

GeneProof®

Legionella pneumophila

PCR Kit



in vitro Diagnostics

Souprava je určena pro profesionální použití ve specializovaných klinických a výzkumných laboratořích.

Složení soupravy

Cat. No	Interní standard je součástí MasterMixu pro kontrolu inhibice			Obsahuje interní standard samostatně pro kontrolu inhibice a izolačního procesu		
	LP/ISIN/025 25 reakcí	LP/ISIN/050 50 reakcí	LP/ISIN/100 100 reakcí	LP/ISEX/025 25 reakcí	LP/ISEX/050 50 reakcí	LP/ISEX/100 100 reakcí
MASTERMIX <i>Legionella pneumophila</i>	1 x 750 µl	2 x 750 µl	4 x 750 µl	1 x 750 µl	2 x 750 µl	4 x 750 µl
POSITIVE CONTROL <i>Legionella pneumophila</i> 10 ² copies/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	2 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	2 x 200 µl
INTERNAL STANDARD <i>Legionella pneumophila</i>	-	-	-	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl

Podmínky skladování a přepravy

Souprava je doporučeno přepravovat při teplotách v rozmezí -20 °C až -80 °C. Souprava je stabilní při teplotě -20°C 9 měsíců od data výroby. Opětovné zmrazování a rozmrazování MasterMixu, Interního standardu anebo Pozitivní kontroly může vést ke snížení kvality detekce. Výrobce proto doporučuje připravený MasterMix rozalíkovat po 30 µl přímo do PCR zkumavek a takto skladovat při -20 °C. Pozitivní kontrolu a interní standard je možné skladovat při 4 °C.

Informace o patogenu

Legionely se přirozeně vyskytují ve vodních rezervoárech. Infekce člověka mohou probíhat asymptomaticky, přesto legionely mohou způsobit lehký „chřipkovitá“ onemocnění nebo i závažné pneumonie (ink.doba 2-10 dnů, horečka, suchý kašel, bolest na prsou, a bolest hlavy, event. postižení ledvin, jater či CNS, především však obraz mnohočetné bronchopneumonie s mikroabscesy v plicích a úmrtností až 20%). Ohroženou skupinou jsou zejména starší lidé a lidé se sníženou imunitou. K infekcím dochází především po nákaze z vodních rezervoárů, umělých nádrží, vody z klimatizačních zařízení nebo se vyskytují nozokomiální infekce u imunosuprimovaných pacientů. V diagnostice je metodou volby poměrně obtížná kultivace nebo imuno fluorescencí, metodou ELISA je možné prokazovat specifický antigen v moči (test je specifický pro serotypy a po prodělané infekci je dlouhodobě pozitivní). Průkaz protilátek se provádí metodou ELISA. Přímá diagnostika metodou PCR je přibližně stejně citlivá jako kultivace, je ale méně náročná a je mnohem rychlejší, což v následné terapii hraje významnou roli. Používá se především pro rychlý průkaz u ohrožených skupin pacientů nebo pro velmi citlivé stanovení legionel ve vzorcích z prostředí (vodní rezervoáry, stěry a vzorky z klimatizačních jednotek nemocničních a hotelových zařízení). V humánní klinické diagnostice je metoda PCR považována za přínosnou, avšak zatím doplňkovou metodu, jejíž význam stoupá.

Princip metody

Souprava je určena pro detekci genomové DNA *Legionella pneumophila* na principu amplifikace pro *L. pneumophila* specifické sekvence genu kódujícího ribozomální 16S RNA podjednotku metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a měření nárůstu koncentrace amplifikačního produktu v průběhu PCR pomocí fluorescenčně značené sondy (real-time PCR). Přítomnost DNA legionel ve vzorku je indikována nárůstem fluorescence FAM fluoroforu. V reakční směsi je zabudován interní standard (IS), kontrolující možnou inhibici PCR reakce a účinnost DNA izolačního procesu. Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro JOE fluoroforu. Detekční souprava využívá technologii „hot start“ minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální senzitivitu a obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) kontrolující možnou kontaminaci PCR reakce amplifikačními produkty. To umožňuje velmi vysokou citlivost laboratorní detekce legionel v klinickém materiálu. Kit je určen pro *in vitro* diagnostiku a umožňuje kvalitativní detekci.

