҚЫСҚАРТЫЛҒАН ТЕРМИНДЕР ТІЗІМІ

АҚТҚ	-	Адамның қорғаныш тапшылығының қоздырғышы
ЖҚТБ	-	Жұқтырылған қорғаныш тапшылығы белгісі
АРВ	-	Анти ретровирусты препарат
АРВТ	-	Анти ретровирусты терапия
РНҚ	-	Рибонуклеин қышқылы
пДНҚ	-	Провирусты дезоксирибонуклеинды қышқылы
ДНҚ	-	Дезоксирибонуклеинды қышқылы
БҰҰ	-	Біріккен Ұлттар Ұйымы
ПТР	-	Полимерды тізбекті реакция
ҚҚТ	-	Құрғақ қан тамшысы
КТ	-	Кері транскрипция
ИФТ	-	Иммуноферментті талдау
ИБ	-	Иммуноблотниг
АД	-	Антидене
АГ	-	Антиген
ТБ	-	Теріс бақылау
ІБҰ	-	Ішкі бақылау үлгісі
ПК-1	-	Оң бақылау экстракциясы 1
ПК-2	-	Оң бақылау экстракциясы 2
К+	-	Оң бақылау ПТР
К-	-	Теріс бақылау ПТР
FL	-	Флуоресцентті детекция
FRT	-	Флуоресцентті детекция «нақты уақыт» режимінде
мл	-	Миллилитр
мкл	-	Микролитр

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Шарман А. Синдром приобретенного иммунодефицита // Академия профилактической медицины, NeiroNex, Bethesda, USA. -2006 -с. 77- 81;
- 2 Levy J.A. HIV and the pathogenesis of AIDS. - USA: American Society for Microbiology, 2007. - ISBN 978-1-55581-393-2;
- 3 ОтчетодеятельностиСПИДза2016г.с. 9-13;
- 4 Levy J.A. HIV and pathogenesis of AIDS. 3-rd edition. Washington DC: ASM Press, 2007. - 588 p;
- 5 Levy JA. Is HIV superinfection worrisky? Lancet 2003; 361:98–99;
- 6 HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science. 1996 Mar 15;271(5255):1582-6;
- 7 Coakley E., Petropoulos C. J., Whitcomb J. M. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV// Current opinion in infectious diseases. - 2005. - Vol. 18, no. 1. - P. 9 - 15;
- 8 Myszka D. G., Sweet R. W., Hensley P., Brigham-Burke M., Kwong P. D., Hendrickson W. A., Wyatt R., Sodroski J., Doyle M. L. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. (англ.) // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2000. - Vol. 97, no. 16. - P. 9026 - 9031;
- 9 Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: cell binding and entry. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Aug 1;2(8) ;
- 10 Karn J., Stoltzfus C. M. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. (англ.) // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. - 2012. - Vol. 2, no. 2. - P. 36;
- 11 Perelson A. S., Neumann A. U., Markowitz M., Leonard J. M., Ho D. D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. // Science (New York, N.Y.). -1996. - Vol. 271, no. 5255. - P. 1582 - 1586;
- 12 Meng G., Wei X., Wu X., Sellers M. T., Decker J. M., Moldoveanu Z., Orenstein J. M., Graham M. F., Kappes J. C., Mestecky J., Shaw G. M., Smith P. D. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. // Nature medicine. — 2002. — Vol. 8, no. 2. — P. 150—156;
- 13 Burton G. F., Keele B. F., Estes J. D., Thacker T. C., Gartner S. Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis. // Seminars in immunology. - 2002. — Vol. 14, no. 4. — P. 275—284;
- 14 Blauvelt A., Asada H., Saville M. W., Klaus-Kovtun V., Altman D. J., Yarchoan R., Katz S. I. Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. // The Journal of clinical investigation. - 1997. - Vol. 100, no. 8. - P. 2043 - 2053;
- 15 Coffin J., Haase A., Levy J. A., Montagnier L., Oroszlan S., Teich N., Temin H., Toyoshima K., Varmus H., Vogt P. What to call the AIDS virus? (англ.) // Nature. - 1986. - Vol. 321, no. 6065. - P. 10;
- 16 ВозиановаЖ. И. ВИЧ-инфекцияи СПИД // Инфекционные и паразитарные заболевания: В 3 т. -К.: Здоров'я, 2001. -Т. 2. -С. 510. 696 с

