**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**
**Лабораторный совет Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

# Выявление и количественное определение легионелл в водных образцах внешней среды методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием тест-систем производства ЗАО «Синтол»

**Методические рекомендации**
**МР 02.039—09**

**Москва • 2009**

gost.e-ecolog.ru

# Выявление и количественное определение легионелл в водных образцах внешней среды методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием тест-систем производства ЗАО «Синтол»

***Методические рекомендации***
**МР 02.039—09**

**Выявление** и количественное определение легионелл в водных образцах внешней среды методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием тест-систем производства ЗАО «Синтол»: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—31 с.

1. Разработаны: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (А. И. Верещагин, М. В. Зароченцев, И. В. Новокшонова, Э. Ф. Опочинский, Т. В. Воронцова); «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» РАМН (И. С. Тартаковский, Т. И. Карпова, О. В. Садретдинова); ЗАО «Синтол» (Ю. С. Аляпкина, Д. А. Варламов, Я. И. Алексеев, А. В. Кузубов); ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве (О. А. Груздева, В. Г. Фокина).

2. Рекомендованы к утверждению Лабораторным советом Роспотребнадзора (протокол от 23.06.2009 № 1).

3. Утверждены и введены в действие Председателем Лабораторного совета, Главным врачом ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора А. И. Верещагиным.

4. Введены впервые.

**© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009**

# Содержание

1. Общие положения и область применения ..... 4
2. Нормативные ссылки ..... 4
3. Общие сведения ..... 5
3.1. Характеристика возбудителя ..... 5
3.2. Мониторинг возбудителя ..... 6
4. Сущность метода ..... 8
4.1. Описание наборов реагентов «АмплиЛег-РВ» и «АмплиЛег+-РВ» ..... 9
4.2. Этапы проведения анализа ..... 10
5. Требования к помещениям и техника безопасности ..... 12
5.1. Общие требования ..... 12
5.2. Требования к персоналу ..... 12
5.3. Правила работы с оборудованием ..... 12
6. Оборудование, материалы и реактивы ..... 13
6.1. Оборудование ..... 13
6.2. Реактивы ..... 14
7. Отбор, хранение и транспортирование проб ..... 16
8. Подготовка проб к исследованию ..... 16
8.1. Мембранная фильтрация ..... 16
9. Порядок проведения исследования ..... 17
9.1. Выделение ДНК из водных образцов окружающей среды объемом 0,002—1 л ..... 17
9.2. Выделение ДНК из водных образцов окружающей среды объемом до 1 мл ..... 19
9.3. Проведение ПЦР-РВ ..... 20
9.4. Учет результатов анализа ..... 28
9.5. Интерпретация результатов анализа ..... 28
10. Утилизация отходов ..... 31

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач ФГУЗ «Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора,
Председатель Лабораторного совета
А. И. Верещагин
01 сентября 2009 г.
МР № 02.039—09

# Выявление и количественное определение легионелл в водных образцах внешней среды методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Синтол»

## Методические рекомендации

## 1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации предназначены для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы специалистами организаций здравоохранения и других заинтересованных организаций.

1.2. Предлагаемый метод

- позволяет обнаружить и количественно определять *Legionella pneumophila* в водных системах потенциально опасных в отношении распространения легионеллезной инфекции и требующих периодического мониторинга;
- одновременно выявлять присутствие *Legionella pneumophila ,Legionella spp. и Pseudomonas aeruginosa* в водных объектах общественного пользования; в системах горячего и холодного водоснабжения, в том числе в ЛПУ с целью профилактики нозокомиальной инфекции, вызываемой данными возбудителями.

## 2. Нормативные ссылки

Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ.

СанПиН 2.1.2.1331—03 «Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды аквапарков».

СанПиН 2.1.2.1188—03 «Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества».

МУК 4.2.1018—01 «Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу питьевой воды».

МУК 4.2.1884—04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-эпидемиологический анализ воды поверхностных вод».

Методические рекомендации МЗ СССР «Эпидемиология, клиника, лечение и профилактика легионеллеза», 1988.

МУК 4.2.2217—07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды».

МУК 3.1.2.2412—08 «Эпидемиологический надзор за легионеллёзной инфекцией».

Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Методические указания МУ 1.3.1888 – 04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III—IV групп патогенности».

Методические указания МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

European Guidelines for Control and Prevention of Travel associated Legionnaires Disease, 2002.

ISO 1998.ISO 11731:1998 Water Quality-detection and enumeration of *Legionella*.

*Legionella* and prevention of Legionellosis. – WHO guidelines. 2007.

## 3. Общие сведения

### *3.1. Характеристика возбудителя*

Возбудители легионеллеза представляют самостоятельный род и семейство микроорганизмов. Род *Legionella* образует генетически родственную таксономическую структуру, а семейство *Legionellaceae* состоит только из одного рода и принадлежит к g-подтипу протеобактерий.

Известны более 50 видов легионелл, для 22 из которых доказана их роль в инфекционной патологии человека. Более 90 % случаев болезни

ассоциированы с видом *L.pneumophila*. Среди других видов легионелл чаще всего заболевание вызывают, как правило, при нарушениях клеточного иммунитета и/или на коморбидном фоне виды *L.micdadei, L.longbeuchae, L.dumoffii и L.bozemanii.*

Легионеллы являются сапрофитами и широко распространены в природе. Обитают в пресноводных водоемах, где они паразитируют в водных амебах и других простейших. Размножение легионелл активно идет в теплой воде в диапазоне температур 20—45 °С, хотя их выделяют и из холодной воды. Условия для выживания легионелл в искусственных сооружениях более благоприятны, чем в естественных, что приводит к накоплению в них возбудителя в высоких концентрациях. Легионеллы активно колонизуют синтетические и резиновые поверхности водопроводного, промышленного, медицинского оборудования с образованием так называемых биопленок, в которых легионеллы значительно более устойчивы к действию дезинфицирующих веществ по сравнению с планктонными формами. При колонизации легионеллами искусственных водных систем, к которым относятся системы горячего и холодного водоснабжения, централизованные системы кондиционирования воздуха с водным охлаждением, градирни, вихревые бассейны и джакузи массового пользования в аквапарках и спортивно-восстановительных центрах, увлажнители воздуха, фонтаны и т. д. концентрация легионелл значительно возрастает, что представляет эпидемическую опасность.

### *3.2. Мониторинг возбудителя*

3.2.1. Возбудитель легионеллеза является широко распространенным водным микроорганизмом, присутствующим в большинстве пресных водоемов в некультивируемом состоянии. Низкие концентрации легионелл в природных водоемах не превышают $10^3$ КОЕ на литр и не представляют опасности для человека.

3.2.2. В системах водоснабжения, кондиционирования и увлажнения воздуха, других системах связанных с циркуляцией теплой воды в диапазоне от 20 до 50 °С концентрация возбудителя резко возрастает за счет образования биопленок на поверхности оборудования, что является ключевым фактором накопления потенциально опасных концентраций легионелл. Периодический количественный мониторинг потенциально опасных водных объектов и систем является необходимым условием эффективной профилактики легионеллеза.

3.2.3. К водным системам потенциально опасным в отношении распространения легионеллезной инфекции и требующим периодического мониторинга возбудителя относятся:

• Системы охлаждения воды промышленных предприятий (градирни и испарительные конденсаторы).

Наличие в данных системах больших количеств циркулирующей теплой воды в сочетании с образованием водного аэрозоля, способного распространяться в радиусе до нескольких километров позволяет отнести данные объекты к числу потенциально опасных в отношении возникновения легионеллезной инфекции. Микробиологический мониторинг данных систем необходимо осуществлять ежеквартально в соответствии с МУК 4.2.22.17—07 «Определение бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды». При выявлении возбудителя в концентрации, превышающей допустимые значения необходимо проведение дополнительных профилактических мероприятий;

• централизованные системы кондиционирования и увлажнения воздуха, используемые для создания микроклимата в общественных зданиях, торговых центрах, ресторанах, клубах, учреждениях, гостиницах, на пассажирских судах.