PCR soupravy firmy GeneProof jsou konstruovány tak, aby je bylo možno používat na real-time přístrojích různých výrobců. *Legionella pneumophila* PCR Kit byl validován na následujících přístrojích:

Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Life Science)
Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science)
7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
LightCycler® 2.0 (Roche)
LightCycler® 480 System (Roche)
SLAN Real-time Quantitative PCR Fluorescent Detection System (Shanghai Odin Scienc & Technology Co.)

Podrobné informace o použití PCR kitů na konkrétních přístrojích naleznete na [www stránkách výrobce](http://www.geneproof.com) (www.geneproof.com) anebo si je vyžádejte u dodavatele souprav.

Pro použití soupravy na jiných real-time přístrojích kontaktujte prosím výrobce: support@geneproof.com

Upozornění:

- Souprava je vyrobena v souladu s evropskou Směrnicí Rady 98/79/ES jako diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*.
- Při manipulaci s pozitivní kontrolou nebo při práci s klinickým materiálem dbejte zvýšené opatrnosti, při nesprávné manipulaci by mohlo dojít ke kontaminaci a tím ke znehodnocení složek soupravy nebo MasterMixu! Za znehodnocení soupravy nesprávnou manipulací nebo skladováním výrobce neručí.
- Soupravu je po použití doporučeno likvidovat podle aktuální právní úpravy s ohledem na skutečnost, že souprava neobsahuje žádné nebezpečné, infekční nebo toxické látky, které by podléhaly zvláštním bezpečnostním předpisům a použité obalové materiály jsou vyrobeny z papíru a z polypropylenu.

Návod k použití

Odběr a uchování vzorků

Pro stanovení legionel v humánní klinické diagnostice je možné vyšetřit vzorky výplachu hrdla, BAL, moči, krve (lépe krevního séra nebo plasmy). Odběr všech typů vzorků kromě krve je nutno provést do sterilní zkumavky bez transportního média a transportovat do 12 hodin při +4°C. Je třeba odebrat do 2ml vzorků tělních tekutin (BAL, moč, ..); max. 1x1x1mm tkáň (v případě vyšetření plicní biopsie); sěr nebo výtěr na tampónu „na sucho“. Odběr krve: vzorek nesrážlivé periferní krve se odebírá do EDTA a transportuje při +4 °C do 24h do laboratoře. Při delším skladování je potřeba všechny vzorky uchovávat zamražené při -20°C.

DNA izolace

Izolaci DNA je možno provádět na trhu dostupnými izolačními soupravami dle příslušných protokolů pro izolaci příslušného mikroorganismu. Výrobce doporučuje následující izolační soupravy: PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof).

Všechny PCR kity GeneProof obsahují interní standard (IS), pomocí kterého je možné účinně sledovat možné inhibice v průběhu PCR amplifikace a případně také účinnost izolačního procesu. Interní standard je přesně definovaný a kvantifikovaný konstrukt plasmidu a insertu připravený cestami genového inženýrství. Společnost GeneProof vyvíjí a prodává dvě základní varianty PCR kitu, které se liší kompozicí interního standardu:

PCR Kit ISIN (Cat. No. LP/ISIN...)

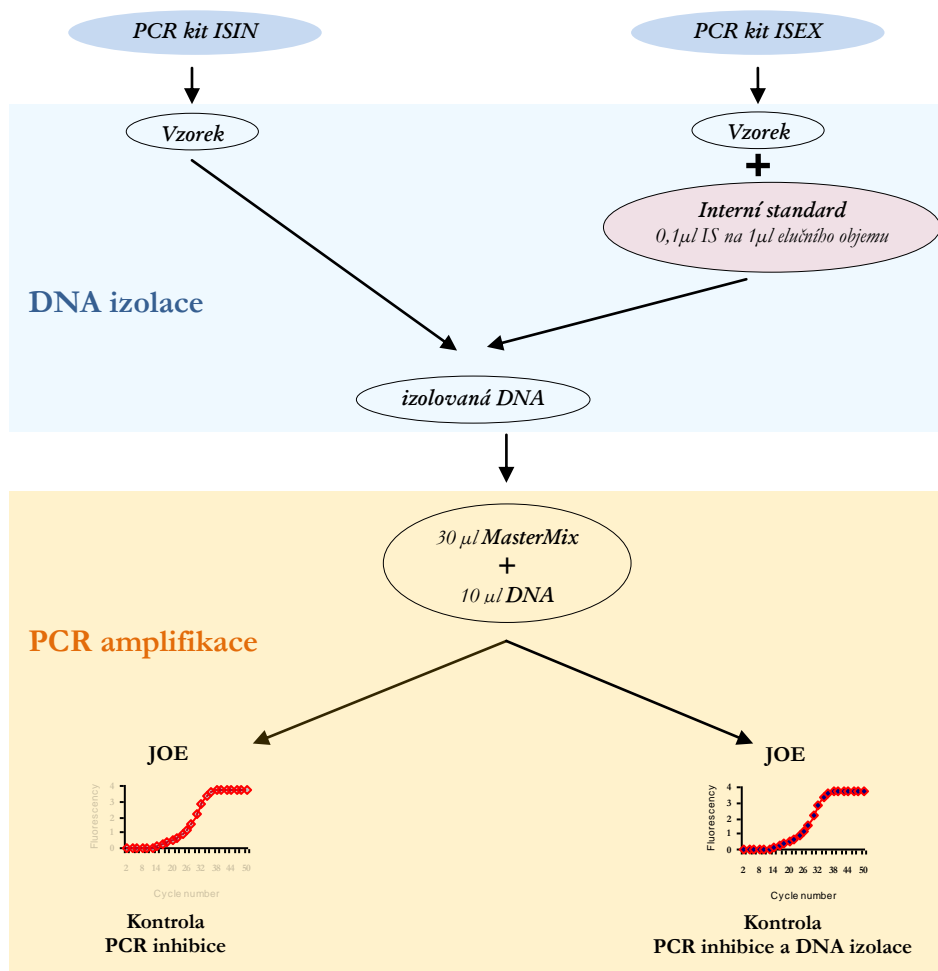
V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přímo součástí zkumavky s MasterMixem. Tato varianta kitu umožňuje účinnou kontrolu inhibice PCR reakce.

PCR Kit ISEX (Cat. No. LP/ISEX...)

V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přiložen jako samostatná součást balení. Tuto variantu PCR kitu lze využít jak ke kontrole inhibice PCR reakce, tak i ke kontrole účinnosti izolace DNA.

Při použití ISEX varianty PCR kitů je IS přidáván přímo ke vzorku na počátku izolačního procesu tak, aby na 1 µl výsledného elučního objemu připadlo 0,1 µl IS:

Eluční objem	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Interní standard	2,5 µl	5 µl	10 µl	20 µl



PCR amplifikace

1. Do zkumavky přidat **30 μ l MasterMixu** a **10 μ l izolátu DNA** nebo **10 μ l Pozitivní kontroly**. Výsledný objem reakční směsi je 40 μ l.
2. Zkumavky uzavřít, krátce centrifugovat, vložit do přístroje a programovat dle schématu:

Amplifikační program:

UDG dekontaminace 37 °C/2 min.
počáteční denaturace 95 °C/10 min.

denaturace 95 °C/5 sec.
annealing 60°C/ 40 sec. – čtení fluorescenčního signálu
extenze 72°C/ 20 sec.
počet cyklů 45

Kvalitativní vyhodnocení detekce

