ОГЛАВЛЕНИЕ

1	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МАРКИРОВКИ КОМПОНЕНТОВ НАБОРА	3
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	4
	2.1 Принцип действия	4
	2.2 Состав набора	4
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
4	КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	5
5	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6	ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ	6
7	ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	6
	7.1 Выделение ДНК из проб клинического материала	6
	7.2 Проведение ПЦР	7
	7.3 Учет и интерпретация результатов	7
8	ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ	8
9	УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ	9
10	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	9

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МАРКИРОВКИ КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
	Биологический риск
	Изделие медицинское для диагностики in vitro
	Ограничение температуры Использовать до……
	Дата изготовления
	Код партии
	Максимальное число тестов
	Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Не допускать попадания солнечного света

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип действия

Набор реагентов «ПНЕВМО-ген» позволяет проводить выявление ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* из образцов клинического материала с последующей её амплификацией. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: денатурация ДНК, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей ДНК.

В смесь для амплификации введены зонды, меченные разными флуоресцентными метками, что позволяет раздельно регистрировать результаты амплификации ДНК возбудителя и внутреннего контрольного образца.

В качестве отрицательного контрольного образца этапа амплификации (К-) используется ТЕ-буфер. Появление флуоресцентного сигнала в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов.

В качестве положительного контроля этапа амплификации используется образец, содержащий генно-инженерную конструкцию, включающую участок гена - мишени возбудителя. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать об ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР.

2.2 Состав набора реагентов «ПНЕВМО-ген»

Набор «ПНЕВМО-ген» выпускается в двух формах комплектации, рассчитанных на 50 и 100 ПЦР реакций, включая контроли. Состав набора приведен в таблице 1.

Внимание: для выделения ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* из клинических образцов рекомендовано использовать набор для выделения ДНК/РНК «НуклеСорб» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, РБ; (ТУ BY 100558032.305-2015) или аналог.

Таблица 1 – Состав комплекта реагентов «ПНЕВМО-ген»

№	Название реактива	Описание	Объем, мл	Количество пробирок	
				Комплект 1 (50 реакций ПЦР)	Комплект 2 (100 реакций ПЦР)
1	ПЦР-смесь Mycoplasma/ Chlamydophila pneumoniae	Прозрачная бесцветная жидкость	0,25	2	4
2	ПЦР-смесь Master mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,25	1	2
3	ПКО Mycoplasma/ Chlamydophila pneumoniae	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1	2
4	Полимераза Tag	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1	2
5	ТЕ- буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1	2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

Набор реагентов позволяет обнаружить генетический материал *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae*. Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении других респираторных возбудителей.

3.1 Аналитическая чувствительность не менее $1x10^3$ ГЭ/мл.

3.2 Диагностическая специфичность не менее 98%.

3.3 Диагностическая чувствительность не менее 98%.

3.4 Воспроизводимость 100%.

4 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с системой менеджмента качества, каждая партия каждого комплекта проверяется на основании заранее определенных спецификаций для обеспечения постоянного качества продукции.

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПин «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06 января 2017г. №2, СанПин «Гигиенические требования к организации технологических процессов и производственному оборудованию», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13 июля 2010г. №93.

Уборку и дезинфекцию разлитых образцов или реактивов следует проводить в соответствии в соответствии с СанПин 2.1.7.14.-20-2005 «Правила обращения с медицинскими отходами» утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25 октября 2005г. №147.

ВНИМАНИЕ! Для снижения риска контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов при утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР, запрещается открывание пробирок и разбрызгивание содержимого.

Дополнительное оборудование и материалы, требуемые для проведения выделения ДНК:

- ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А;
- микроцентрифуга вортекс;
- набор электронных или механических дозаторов переменного объема от 10 мкл и до 1000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 и 0,2 мл с маркировкой «RNase-free, DNase-free»;
- штативы для микропробирок объемом 1,5 мл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером от 10 мкл и до 1000 мкл;
- холодильник от плюс 2 до плюс 8°С с морозильной камерой не выше минус 16°С;
- УФ - лампа;
- амплификаторы Rotor-Gene 3000 или 6000 «Corbett Research», Австралия; Bio-Rad, США; Rotor-Gene Q, Малайзия.
- спирт этиловый 96%;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость с дезинфицирующим средством.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6 ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Назофарингеальные мазки

Для забора назофарингиальных мазков рекомендуется использовать одноразовые зонды из полистирола с синтетическим тампоном.