Избыточное тепло, образующееся при охлаждении воздуха, отводится через конденсатор, охлаждаемый водой, поступающей из градирни или другого водоисточника. В теплой воде охладительного контура создаются благоприятные условия для формирования биопленок легионелл. Микробиологический мониторинг данных систем на наличие легионелл необходимо осуществлять не реже 2 раз в год (кондиционирующие установки небольшой мощности без увлажения воздуха и сплит-системы не опасны и контролю на легионеллы не подлежат). Точкой отбора проб является контур централизованного кондиционера;

• Бассейны, аквапарки, джакузи общественного пользования (в том числе в ЛПУ).

Особенно опасны в отношении легионеллезной инфекции джакузи общественного пользования в гостиницах, спортивных и оздоровительных центрах, саунах. После каждого посетителя смена воды в них не производится, над поверхностью воды постоянно разбрызгивается водный аэрозоль с температурой более 30 °С, но менее 50 °С, что создает благоприятные возможности для колонизации объекта легионеллами. Микробиологический мониторинг данных

систем на наличие легионелл необходимо проводить ежеквартально. На исследование отбирается вода после фильтра; В данных системах высока вероятность образования микробных ассоциаций *Legionella pneumophila, Legionella spp.* и *Pseudomonas aeruginosa.*

• Системы горячего и холодного водоснабжения.

Данные системы могут быть контаминированы легионеллами в диапазоне температур от 25° до 55 °С. При наличии застойных зон, участков трубы с низкой скоростью потока воды, в накопительных баках или резервуарах воды при данной температуре вероятно образование биопленок, содержащих высокую концентрацию легионелл. При температуре горячей воды выше 65 °С легионеллы полностью теряют жизнеспособность. При снижении температуры в системе горячего водоснабжения до температуры менее 55 °С условия для размножения легионелл наиболее благоприятны. Микробиологический мониторинг данных систем на наличие легионелл необходимо осуществлять не реже 2 раз в год. Отбор проб воды рекомендуется проводить в аккумуляторном баке котельной, выходе воды в распределительную сеть – в системе горячего водоснабжения, на входе в учреждение и в резервуаре-хранилище – в системе холодного водоснабжения. В системах водоснабжения ЛПУ при снижении температуры горячей воды до указанных значений высока вероятность формирования микробных ассоциаций *Legionella pneumophila, Legionella spp.* и *Pseudomonas aeruginosa*, представляющих опасность для пациентов групп риска в качестве возбудителей нозокомиальной пневмонии.

## 4. Сущность метода

Метод выявления *Legionella pneumophila, Legionella spp.* и *Pseudomonas aeruginosa* в водных образцах внешней среды с помощью наборов реагентов производства ЗАО «Синтол» основан на использовании полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Метод ПЦР в реальном времени основан на детектировании сигнала флуоресценции, позволяющем наблюдать процесс накопления продукта в процессе реакции. Сигнал флуоресценции нарастает пропорционально увеличению количества продукта амплификации в исследуемом образце. Момент заметного увеличения сигнала и отрыв его от базовой линии, так называемый пороговый цикл, зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в

образце, тем раньше наблюдается начало роста флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

***4.1. Описание наборов реагентов «АмплиЛег-РВ» и «АмплиЛег+-РВ»***

Набор реагентов «АмплиЛег-РВ» предназначен для одновременного выявления в образцах ДНК *Legionella spp.* и *Legionella pneumophila* и количественного определения ДНК *Legionella pneumophila*. В данном наборе одновременно в одной пробирке проходит три независимых реакции. Одна реакция позволяет обнаружить специфический фрагмент ДНК гена 16S рРНК *Legionella spp.*, присутствующий у всех видов легионелл. Наличие положительной динамики изменения флуоресценции по отношению к отрицательному контролю для этой реакции говорит о наличии в образце ДНК легионелл. Другая реакция позволяет обнаружить и количественно определить специфический фрагмент ДНК гена *mip Legionella pneumophila*. Наличие положительной динамики изменения флуоресценции по отношению к отрицательному контролю для этой реакции говорит о наличии в образце ДНК *Legionella pneumophila*. Сопоставление с динамикой изменения флуоресценции калибровочных образцов путем анализа полученных кинетических кривых позволяет оценить исходное количество микроорганизма в пробе. Третья реакция - реакция внутреннего положительного контроля (ВПК) – позволяет исключить недостоверные результаты и контролировать наличие ингибиторов. Положительная динамика изменения флуоресценции по этой реакции в случае отсутствия положительной динамики по первой и второй реакции подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК легионелл в образце. Отсутствие положительной динамики изменения флуоресценции по всем трем реакциям свидетельствует об ингибировании ПЦР, что позволяет исключить недостоверный отрицательный результат. Протекание каждой из трех реакций детектируется с помощью специфического зонда, меченного заданным флуоресцентным красителем. Для обнаружения *Legionella spp.* используется зонд, меченный красителем ROX, для обнаружения и определения количества *Legionella pneumophila* – красителем R6G, а для ВПК – красителем Cy5.

Набор реагентов «АмплиЛег+-РВ» предназначен для одновременного выявления в образцах ДНК *Legionella spp.*, *Legionella pneumophila* и *Pseudomonas aeruginosa* и количественного определения ДНК *Legionella pneumophila*. В данном наборе одновременно в одной

пробирке проходит четыре независимых реакции. Три реакции идентичны используемым в тест-системе «АмплиЛег-РВ»: первая – для обнаружения специфического фрагмента ДНК гена 16S рРНК *Legionella spp.*, вторая – для обнаружения и количественного определения специфического фрагмента ДНК гена *mip Legionella pneumophila*, третья реакция - реакция ВПК. Четвертая реакция позволяет обнаружить ДНК специфического фрагмента гена *gyrB Pseudomonas aeruginosa.* Протекание каждой из четырех реакций детектируется с помощью специфического зонда, меченного заданным флуоресцентным красителем. Для обнаружения *Pseudomonas aeruginosa* используется зонд, меченный красителем FAM, для обнаружения *Legionella spp.* - красителем ROX, для обнаружения и определения количества *Legionella pneumophila* – красителем R6G, а для ВПК – красителем Cy5.

### *4.2. Этапы проведения анализа*

Выявление и количественное определение *Legionella pneumophila* и выявление *Legionella spp.* и *Pseudomonas aeruginosa* в водных образцах внешней среды методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Синтол» состоит из следующих этапов:

- выделение ДНК исследуемого образца;
- проведение ПЦР в реальном времени;
- анализ полученных данных с помощью программного обеспечения прибора;
- обработка результатов с помощью программы Excel и документирование.

Схема проведения анализа представлена на рис. 1.

