Настоящая инструкция распространяется на тест-систему для выявления ДНК возбудителей легионеллёза в пробах воды, смывах технологического оборудования, систем водоподготовки и пр. биопробах методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени, далее по тексту «тест-система».

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Белар-Лег-ПЦР/РВ» предназначена для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления ДНК возбудителей легионеллёза в пробах воды, смывах технологического оборудования, систем водоподготовки и пр. биопробах.

Область применения – санитарно-бактериологический контроль безопасности воды, объектов окружающей среды, клиническая лабораторная диагностика. Тест-система рассчитана на проведение 50 исследований, включая контроли.

1. СОСТАВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

1	ПЦР-смесь	1х 0,5 мл
2	ПЦР-смесь №1 All-Lg	1х 0,5 мл
3	ПЦР-смесь №2 Lgp	1 х 0,5 мл
4	ПЦР-смесь №3 Lgp1	1 х 0,5 мл
5	ДНК полимераза (5ед/мкл)	1 х 30 мкл
6	Положительный контрольный образец ($К^+$ ПЦР)	1 х 0,6 мл
7	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	1 х 0,5 мл
8	Внутренний контрольный образец (ВКО)	1 х 0,6 мл
9	Деионизованная вода (д$Н_2О$)	1 х 1,0 мл
10	Инструкция по применению	1 шт.

Внимание!!!: Тест-система не укомплектована наборами реагентов для выделения ДНК.

Для проведения исследований с помощью тест-системы дополнительно используют следующие реактивы, не входящие в его состав:

- Набор для выделения ДНК – любого производителя, предназначенный для работы с тем видом биологического материала, в отношении которого проводят детекцию ДНК легионелл

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность тест-системы в отношении ДНК легионелл – не менее 99 %;

Аналитическая чувствительность выявления ДНК бактерий семейства *Legionellaceae* - 10^3 ГЭ/мл;

Аналитическая чувствительность выявления ДНК бактерий вида *Legionella Pneumophila* - 10^3 ГЭ/мл;

Аналитическая чувствительность выявления ДНК бактерий вида *Legionella Pneumophila* серогруппы 1- 10^3 ГЭ/мл;

4 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с системой менеджмента предприятия-изготовителя каждая серия тест-системы должна быть проверена и принята отделом биологического контроля (ОБК) изготовителя на соответствие всем показателям ТУ BY 100558032.417-

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования (ПЦР) клинического материала на наличие возбудителей

Государственное учреждение «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ» Для нормативных документов

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

инфекционных болезней, в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 6.01.2017 № 2

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) обеззараживается 3-5%-ным раствором перекиси водорода в специальных контейнерах, после чего разрешается слив в общую канализационную сеть.

Постановку ПЦР осуществляют в 3 рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – приготовление ПЦР-смесей. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, выделение ДНК из проб биологического материала, постановка реакции обратной транскрипции, внесение проб в микропробирки с ПЦР-реагентами. Зона 3 – проведение амплификации. Пробы из Зоны 3 запрещается переносить в Зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей.

При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую. Поверхности столов, а также помещения, где проводится постановка ПЦР, до начала и после окончания работ обеззараживаются и деконтаминируются УФО-облучением.

Применять тест-систему по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать тест-систему по истечению срока годности.

6 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

1 Набор для выделения ДНК («ДНКсорб» АмплиСенс, или аналогичный любого производителя) с предварительной концентрацией проб воды в пропорции 1 : 100; при выделении ДНК из проб клинического материала от пациентов – рекомендуется набор для выделения ДНК на магнитных частицах («Магносорб» Амплисенс, или аналогичный).

2 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например, CFX96, США; RotorGene Q, ФРГ; ДТ-96, РФ.

3 Настольный бокс с бактерицидной лампой (например, «Biosan» или любого другого производителя) либо стерильный ламинарный шкаф (например, LamSystems Safety Box или любой другой марки).

4 Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25 – 100^{0}С (например, «Biosan» или любого другого производителя).

5 Центрифуга-вортекс (любого производителя).

6 Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об./мин. (любой марки).

7 Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой (любого производителя).

8 Набор автоматических дозаторов переменного объема («Gilson», «Ленпипет» или аналогичные).

9 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл., до 200 мкл. и до 1000 мкл.

10 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл. и до 1000 мкл.

11 Пробирки свободные от РНКаз и ДНКаз типа «Эппендорф» на 1,5 мл и на 0,2 мл.

12 Штативы для наконечников, микропробирок (любые).

Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Для нормативных документов

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

13 Холодильник на 2 – 8 °С, морозильник на (-20°С).

14 Емкость для сброса наконечников.

7 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

7.1 Выделение ДНК и проведение амплификации.

Реактивы для выделения ДНК НЕ ВХОДЯТ в состав настоящей тест-системы и должны приобретаться дополнительно.

Выделение ДНК осуществляют с использованием соответствующих коммерческих наборов, согласно прилагаемой инструкции.

Перед началом выделения ДНК:

- Маркируют необходимое количество пробирок из расчета N+2, где N – количество исследуемых образцов.
- Вносят в каждую пробирку по 90 мкл исследуемого образца и 10 мкл ВКО.
- В пробирку ОКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ВКО.
- В пробирку ПКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл К+ ПЦР.

После чего приступают к выделению ДНК в соответствии с инструкцией производителя к используемому набору для выделения нуклеиновых кислот.