17 Davis I. C., Girard M., Fultz P. N. Loss of CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 1-infected chimpanzees is associated with increased lymphocyte apoptosis. // Journal of virology. - 1998. - Vol. 72, no. 6. - P. 4623 - 4632;

18 Kahn J. O., Walker B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. // The New England journal of medicine. - 1998. - Vol. 339, no. 1. - P. 33 - 39;

19 Quinn T. C., Wawer M. J., Sewankambo N., Serwadda D., Li C., Wabwire-Mangen F., Meehan M. O., Lutalo T., Gray R. H. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. // The New England journal of medicine. - 2000. - Vol. 342, no. 13. - P. 921 - 929

РЕЦЕНЗИЯ

Дипломдық жұмыс

Муқажан Динара Мұсақызы

5B070100 – «Биотехнология»

Тақырыбы: Қазақстанда ерте кезеңде АҚТҚ жұқпасының диагностикасы үшін биотехнологиялық әдістерді қолдану

Орындалды:

- а) графикалық бөлім 16 парақ
б) түсініктеме 40 бет

ЖҰМЫСҚА ЕСКЕРТУ

Бітіруші жұмыстың тақырыбы, мазмұны, құрамы, көлемі оқу жоспары мен бағдарламасына сәйкес, арнайы нормативтер – ҚМЖЕ, БМБ, оқулықтар, анықтамалықтарға сай дұрыс шешімдер қабылданып орындалған. Бітіруші жұмыстың бөлімдері - әдеби шолу, зерттеу бөлімдерімен еңбек қорғау бөлімдерінен тұрады.

Дипломдық жұмыста АҚТҚ індетін жұқтырған аналардан туылған балалардан АҚТҚ жұқпасын ерте диагностикалау үшін молекулярлық әдістің пайдаланылуына бағалау жүргізілді.

Жалпы бітіруші жұмыста ешбір айтарлықтай қателер жоқ. Қолданылған әдебиеттерге сілтеме көрсетілген. Түсінік жазбасында компьютерлік қателер кездеспейді.

ЖҰМЫСТЫҢ БАҒАСЫ

Бітіруші жұмыс жалпы өте жақсы орындалған, жоғарыдағы көрсетілген кемшіліктер Муқажан Динара маман болып шығуына ешқандай кедергісін тигізбейді. Муқажан Динара бітіруші жұмысын жақсы қорғаған жағдайда «өте жақсы» деген бағаға ұсынамын.

РЕЦЕНЗЕНТ
Ассоц. профессор

Сакиева Зауре Жандарбековна

20 19 ж.

Краткий отчет



Университет:	Satbayev University
Название:	Қазақстанда ерте кезеңде АҚТҚ жұқпасының диагностикасы үшін биотехнологиялық әдістерді қолдану
Автор:	Муқажан Динара Мұсақызы
Координатор:	Гульнара Курбанова
Дата отчета:	2019-04-30 08:09:16
Коэффициент подобия № 1: ?	15,6%
Коэффициент подобия № 2: ?	8,9%
Длина фразы для коэффициента подобия № 2: ?	25
Количество слов:	12 192
Число знаков:	89 790
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок: ?	6

! К вашему сведению, некоторые слова в этом документе содержат буквы из других алфавитов. Возможно - это попытка скрыть позаимствованный текст. Документ был проверен путем замещения этих букв латинским эквивалентом. Пожалуйста, уделите особое внимание этим частям отчета. Они выделены соответственно.

Количество выделенных слов 9