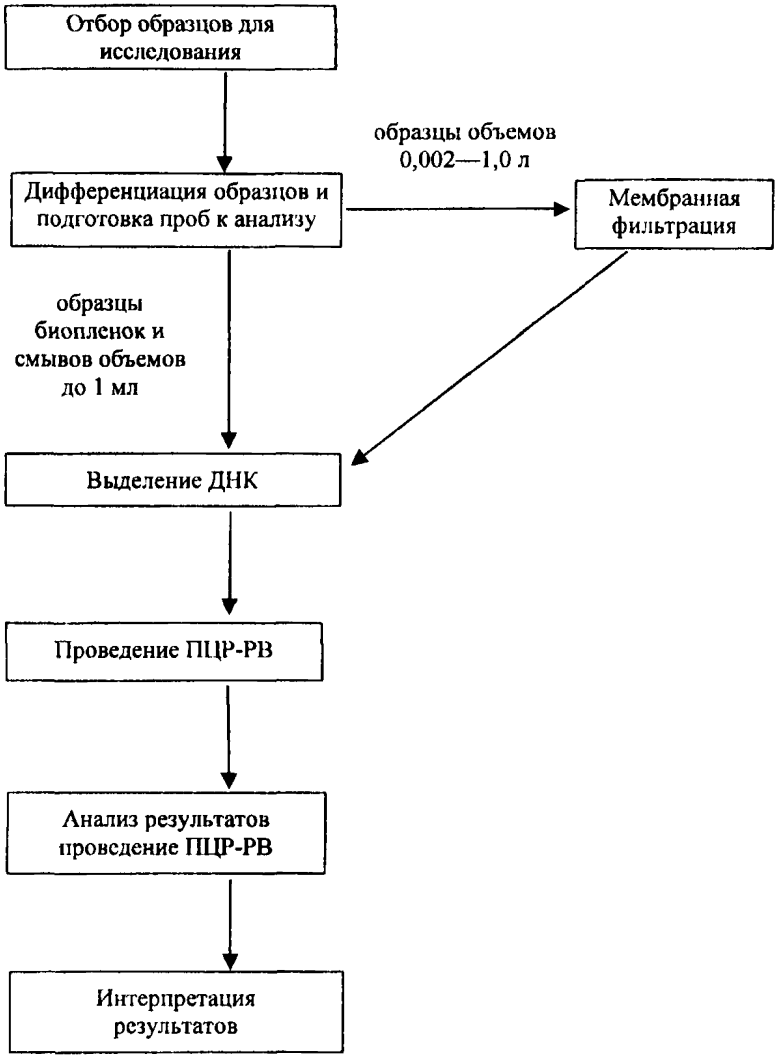



**Рис. 1**. Схема проведения анализа с помощью наборов реагентов производства ЗАО «Синтол»

## 5. Требования к помещениям и техника безопасности

### *5.1. Общие требования*

5.1.1. Потенциальный риск применения наборов – класс 2б. Исследования объектов окружающей среды на наличие *Legionella pneumophila,Legionella spp.* и *Pseudomonas aeruginosa* методом ПЦР-РВ проводят в учреждениях, имеющих разрешение на работу с возбудителями III—IV группы патогенности в соответствии с СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5.1.2. Общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны соответствовать документам, регламентирующим организацию работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III—IV групп патогенности.

### *5.2. Требования к персоналу*

5.2.1. Персонал, проводящий выявление и количественное определение *Legionella pneumophila* и выявление *Legionella spp.* и *Pseudomonas aeruginosa* в водных образцах внешней среды методом ПЦР-РВ, должен пройти соответствующее обучение. Для выполнения анализа с помощью наборов «АмплиЛег-РВ» и «АмплиЛег+-РВ» необходимо участие специалиста с высшим медицинским, биологическим или химическим образованием, а также лаборанта со средним специальным медицинским, биологическим или химическим образованием. Персонал должен иметь навыки работы с возбудителями опасных инфекций, биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

### *5.3. Правила работы с оборудованием*

5.4.1. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты и пр., а также рабочие растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.

5.4.2. Работу с набором реагентов и анализируемыми образцами следует проводить в одноразовых медицинских перчатках без талька.

5.4.3. Для автоматических пипеток при каждой операции необходимо использовать одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

5.4.4. Одноразовую пластиковую посуду, наконечники и пробирки с продуктами ПЦР необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 5 % раствор хлорамина Б или 0,2 % раствор ДП-2Т).

5.4.5. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР-РВ, до начала и после завершения работ необходимо обрабатывать дезинфицирующим средством и бактерицидными облучателями.

## 6. Оборудование, материалы и реактивы

### *6.1. Оборудование*

6.1.1. **ЗОНА 1.** Этап выделения ДНК из исследуемого материала:

6.1.1.1. ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР «Ламинар-С» фирмы «Ламинарные системы», Россия).

6.1.1.2. Твердотельный термостат для пробирок на 1,5—2,0 мл на 25—100 °С (например, «Циклотемп-303», фирмы «Циклотемп», Россия).

6.1.1.3. Микроцентрифуга для пробирок со скоростью вращения 10000—16000 об/мин. (например, «Minispin», фирмы «Эппендорф», Германия)

6.1.1.4. Микроцентрифуга-встряхиватель со скоростью вращения не менее 3500 об/мин и со сменными ротарами для пробирок на 1,5 и на 0,2 мл (например, «Циклотемп-901», фирмы «Циклотемп», Россия).

6.1.1.5. Отдельный набор автоматических микродозаторов переменного объема 2—20, 20—200, 100—1000 мкл (например, фирмы «BIOHIT», Финляндия).

6.1.1.6. Одноразовые наконечники для микродозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, фирмы «Axygen», США).

6.1.1.7. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл типа «Эппендорф» (например, фирмы «Sarstedt», Германия)

6.1.1.8. Штативы для микропробирок на 0,2 мл (например, фирмы «Циклотемп», Россия).

6.1.1.9. Магнитный штатив для пробирок на 1,5—2,0 мл (например, фирмы «Циклотемп», Россия).

6.1.1.10. Холодильник с отделениями на 2—8 °С и на минус 18—20 °С. ГОСТ 26678.

6.1.2. **ЗОНА 2.** Этап амплификации ДНК (метод ПЦР-РВ) и анализ результатов:

6.1.2.1. Прибор для ПЦР в реальном времени (например, «АНК-32», ИАнП РАН, Россия).

6.1.2.2. ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР «Ламинар-С» фирмы «Ламинарные системы», Россия).

6.1.2.3. Микроцентрифуга-встряхиватель со скоростью вращения не менее 3500 об/мин и со сменными ротарами для пробирок на 1,5 и на 0,2 мл (например, «Циклотемп-901», фирмы «Циклотемп», Россия).

6.1.2.4. Автоматический микродозатор переменного объема 0,5—10 мкл (например, фирмы «BIOHIT», Финляндия).

6.1.2.5. Штативы для микропробирок на 0,2 мл (например, фирмы «Циклотемп», Россия).

6.1.2.6. Магнитный штатив для пробирок на 1,5—2,0 мл (например, фирмы «Циклотемп», Россия).

6.1.2.7. Одноразовые наконечники для микродозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл (например, фирмы «Axygen», США).

6.1.2.8. Холодильник с отделениями на 2—8 °С и на минус 18—20 °С. ГОСТ 26678.

### *6.2. Реактивы*

6.2.1. Набор реагентов «АмплиЛег-РВ» состоит из комплекта реагентов для выделения ДНК из водных образцов окружающей среды (комплекты № 1а и 1б) и комплекта реагентов для проведения количественного ПЦР-РВ анализа (комплект № 2).

6.2.1.1. Комплект № 1а для выделения ДНК из водных образцов окружающей среды объемом 0,002 – 1 л имеет следующий состав:

- внутренний положительный контроль **ВПК-В** – 2 пробирки по 0,5 мл;
- лизирующий раствор 1, **G1** – 1 флакон 30 мл;
- сорбирующий раствор, **СР-ФС** – 50 пробирок по 0,06 мл;
- лизирующий раствор 2, **G2** – 1 флакон 30 мл;
- промывочный раствор А, **ПР-А** – 1 флакон 30 мл;
- промывочный раствор В, **ПР-В** – 1 флакон 30 мл;
- промывочный раствор С, **ПР-С** – 1 флакон 30 мл;
- элюирующий раствор, **ЭР** – 4 пробирки по 1,25 мл.

6.2.1.2. Комплект № 1б для выделения ДНК из водных образцов окружающей среды объемом до 1 мл имеет следующий состав:

• внутренний положительный контроль **ВПК-В** – 2 пробирки по 0,5 мл;

• лизирующий компонент , **G** – 50 пробирок по 0,6 г;

• сорбирующий раствор, **СР-Mag** – 2 пробирки по 1,0 мл;

• лизирующий раствор 2, **G2** – 1 флакон 30 мл;

• промывочный раствор А, **ПР-А** – 1 флакон 30 мл;

• промывочный раствор В, **ПР-В** – 1 флакон 30 мл;

• промывочный раствор С, **ПР-С** – 1 флакон 30 мл;

• элюирующий раствор, **ЭР** – 4 пробирки по 1,25 мл.

6.2.1.3. Комплект № 2 реагентов для проведения ПЦР-РВ имеет следующий состав:

• реакционная смесь, **РС ОМ АмплиЛег-РВ** – 100 пробирок, содержащих 0,020 мл готовой ПЦР-смеси;

• контрольные калибровочные образцы **КО3-Лег**, **КО5-Лег** и **КО7-Лег**, содержащие $10^3$, $10^5$ и $10^7$ копий/5 мкл фрагмента ДНК *L.pneumophila* – 3 пробирки по 0,1 мл;

• положительный контрольный образец, **ПКО-Лег**, содержащий специфические фрагменты ДНК *Legionella spp.и L.pneumophila* – 1 пробирка, 0,1 мл;

• отрицательный контрольный образец, **ОКО** – 1 пробирка, 0,1 мл.

6.2.2. Набор реагентов «АмплиЛег+-РВ» состоит из комплекта реагентов для выделения ДНК из водных объектов окружающей среды (комплекты № 1а и 1б) и комплекта реагентов для проведения количественного ПЦР-РВ анализа (комплект № 2).

6.2.2.1. Комплект № 1а для выделения ДНК из водных образцов окружающей среды объемом 0,002 – 1 л (см. п. 6.2.1.1.).

6.2.2.2. Комплект № 1б для выделения ДНК из водных образцов окружающей среды объемом до 1 мл (см. п. 6.2.1.2.).

6.2.2.3. Комплект № 2 реагентов для проведения ПЦР-РВ имеет следующий состав:

• реакционная смесь, **РС ОМ АмплиЛег+-РВ** – 100 пробирок, содержащих 0,020 мл готовой ПЦР-смеси;

• контрольные калибровочные образцы **КО3-Лег**, **КО5-Лег** и **КО7-Лег**, содержащие $10^3$, $10^5$ и $10^7$ копий/5 мкл фрагмента ДНК *L.pneumophila* – 3 пробирки по 0,1 мл;

• положительный контрольный образец, **ПКО-Лег+**, содержащий специфические фрагменты ДНК *Pseudomonas aeruginosa, Legionella spp.*и *L.pneumophila* – 1 пробирка, 0,1 мл;

• отрицательный контрольный образец, **ОКО** – 1 пробирка, 0,1 мл.

## 7. Отбор, хранение и транспортирование проб

Отбор, хранение и транспортирование проб осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб» и ГОСТ Р 51593-2000 «Вода питьевая. Отбор проб»; МУК 4.2.1018-01 «Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу питьевой воды»; МУК 4.2.1884—04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ поверхностных вод»; МУК 4.2.2217—07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды».

## 8. Подготовка проб к исследованию

Подготовку проб к исследованию осуществляют в соответствии с МУК 4.2.2217—07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды».

В случае сильной загрязненности исходного образца воды механическими или масляными примесями, определяемыми визуально, его предварительно фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом пробу пропускают через мембранный поликарбонатный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм.

### *8.1. Мембранная фильтрация.*

8.1.1. Промыть фильтрационную поверхность, пропустив 100 мл чистой воды, и затем обработать поверхность 70 % спиртом. Перед установкой фильтра убедиться, что поверхность сухая и не горячая. Подобная обработка должна проводиться перед каждой фильтрацией образцов исследуемой воды во избежание контаминации.

8.1.2. Стерильным пинцетом поместить поликарбонатный фильтр в фильтрационный аппарат. Профильтровать образец.

8.1.3. Осторожно сложить фильтр трижды свободными концами, чтобы получить конус (рис. 2).

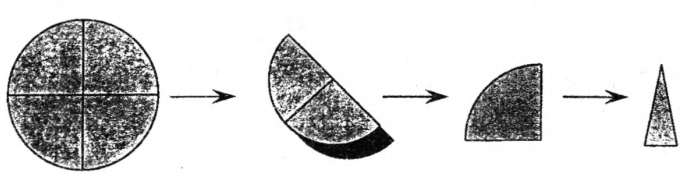


**Рис. 2.**

8.1.4. Используя пинцет, поместить фильтр в пробирку острым концом кверху (рис. 3). Далее проводят выделение ДНК.

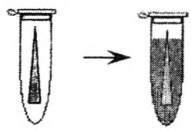


**Рис. 3.**

## 9. Порядок проведения исследования

### *9.1. Выделение ДНК из водных образцов окружающей среды объемом 0,002—1 л*

В каждую партию фильтрации и выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль фильтрации (**ОКО-Ф**) и выделения (**ОКО-В**), которые потом обязательно анализируются в ПЦР-РВ. Это позволит контролировать возможную контаминацию на этапе фильтрации и выделения ДНК.

9.1.1. В пробирки с фильтрами вносят 1,5 мл лизирующего раствора 1, **G1**. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 20 с. Термостатируют при температуре 65°С в течение 10 мин, периодически перемешивая на вортексе. Затем пробирки охлаждают, перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 с при 10000 об/мин.

9.1.2. Отбирают необходимое количество пробирок с сорбирующим раствором, **СР-ФС**, и маркируют их.

9.1.3. Перемешивают содержимое пробирки с **ВПК-В** на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируют 15 с при 4000 об/мин.

9.1.4. Переносят 1 мл лизированной смеси в пробирки с сорбирующим раствором, **СР-ФС**, в соответствии с маркировкой. Вносят в каждую пробирку 40 мкл раствора **ВПК-В.**

9.1.5. Перемешивают содержимое пробирок на вортексе до равномерного распределения сорбента и инкубируют в течение 5 мин. при комнатной температуре.

9.1.6. Центрифугируют пробирки в течение 5 мин. при 10000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.

9.1.7. Вносят в пробирки 500 мкл лизирующего раствора 2, **G2**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента. Центрифугируют пробирки в течение 5 мин. при 10000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.

9.1.8. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора А, **ПР-А**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.

9.1.9. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора В, **ПР-В**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.

9.1.10. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора С, **ПР-С**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. и удаляют надосадочную жидкость.

9.1.11. Инкубируют пробирки с открытыми крышками в течение 5 мин. при температуре 65 °С для удаления остатков промывочного раствора С.

9.1.12. Вносят в пробирки 100 мкл элюирующего раствора, **ЭР**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента.

9.1.13. Термостатируют пробирки в течение 10 мин. при температуре 65 °С, периодически перемешивая на вортексе.

9.1.14. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 10000 об/мин и устанавливают на магнитный штатив на 1 мин.

9.1.15. Переносят из пробирок водную фазу, содержащую ДНК, в предварительно промаркированные 1,5 мл пробирки. Раствор ДНК до проведения анализа в течение суток рекомендуется хранить при температуре 4 °С, при более длительных сроках – при минус 20 °С.

**Примечание:** Если в конечную пробирку с раствором ДНК попали частицы сорбента, перед постановкой ПЦР содержимое пробирок еще раз центрифугировать при 10000 об/мин в течение 1 мин, т.к. следы сорбента могут ингибировать ПЦР.

### *9.2. Выделение ДНК из водных образцов окружающей среды объемом до 1 мл*

9.2.1. Отбирают необходимое количество пробирок с лизирующим компонентом 1 **G1** (включая отрицательный контроль выделения – ОКО-В), маркируют их, центрифугируют.

9.2.2. Вносят в пробирки по 1 мл образца. Пробы тщательно перемешивают на вортексе.

**Примечание:** В качестве отрицательного контроля можно использовать 200 мкл воды или ТЕ буфера.

9.2.3. Инкубируют пробирки 10 мин. При температуре 65 °С, периодически перемешивая на вортексе.. Затем охлаждают и перемешивают на вортексе. Затем пробирки охлаждают, перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 с при 10000 об/мин.

9.2.4. Перемешивают содержимое пробирки с **ВПК-В** на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируют 15 с при 4000 об/мин. Вносят в пробирки по 40 мкл **ВПК-В**, закрывают пробирки и перемешивают на вортексе, центрифугируют.

9.2.5. Пробирку с сорбирующим раствором **СР-ФС** встряхивают на вортексе. Вносят в пробирки с исследуемым материалом по 40 мкл сорбирующего раствора **СР-ФС**.

9.2.6. Перемешивают содержимое пробирок на вортексе до равномерного распределения сорбента и инкубируют в течение 5 мин. При комнатной температуре.

9.2.7. Центрифугируют пробирки в течение 5 мин. При 10000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. И удаляют надосадочную жидкость.

9.2.8. Вносят в пробирки 500 мкл лизирующего раствора 2, **G2**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента. Центрифугируют пробирки в течение 5 мин. При 10000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. И удаляют надосадочную жидкость.

9.2.9. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора А, **ПР-А**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. При 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. И удаляют надосадочную жидкость.

9.2.10. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора В, **ПР-В**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. При 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. И удаляют надосадочную жидкость.

9.2.11. Вносят в пробирки 500 мкл промывочного раствора С, **ПР-С**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. При 7000 об/мин. Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. И удаляют надосадочную жидкость.

9.2.12. Инкубируют пробирки с открытыми крышками в течение 5 мин. При температуре 65 °С для удаления остатков промывочного раствора С.

9.2.13. Вносят в пробирки 100 мкл элюирующего раствора, **ЭР**, перемешивают содержимое пробирки на вортексе до равномерного растворения сорбента.

9.2.14. Термостатируют пробирки в течение 10 мин. При температуре 65 °С, периодически перемешивая на вортексе.

9.2.15. Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. При 10000 об/мин и устанавливают на магнитный штатив на 1 мин.

9.2.16. Переносят из пробирок водную фазу, содержащую ДНК, в предварительно промаркированные 1,5 мл пробирки. Раствор ДНК до проведения анализа в течение суток рекомендуется хранить при температуре 4 °С, при более длительных сроках – при минус 20 °С.

**Примечание:** Если в конечную пробирку с раствором ДНК попали частицы сорбента, перед постановкой ПЦР содержимое пробирок еще раз центрифугировать при 10000 об/мин в течение 1 мин, т.к. следы сорбента могут ингибировать ПЦР.

### *9.3. Проведение ПЦР-РВ*

В каждую постановку обязательно включают положительный (**ПКО-Лег, ПКО-Лег+**), отрицательный (**ОКО**) контрольные образцы и отрицательные контрольные образцы выделения (**ОКО-В**) и фильтрации (**ОКО-Ф**). Для проведения количественного анализа дополнительно используют калибровочные контрольные образцы **КО3-Лег, КО5-Лег, КО7-Лег**.

Все контроли (исключая **ПКО-Лег, ПКО-Лег+** и **ОКО**, которые анализируют в одном повторе) и исследуемые образцы анализируют в двух повторах.

Для проведения количественного анализа при использовании наборов реагентов **«АмплиЛег-РВ»** и **«АмплиЛег+»** возможны 2 варианта работы:

*1. Вариант работы «Калибровка»*

Применяется при первом использовании прибора или наборов реагентов новой серии.

Исследование проводится с включением трех КО (КО7, КО5, КО3) в повторе с количеством фрагментов *mip* $10^7$, $10^5$, $10^3$ копий на 5 мкл. Количество *L.pneumophila* в образцах определяется по полученной калибровочной прямой.

*2. Вариант работы «Тест»*

Применяется, когда уже есть построенная калибровочная прямая для набора реагентов текущей серии.

Исследование проводится с включением только ПКО-Лег с количеством $10^3$—$10^2$ копий на 5 мкл. В этом случае для определения количества *L.pneumophila* используются результаты (уравнение калибровочной прямой) первой постановки, а результат по ПКО-Лег (ПКО-Лег+) служит критерием достоверности количественного определения неизвестных образцов.

9.3.1.Взять необходимое количество пробирок с реакционной смесью комплекта для амплификации (**РС ОМ АмплиЛег-РВ** или **РС ОМ АмплиЛег+-РВ** ) из расчета **2*N+K**, где N – количество исследуемых образцов, а К – количество контрольных образцов в данной постановке. Не допускать размораживания и повторного замораживания неиспользованных пробирок со смесью.

9.3.2. После размораживания реакционной смеси, центрифугировать пробирки 30—60 с (скорость вращения ротора более 4000 об/мин. Или 2500 g). Для этого воспользоваться либо ротором для пробирок 0,2 мл, либо адаптерами к стандартному ротору для пробирок 2,0 мл.

9.3.3. Поместить пробирки с реакционной смесью в штатив. Маркировать пробирки в соответствии с протоколом анализа. Для приборов, производящих измерение через крышку пробирки, маркировку наносить на стенку пробирки; для приборов, производящих измерение через стенку пробирки – на крышку.

9.3.4. Положительный, калибровочные, отрицательные контрольные образцы ПЦР и исследуемые образцы разморозить, перемешать на встряхивателе (вортексе) и центрифугировать.

**Примечание:** Если образец ДНК содержит незначительное количество магнитного сорбента, рекомендуется поставить пробирки на 1 мин. В магнитный штатив.

9.3.5. Внести в пробирки по 5 мкл отрицательных контрольных образцов (ОКО, ОКО-Ф и ОКО-В), исследуемых образцов и, в последнюю очередь, положительных контрольных образцов ДНК легионелл в соответствии с маркировкой, используя наконечники с аэрозольным барьером, перемешать на встряхивателе и центрифугировать.

9.3.6. Поместить пробирки в амплификатор в порядке, приведенном в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

**Порядок следования образцов при варианте работы «Калибровка»**

| № ячейки | Образец |
|---|---|
| 1 | КО 7 |
| 2 | КО 7 |
| 3 | КО 5 |
| 4 | КО 5 |
| 5 | КО 3 |
| 6 | КО 3 |
| 7 | ПКО |
| 8 | ОКО |
| 9 | ОКО-В |
| 10 | ОКО-В |
| 11 | ОКО-Ф |
| 12 | ОКО-Ф |
| 13 | исследуемый образец 1 |
| 14 | исследуемый образец 1 |
| 15 | исследуемый образец 2 |
| 16 | исследуемый образец 2 |
| … | |

Таблица 2

**Порядок следования образцов при варианте работы «Тест»**

| № ячейки | Образец |
|---|---|
| 1 | ПКО |
| 2 | ОКО |
| 3 | ОКО-В |
| 4 | ОКО-В |
| 5 | ОКО-Ф |
| 6 | ОКО-Ф |
| 7 | исследуемый образец 1 |
| 8 | исследуемый образец 1 |
| 7 | исследуемый образец 2 |
| 8 | исследуемый образец 2 |
| … | |

9.3.7. Задать программу амплификации (табл. 3), выбрать соответствующие каналы детекции (табл. 4) и запустить прибор в соответствии с инструкцией.

Таблица 3

**Температурно-временной режим амплификации**

| № ступени | Температурно-временной режим | Число циклов |
|---|---|---|
| 1 | 95 °С – 300 с | 1 |
| 2 | 62 °С – 50 с | 50 |
| 3 | 95 °С – 20 с | |

Таблица 4

**Каналы детекции**

| Реакция | Краситель | Длина волны поглощения/испускания | Подходящие для измерения каналы прибора |
|---|---|---|---|
| «АмплиЛег-РВ» | | | |
| L.pneumophila | R6G | 530 / 560 | R6G, HEX, JOE |
| Legionella spp. | ROX | 580 / 605 | ROX, Tx.Red |
| ВПК | Cy5 | 635 / 670 | Cy5 |
| «АмплиЛег+-РВ» | | | |
| Pseudomonas aeruginosa | FAM | 494 / 518 | FAM, SYBR Green I |
| L.pneumophila | R6G | 530 / 560 | R6G, HEX, JOE |
| Legionella spp. | ROX | 580 / 605 | ROX, Tx.Red |
| ВПК | Cy5 | 635 / 670 | Cy5 |

9.3.8. После окончания реакции отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.

9.3.9. С помощью программного обеспечения прибора для ПЦР-РВ произвести расчет и сохранение значений пороговых циклов $C_t$ кинетических кривых проведенной реакции для трех красителей – R6G (*L.pneumophila*), ROX (*Legionella spp.*), Cy5 (ВПК) (при использовании набора «АмплиЛег-РВ»); для четырех красителей – FAM (*P.aeruginosa*), R6G (*L.pneumophila*), ROX (*Legionella spp.*), Cy5 (ВПК) (при использовании набора «АмплиЛег+-РВ»).

9.3.10. Скопировать рассчитанные значения $C_t$ в шаблон файла для автоматического анализа результатов в программе Excel (рис. 4). Провести качественный и количественный анализ исследуемых образцов. При необходимости распечатать.

Рис. 4. Пример шаблона для автоматического анализа результатов в программе Excel:

а – качественный анализ;

б – количественный анализ;

в – отчет.

а– Качественный анализ

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Тест-система:** | **"АмплиЛег+РВ-количество"** | | | | | | | | | | |
| **Тип анализа:** | **качественный** | | | | | | | | | | |
| **Дата:** | **17 июня 2009 г.** | | | | **Импорт данных** | | | | | | |
| **Оператор:** | **Воронцова Т.В.** | | | | | | | | | | |
| **Файл:** | **17_13_36_59** | | | | | | | | | | |
| **Серия** | **001** | | | | | | | | | | |
| **№** | **Название** | **Legionella spp.** | | **L.pneumophila** | | **P.aeruginosa** | | **ВПК** | | **Вывод** | **Действие** |
| | | **Ct ROX** | **обнаруж.** | **Ct R6G** | **обнаруж.** | **Ct FAM** | **обнаруж.** | **Ct Cy5** | **обнаруж.** | | |
| 7 | ПКО-Ps+Lpr | 22,54 | + | 23,90 | + | 25,60 | + | 28,47 | + | Результаты постановки во ПКО достоверны | Анализ завершен |
| 8 | ОКО | | - | | - | | - | 30,5 | + | Результаты постановки во ОКО достоверны | Анализ завершен |
| 9 | ОКО-В | | - | | - | | - | 28,14 | + | Результаты постановки во ОКО достоверны | Анализ завершен |
| 10 | ОКО-В | | - | | - | | - | 30,61 | + | Результаты постановки во ОКО достоверны | Анализ завершен |
| 11 | ОКО-Ф | | - | | - | | - | 31,35 | + | ДНК P.aeruginosa и легионелл не обнаружена | Анализ завершен |
| 12 | ОКО-Ф | | - | | - | | - | 32,27 | + | ДНК P.aeruginosa и легионелл не обнаружена | Анализ завершен |
| 13 | 1-8Lpn7 | 19,51 | + | 20,81 | + | | - | 29,1 | + | Legionella spp, L.pneumophila | Количественный анализ |
| 14 | 1-8Lpn7 | 19,82 | + | 20,98 | + | | - | 28,88 | + | Legionella spp, L.pneumophila | Количественный анализ |
| 15 | 1-5Lm7 | 20,16 | + | | - | | - | 29,92 | + | Legionella spp. | Анализ завершен |
| 16 | 1-5Lm7 | 20,38 | + | | - | | - | 29,58 | + | Legionella spp. | Анализ завершен |
| 17 | 1-1Ps7 | | - | | - | 22,08 | + | 28,78 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 18 | 1-1Ps7 | | - | | - | 21,46 | + | 27,79 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 19 | 5L1-Lpn | 23,75 | + | 24,70 | + | | - | 30,98 | + | Legionella spp, L.pneumophila | Количественный анализ |
| 20 | 5L1-Lpn | 23,77 | + | 24,71 | + | | - | 31,04 | + | Legionella spp, L.pneumophila | Количественный анализ |
| 21 | 3L1-Lpn | 30,89 | + | 31,60 | + | | - | 32,13 | + | Legionella spp, L.pneumophila | Количественный анализ |
| 22 | 3L1-Lpn | 30,93 | + | 32,00 | + | | - | 32,3 | + | Legionella spp, L.pneumophila | Количественный анализ |
| 23 | 2A-Lpn | 30,59 | + | 32,23 | + | | - | 32,12 | + | Legionella spp, L.pneumophila | Количественный анализ |
| 24 | 2A-Lpn | 31,3 | + | 33,43 | + | | - | 32,13 | + | Legionella spp, L.pneumophila | Количественный анализ |
| 25 | 5B-Ps | | - | | - | 29,63 | + | 30,7 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 26 | 5B-Ps | | - | | - | 29,83 | + | 28,4 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 27 | 3B-Ps | | - | | - | 32,50 | + | 30,43 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 28 | 3B-Ps | | - | | - | 31,25 | + | 30,34 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 29 | 2B-Ps | | - | | - | 32,35 | + | 30,92 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 30 | 2B-Ps | | - | | - | 32,09 | + | 30,92 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 31 | 3B-Ps | | - | | - | 30,03 | + | 30,38 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |
| 32 | 3B-Ps | | - | | - | 30,81 | + | 30,14 | + | Pseudomonas aeruginosa | Анализ завершен |

Б – Количественный анализ

| | |
|---|---|
| **Тест-систем** | **"АмплиЛег+-РВ-количество"** |
| | **Качественное и количественное определение** |
| **Тип анализ:** | |
| | ***ДНК Legionella pneumophila*** |
| **Дата:** | **17 июня 2009 г.** |
| **Оператор:** | **Воронцова Т.В.** **Импорт данных** |
| **Файл:** | **17_13_36_59** |
| **Серия** | **001** |

Параметры калибровочной прямой L.pneumophila

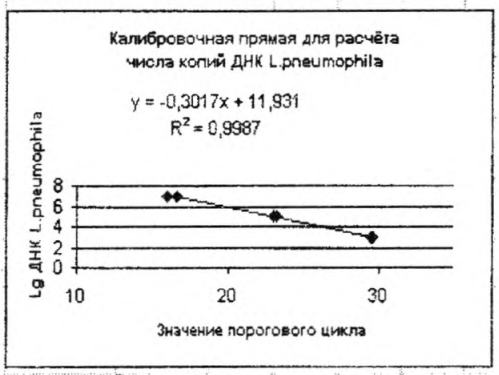
| | |
|---|---|
| A1= | -0,3017 |
| B1= | 11,931 |

Эффективность ПЦР

100,25 %

Параметры прямых для копирования

-0,3017 11,931




| № | Название | Число копий L.pn/тр | Число копий L.pn/обр | V образца до фильтр., л | Число копий L.pn/л | Ct R6G | Ct FAM | Ct ROX | Ct Cy5 | ДНК L.pn | ДНК Leg.spp | ДНК P.aeruginosa | ДНК ВПК |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | **1,00E+07** | 1,27E+07 | | | | 16 | | | 33,56 | + | — | — | + |
| 2 | **1,00E+07** | 8,42E+06 | | | | 16,59 | | | 33,35 | + | — | — | + |
| 3 | **1,00E+05** | 9,67E+04 | | | | 23,02 | | | 32,34 | + | — | — | + |
| 4 | **1,00E+05** | 8,83E+04 | | | | 23,15 | | | 31,2 | + | — | — | + |
| 5 | **1,00E+03** | 1,09E+03 | | | | 29,47 | | | 32,79 | + | — | — | + |
| 6 | **1,00E+03** | 1,00E+03 | | | | 29,6 | | | 33,1 | + | — | — | + |
| 7 | **ПКО** | 5,25E+04 | | | | 23,9 | 25,6 | 22,54 | 28,47 | + | + | + | + |
| 8 | **ОКО** | | | | | | | | 30,5 | — | — | — | + |
| 9 | **ОКО-В** | | | | | | | | 28,14 | — | — | — | + |
| 10 | **ОКО-В** | | | | | | | | 30,61 | — | — | — | + |
| 11 | **ОКО-Ф** | | | | | | | | 31,35 | — | — | — | + |
| 12 | **ОКО-Ф** | | | | | | | | 32,27 | — | — | — | + |
| 13 | **1-8Lpn7** | 4,49E+05 | 8,98E+06 | | | 20,81 | | 19,51 | 29,1 | + | + | — | + |
| 14 | **1-8Lpn7** | 3,99E+05 | 7,98E+06 | | | 20,98 | | 19,82 | 28,88 | + | + | — | + |
| 15 | **1-5Lm7** | | | | | | | 20,16 | 29,92 | — | + | — | + |
| 16 | **1-5Lm7** | | | | | | | 20,38 | 29,58 | — | + | — | + |
| 17 | **1-1Ps7** | | | | | | 22,08 | | 28,78 | — | — | + | + |
| 18 | **1-1Ps7** | | | | | | 21,46 | | 27,79 | — | — | + | + |
| 19 | **5L1-Lpn** | 3,01E+04 | 6,02E+05 | 0,50 | 1,20E+06 | 24,7 | | 23,75 | 30,98 | + | + | — | + |
| 20 | **5L1-Lpn** | 2,99E+04 | 5,98E+05 | 0,50 | 1,20E+06 | 24,71 | | 23,77 | 31,04 | + | + | — | + |
| 21 | **3L1-Lpn** | 2,49E+02 | 4,99E+03 | 0,50 | 9,97E+03 | 31,6 | | 30,89 | 32,13 | Вне | + | — | + |
| 22 | **3L1-Lpn** | 1,89E+02 | 3,78E+03 | 0,50 | 7,55E+03 | 32 | | 30,93 | 32,3 | Вне | + | — | + |

в – Отчет

| | |
|---|---|
| **Тест-систем** | **"АмплиЛег+-РВ-количество"** |
| **Тип анализ** | **Обнаружение и количественное определение *L.pneumophila*, обнаружение *Legionella spp.*,** |
| **Дата:** | **17 июня 2009 г.** |
| **Оператор:** | **Воронцова Т.В.** |
| **Файл:** | **17_13_36_59** |
| **Серия** | **001** |

| № | Название | Число копий L.pn/обр | V образца до | Число копий L.pn/л | Наличие L.pn. в образце | Наличие L.spp. в образце | Наличие ДНК P.aerugin | Рез-тат по ДНК ВПК | Вывод | Действие |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 | ПКО | 5,25E+04 | | | + | + | + | + | Результаты постановки по ПКО достоверны | Анализ завершен |
| 8 | ОКО | | | | Нет | Нет | Нет | + | Результаты постановки по ОКО достоверны | Анализ завершен |
| 9 | ОКО-В | | | | Нет | Нет | Нет | + | Результаты постановки по ОКО-В достоверны | Анализ завершен |
| 10 | ОКО-В | | | | Нет | Нет | Нет | + | Результаты постановки по ОКО-В достоверны | Анализ завершен |
| 11 | ОКО-Ф | | | | Нет | Нет | Нет | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. не обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен |
| 12 | ОКО-Ф | | | | Нет | Нет | Нет | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. не обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен |
| 13 | 1-8Lpn7 | 8,98E+06 | | | Да | Да | Нет | + | Lpn. обнаружена, количество в пределах диапазона измерения, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен |
| 14 | 1-8Lpn7 | 7,98E+06 | | | Да | Да | Нет | + | Lpn. обнаружена, количество в пределах диапазона измерения, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен |
| 15 | 1-5Lm7 | | | | Нет | Да | Нет | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa обнаружена | Анализ завершен |
| 16 | 1-5Lm7 | | | | Нет | Да | Нет | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa обнаружена | Анализ завершен |
| 17 | 1-1Ps7 | | | | Нет | Нет | Да | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. не обнаружены, P.aeruginosa обнаружена | Анализ завершен |
| 18 | 1-1Ps7 | | | | Нет | Нет | Да | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. не обнаружены, P.aeruginosa обнаружена | Анализ завершен |
| 19 | 5L1-Lpn | 6,02E+05 | 0,5 | 1,20E+06 | Да | Да | Нет | + | Lpn. обнаружена, количество в пределах диапазона измерения, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен |
| 20 | 5L1-Lpn | 5,98E+05 | 0,5 | 1,20E+06 | Да | Да | Нет | + | Lpn. обнаружена, количество в пределах диапазона измерения, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен |
| 21 | 3L1-Lpn | 4,99E+03 | 0,5 | 9,97E+03 | Да | Да | Нет | + | Lpn. обнаружена, количество ниже допустимого предела диапазона измерения, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен, для более точного количественного определения необходимо разбавить образец |
| 22 | 3L1-Lpn | 3,78E+03 | 0,5 | 7,55E+03 | Да | Да | Нет | + | Lpn. обнаружена, количество ниже допустимого предела диапазона измерения, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен, для более точного количественного определения необходимо разбавить образец |
| 23 | 2A-Lpn | 3,22E+03 | 0,5 | 6,44E+03 | Да | Да | Нет | + | Lpn. обнаружена, количество ниже допустимого предела диапазона измерения, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен, для более точного количественного определения необходимо разбавить образец |
| 24 | 2A-Lpn | 1,40E+03 | 0,5 | 2,80E+03 | Да | Да | Нет | + | Lpn. обнаружена, количество ниже допустимого предела диапазона измерения, Lspp. обнаружены, P.aeruginosa не обнаружена | Анализ завершен, для более точного количественного определения необходимо разбавить образец |
| 25 | 5B-Ps | | | | Нет | Нет | Да | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. не обнаружены, P.aeruginosa обнаружена | Анализ завершен |
| 26 | 5B-Ps | | | | Нет | Нет | Да | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. не обнаружены, P.aeruginosa обнаружена | Анализ завершен |
| 27 | 3B-Ps | | | | Нет | Нет | Да | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. не обнаружены, P.aeruginosa обнаружена | Анализ завершен |
| 28 | 3B-Ps | | | | Нет | Нет | Да | + | Lpn. не обнаружена, Lspp. не обнаружены, P.aeruginosa обнаружена | Анализ завершен |

### *9.4. Учет результатов анализа*

9.4.1. Результаты анализа не подлежат учету:

• в случае регистрации прибором **ОКО** по каналам FAM, R6G и ROX;

• в случае отсутствия регистрации прибором **ОКО, ОКО-В** и **ОКО-Ф** по каналу Cy5 - ВПК;

• в случае отсутствия регистрации прибором **КО3-Лег, КО5-Лег, КО7-Лег** по каналу R6G и **ПКО-Лег/ ПКО-Лег+** по каналам FAM, R6G и ROX.

9.4.2. Результаты анализа подлежат учету:

• в случае отсутствия регистрации прибором **ОКО** по каналам FAM, R6G и ROX;

• в случае регистрации прибором **ОКО, ОКО-В** и **ОКО-Ф** по каналу **Cy5**;

• в случае регистрации прибором **КО3-Лег, КО5-Лег, КО7-Лег** по каналу R6G и **ПКО-Лег/ ПКО-Лег+** по каналам FAM, R6G и ROX.

Регистрация **КО3-Лег, КО5-Лег, КО7-Лег** и **ПКО-Лег/ ПКО-Лег+** свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов ДНК гена *mip L.pneumophila* , *16S РНК* легионелл и *gyrB P.aeruginosa*.

Регистрация **ОКО, ОКО-В** и **ОКО-Ф** по каналу **Cy5** свидетельствует о выделении ДНК в процессе пробоподготовки и отсутствии ингибиторов ПЦР.

### *9.5. Интерпретация результатов анализа*

Образец считается положительным на присутствие специфического фрагмента *gyrB P.aeruginosa*, если зарегистрирован рост флуоресценции по каналу **FAM** (зонда, специфичного для гена *gyrB*), а значение порогового цикла меньше 50, и отрицательным, если автоматическое определение значения порогового невозможно.

Образец считается положительным на присутствие специфического фрагмента *mip L.pneumophila*, если зарегистрирован рост флуоресценции по каналу **R6G** (зонда, специфичного для гена *mip*), а значение порогового цикла меньше 50, и отрицательным, если автоматическое определение значения порогового невозможно.

Образец считается положительным на присутствие специфического фрагмента гена *16SPHK Legionella spp.*, если зарегистрирован рост флуоресценции по каналу **ROX** (зонда, специфичного для гена *16SPHK*),

а значение порогового цикла меньше 50, и отрицательным, если автоматическое определение значения порогового невозможно.

По каналу **Cy5** - ВПК - контролируют выделение ДНК в процессе пробоподготовки и наличие в образце ингибиторов реакции амплификации. Образец считается положительным на присутствие ВПК, если значение порогового цикла меньше 50 и отрицательным, если автоматическое определение значения порогового невозможно.

Результат анализа **отрицательного контрольного образца (ОКО)** должен быть отрицательным для реакций на *gyrB, mip* и *16SPHK* (каналы FAM, R6G и ROX) и положительным для ВПК (канал Cy5). В случае получения положительных результатов для ОКО по реакциям на *gyrB, mip* или *16SPHK* результаты определения всех положительных образцов считаются недействительными. В этом случае необходимо повторить постановку и, если это необходимо, провести специальные мероприятия по выявлению и устранению источника контаминации (реактивы для ПЦР и комната для подготовки к проведению реакции).

Результат анализа **отрицательного контрольного образца выделения ОКО-В и отрицательного контрольного образца фильтрации ОКО-Ф** должен быть отрицательным для реакций на *gyrB, mip* и *16SPHK* и положительным для ВПК. В случае получения положительных результатов для ОКО-В и ОКО-Ф по реакциям *gyrB, mip* и *16SPHK* результаты определения всех положительных образцов считаются недействительными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации (реактивы и помещение для выделения ДНК) и провести повторное выделение и анализ всех положительных проб.

Для оценки количества выявленной ДНК *Legionella pneumophila* используются **контрольные калибровочные образцы** с известной концентрацией, позволяющей определить число копий фрагмента *mip* ДНК *L.pneumophila*. По окончании реакции в программе прибора для ПЦР-РВ по флуоресценции калибровочных образцов в соответствующем канале строится калибровочная прямая для оценки копий фрагмента *mip*.

**Для калибровочной прямой** должны выполняться **ВСЕ** ниже перечисленные условия:

- коэффициент корреляции $\mathbf{R^2}$ не ниже 0,99;
- коэффициент **A** калибровочной прямой лежит в диапазоне от -0,25 до – 0,35;
- эффективность ПЦР составляет не менее 90 %.

Получение иных значений этих параметров для калибровочной прямой свидетельствует об ухудшении работы реактивов или неправильной подготовке к проведению реакции.

Число копий для неизвестных образцов рассчитывается автоматически по построенной калибровочной прямой.

Результаты анализа исследуемых образцов принимаются только при выполнении ВСЕХ вышеперечисленных условий для контрольных образцов!

Результат анализа на обнаружение ДНК *Legionella pneumophila* считается:

1. **Положительным**, если реакции на *16SPHK* и *mip* оценены как положительные.

2. **Отрицательным**, если реакции на *16SPHK* и *mip* оценены как отрицательные, реакция на ВПК оценена как положительная.

3. **Недостоверным**, если реакции на *16SPHK* и *mip* оценены как отрицательные, реакция на ВПК оценена как отрицательная. Следовательно, образец заингибирован, и необходимо либо его предварительное разведение перед реакцией амплификации, либо перевыделение ДНК.

Для образцов, положительных на наличие *Legionella pneumophila*, проводится автоматическое определение количества *Legionella pneumophila*. Результат исследования на определение количества *Legionella pneumophila* в пробе считается:

1. Точным, если количество лежит в пределах расчета по калибровочной прямой.

2. Приблизительным и лежащим вне диапазона количественного определения, если количество лежит вне пределов расчета по калибровочной прямой.

В шаблоне для автоматического анализа результатов после введения исходного объема образца до фильтрации автоматически рассчитывается концентрация *Legionella pneumophila* на 1 л.

**Примечание:** При получении концентрации *Legionella pneumophila* $10^4$ геномэкв./л и более необходимо подтверждение наличия *Legionella pneumophila* с помощью микробиологического анализа.

Результат анализа на обнаружение ДНК *Legionella spp.* считается:

1. **Положительным**, если реакция на *16SPHK* оценена как положительная.

2. **Отрицательным**, если реакции на *16SPHK* и *mip* оценены как отрицательные, реакция на ВПК оценена как положительная.

3. **Недостоверным**, если реакции на *16SPHK* и *mip* (или *16SPHK*, *mip* и *gyrB*) оценены как отрицательные, реакция на ВПК оценена как отрицательная. Следовательно, образец заингибирован, и необходимо либо его предварительное разведение перед реакцией амплификации, либо перевыделение ДНК.

Результат анализа на обнаружение ДНК *Pseudomonas aeruginosa* считается:

1. **Положительным**, если реакция на *gyrB* оценена как положительная.

2. **Отрицательным**, если реакция на *gyrB* оценена как отрицательная, реакция на ВПК оценена как положительная.

3. **Недостоверным**, если реакции на *gyrB*, *16SPHK* и *mip* оценены как отрицательные, реакция на ВПК оценена как отрицательная. Следовательно, образец заингибирован, и необходимо либо его предварительное разведение перед реакцией амплификации, либо перевыделение ДНК.

## 10. Утилизация отходов

Пробирки после выделения ДНК и с продуктами ПЦР, а также использованные наконечники к микродозаторам утилизируются в соответствии с МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

Подписано в печать 04.09.09

Тираж 100 экз.

Подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское шоссе, 19а

gost.e-ecolog.ru