Оптимальным сроком забора клинического материала, предназначенного для выявления возбудителей респираторных инфекций, являются первые 3 дня после появления симптомов заболевания. Забор производят следующим образом: после удаления слизи из носовых ходов поочередно в обе полости носа пациента на глубину 2 см по наружной стенке носа вводят сухой зонд. Затем направляют слегка вниз и вводят его в нижний носовой ход, прижимают наружную стенку носа, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной носовой стенки. Тампоны погружают в пробирку с 2-3 мл транспортной среды. В эту же пробирку можно поместить и тампон, которым брали мазок с задней стенки глотки. Взятый материал используют для выделения генетического материала возбудителя. При необходимости проведения повторного исследования остаток образца замораживают.

При заболеваниях нижних дыхательных путей (бронхит, пневмония) исследованию подлежит **мокрота, аспират из трахеи, бронхоальвеолярный лаваж** (далее – БАЛ).

Мокроту при глубоком откашливании собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры после предварительно полоскания полости рта водой.

Аспираты из трахеи или БАЛ собирают традиционным способом и помещают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры.

Материал, полученный post mortem от пациентов с респираторной инфекцией.

Материал полученный post mortem от пациентов с респираторной инфекцией забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка. Фрагменты органов или ткани объемом 1–2 $см^3$ помещают в стерильную пробирку с 2-3 мл транспортной среды. Пробирку плотно закрывают.

Исследуют материал следующих органов: фрагменты пораженной части легких/бронхов/трахеи, головного мозга (мягких мозговых оболочек, коры больших полушарий, зоны обонятельных луковиц), фрагменты других органов и тканей при наличии признаков инфекционного процесса. Материал для исследования должен быть нативным (фиксация формалином не допускается).

Условия хранения и транспортировка материала для исследования.

Материал для исследования можно хранить при комнатной температуре – в течение 6 ч; при температуре плюс 2 - 8°С – в течение 3 суток; при температуре минус 20°С – в течение 1 месяца; при температуре минус 70 °С – длительное время. Транспортировку материала для исследования необходимо осуществлять соблюдая холодовой режим.

Состав среды для забора материала.

Раствор Хенкса, содержащий 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 4% раствор гентамицина сульфата (250 мг/л), нистатина (0,5 х 10^6 МЕ/л). В качестве транспортной среды допустимо использование физиологического раствора.

7 ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение ПЦР исследования включает следующие этапы:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов;
- проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и интерпретация результатов.

7.1 Выделение ДНК из проб клинического материала

следует проводить согласно инструкции производителя. Для работы использовать только наконечники и пластиковые пробирки с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2 Проведение ПЦР

7.2.1 Разморозить необходимое количество пробирок с *ПЦР-смесью Mycoplasma/Chlamydophila pneumoniae*, а также *ПЦР-смесью Master mix* и *полимеразой Tag*. Тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок и осадить капли кратковременным центрифугированием.

Фермент *полимеразу Tag* следует доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.2 Отобрать и промаркировать необходимое для постановки ПЦР-реакции количество пробирок объемом 0,2 мкл с учетом контролей реакции. При работе на приборах роторного типа (Rotor-Gene) должны использоваться прозрачные пробирки объемом 0,2 мл, так как детекция проводится через дно пробирки.

При работе на приборах типа Bio-Rad следует использовать пробирки объемом 0,2 мл с прозрачной крышкой, так как детекция проводится через крышку пробирки.

7.2.3 В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь для проведения *N*-го количества реакций:

смешать ***10 × (N+1) мкл*** *ПЦР-смеси Mycoplasma/Chlamydophila pneumoniae*;

5 × (N+1) мкл *ПЦР-смеси Master mix*;

0,5 × (N+1) мкл *полимеразы Tag*;

где ***(N+1)*** – количество анализируемых образцов с учетом «К+» и «К-» с запасом на 1 образец.

7.2.4 Внести по *15 мкл* приготовленной реакционной смеси и *10 мкл* анализируемого образца в 0,2 мл пробирки в соответствии с маркировкой. В пробирки для проведения контрольных реакций внести контроли амплификации:

«*К-*» – *10 мкл* ТЕ-буфера,

«*К+*» – *10 мкл* ПКО *Mycoplasma/Chlamydophila pneumoniae.*

7.2.5 Установить подготовленные для ПЦР пробирки в блок амплификатора.