7.2 Проведение ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

- Разморозить реактивы, входящие в состав тест-системы.
- Отобрать и промаркировать 3 пробирки объемом 1,5 мл для приготовления 3 ПЦР-смесей: ПЦР-смесь-1/All-Lg, ПЦР-смесь-2/ Lgp, ПЦР-смесь-3/ Lgp1, а также нужное количество (из расчета N+4, где N – количество исследуемых образцов) пробирок объемом 0,2 мл с прозрачной плоской крышкой;
- В промаркированные пробирки для приготовления ПЦР-смесей внести

Таблица 1 – Схема приготовления ПЦР-смеси

Компонент тест-системы	All-Lg	Lgp	ВКО/ Lgp1
ПЦР-смесь	7мкл х(N+5)	7мкл х(N+5)	7мкл х(N+5)
ПЦР-смесь №1 All-Lg/ВКО	8мкл х(N+5)	-	-
ПЦР-смесь №2 Lgp	-	8мкл х(N+5)	-
ПЦР-смесь №3 Lgp1	-	-	8мкл х(N+5)
ДНК-полимераза	0,5мкл х(N+5)	0,5мкл х(N+5)	0,5мкл х(N+5)

Где N – количество исследуемых проб

- После добавления каждого компонента тест-системы осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 сек.);
- Полученную реакционную смесь внести по 15 мкл в промаркированные пробирки.
- Внести в каждую пробирку по 10 мкл выделенной ДНК исследуемых образцов.
- Внести по 10 мкл контрольных образцов ОКО и ПКО. Для получения корректного результата реакции ОКО и ПКО должны проходить через все те же этапы, что и исследуемые образцы, начиная с выделения ДНК.
- Внести 10 мкл контрольных образцов К$^-$ПЦР и К$^+$ ПЦР. Данные контрольные образцы используются для контроля только этапа ПЦР.
- Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы – 10 мкл.
- Запрограммировать термоциклер с оптическим модулем следующим образом (таблица 2)

Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Для нормативных документ. в

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

Таблица 2 – Режим амплификации

№	Сегмент цикла	температура	время	Количество циклов
1	**Hold** (Преденатурация – удержание фиксированной температуры)	95^{0}C	5 минут	1
2	**Cycling** (Циклирование – денатурация, отжиг, элонгация)	95^{0}C	10 сек	45
		58^{0}C детекция флюоресцентного сигнала	25 сек	
		70^{0}C	25 сек	

Детекция флюоресцентного сигнала осуществляется:

Для семейства легионелл - по каналу для флуорофора FAM (Green)

Для пневмофильной группы легионелл - по каналу для флуорофора ROX (Orange)

Для ВКО – по каналу By5 (Red)

Анализ и интерпретация результатов.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM (Green) (семейство легионелл), ROX (Orange) (легионеллы пневмофильной группы) и By5 (Red) (серогруппа 1 пневмофильных легионелл).

Для проведения анализа на приборе (RotorGene Q, или аналогичный) должны быть установлены следующие настройки:

«Dynamic tube»/ «Динамический фон» - включить

«Slope correct»/ «Коррекция уклона» - включить

«Outlier Removal» / «Устранение выбросов» - значение NTC threshold/Порог фона – 10%

«CT Calculation» / «Вычисление CT» - значение Threshold/ Порог = 0.05

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие/отсутствие для данной пробы ДНК возбудителя. При этом в таблице результатов отражается наличие/отсутствие значения порогового цикла (Ct) реакции.

Интерпретируют результаты следующим образом (таблица 3)

Таблица 3 – Интерпретация результатов

	FAM (Green)	ROX (Orange)	By5 (Red) - ВКО	Интерпретация
ВКО/All-Lg	Ct ≤38 (40)	Ct ≤38 (40)	Ct ≤38 (40)	В пробе присутствует ДНК легионелл
	Ct ≥38 (40) либо отсутствует	Ct ≥38 (40) либо отсутствует	Ct ≤38 (40)	В пробе отсутствует ДНК легионелл
	любой	любой	Ct ≥38 (40) либо отсутствует	Результат исследования данной пробы не валиден
Lgp	Ct ≤38 (40)	Ct ≤38 (40)	Ct ≤38 (40)	В пробе присутствует ДНК пневмофильных легионелл

Государственное учреждение «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документ в

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

	Ct ≤38 (40)	Ct ≥38 (40) либо отсутствует	Ct ≤38 (40)-	В пробе отсутствует ДНК пневмофильных легионелл
	любой	любой)	Ct ≥38 (40) либо отсутствует	Результат исследования данной пробы не валиден
Lgp1	Ct ≤38 (40)	Ct ≤38 (40)	Ct ≤38 (40)	В пробе присутствует ДНК пневмофильных легионелл серогруппы 1
	Ct ≤38 (40)	Ct ≥38 (40) либо отсутствует)	Ct ≥38 (40)	В пробе отсутствует ДНК пневмофильных легионелл серогруппы 1
	любой	любой	Ct ≥38 (40) либо отсутствует	Результат исследования данной пробы не валиден

В круглых скобках приведено значение порогового цикла для приборов планшетного типа, без скобок – для приборов роторного типа.

8 ФОРМА ВЫПУСКА

«Тест-система для выявления ДНК возбудителей легионеллёза методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «БЕЛАР-Лег– ПЦР/РВ» выпускается в виде упакованной тест-системы. Тест-система рассчитана на проведение 50 исследований, включая контроли.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Тест-систему хранят при $(-20\pm2)^0$С. Транспортирование тест-системы может производиться при температуре $(2,0 \pm 2,0)^0$С в течение суток.
Срок годности тест-системы – 6 месяцев с даты изготовления.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие тест-системы требованиям ТУ BY 100558032.417- при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

Государственное учреждение «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ» Для нормативных документов

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