7.2.6 В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2 – Температурно –временной режим амплификации

№ п/п	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	3 мин	-	1
2	95	10 с	-	10
	52	20 с		
	72	15 с		
3	95	10 с	-	35
	52	20 с	FAM, ROX, Cy5	
	72	15 с	-	

7.3 Учет и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

7.3.1 Результаты амплификации анализируют на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции для каждого образца с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что свидетельствует о наличии/ отсутствии ДНК искомого возбудителя.

Детекция генетического материала *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae,* а также внутреннего эндогенного контроля (далее – ВКО) происходит по следующим каналам: **FAM/Green** – для *Mycoplasma pneumoniae,* **Rox/Orange** – для *Chlamydophila pneumoniae,* **Cy5/Red** – для ВКО.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Результат ПЦР считается достоверным, если в ходе исследования для контрольных образцов амплификации получены результаты в соответствии с параметрами оценки, представленными в таблица 3.

Таблица 3 – Значение пороговых циклов (Ct) детекции контролей амплификации

Контроль	Значение порогового цикла (Ct)		
	FAM/Green	**Rox/Orange**	**Cy5/Red**
«К - »	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
«К+» ***Mycoplasma pneumoniae***	**≤ 28**	Отсутствует	ВКО **≤ 28**
«К+» ***Chlamydophila pneumoniae***	Отсутствует	**≤ 28**	ВКО **≤ 28**

7.3.2 Результаты

При анализе результатов на приборе Bio-Rad для всех каналов уровень пороговой линии необходимо установить на 10-20% от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации.

При анализе результатов на приборе Rotor Gene установить уровень пороговой линии (*Threshhold/Порог*) на уровне 0,1. Параметр *Устранение выбросов/Outlier Removal* устанавливается на уровне 10-15%.

Результат положительный:

ДНК ***Mycoplasma pneumoniae*** обнаружена, если для данного образца определено значение порогового цикла Ct по каналам FAM/Green, Cy5/Red. При отсутствии значений по каналу Cy5/Red и получении значений по каналу FAM/Green результат считать положительным.

ДНК ***Chlamydophila pneumoniae*** обнаружена, если для данной пробы определено значение порогового цикла Ct по каналам ROX/Orange. Cy5/Red. При отсутствии значений по каналу Cy5/Red и получении значений по каналу Rox/Orange результат считать положительным.

Результат отрицательный:

ДНК респираторных возбудителей не обнаружена, если для данной пробы не определено значение порогового цикла Ct по каналам FAM/Green, ROX/ Orange, кривая флуоресценции данной пробы не пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

Результат сомнительный:

Значение порогового цикла Ct по каналам FAM/Green, ROX/ Orange превышает значение, указанное в таблице 3. Требуется повторно провести исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторении результата рекомендован повторный забор материала для исследования.

8 ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

8.1 Транспортировка набора должна производиться в закрытых транспортных средствах или контейнерах по ГОСТ 20435 всеми видами транспорта по группе 5 ОЖ4 ГОСТ 15150 при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора. Транспортировка набора должна осуществляться при температуре не выше 20°С.

8.2 Срок годности набора – 12 месяцев со дня приемки ОБК изготовителя.

8.3 Набор реагентов следует хранить при температуре минус 20°С в течение всего срока годности. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.4 Набор реагентов перед первым применением разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения и далее хранить ПЦР-смесь *Mycoplasma/ Chlamydophila pneumoniae* полимеразу Taq при температуре минус 20°С; допускается хранение отдельных компонентов набора (положительные контрольные образцы и ТЕ –буфер) при температуре от плюс 2 до плюс 8°С.

9 УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

Набор должен использоваться согласно Инструкции по применению, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

10.1 Изготовитель гарантирует соответствие набора заявленным параметрам при соблюдении потребителем условий транспортировки и хранения, установленных ТУ BY 100558032.427 – 2022. При нарушении условий транспортировки специфическая активность компонентов набора может снизиться. Рекламации на качество направлять изготовителю по адресу: 220114, Минск, ул. Филимонова, 23, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, тел. 322 62 95.

10.2 Изготовитель сохраняет за собой право изменять или модифицировать продукт в целях улучшения его применения и дизайна.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru