

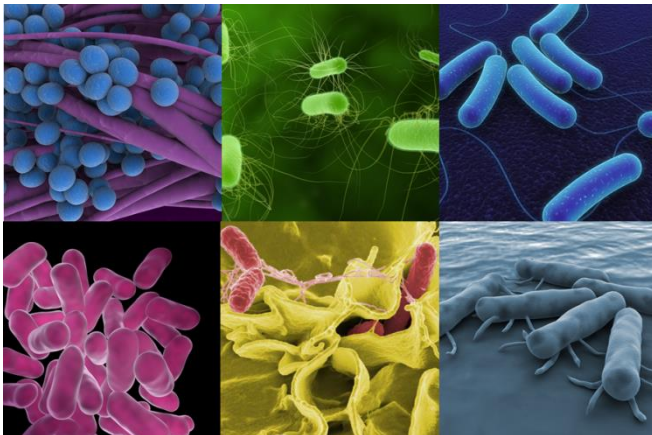
CONGEN

SureFast[®] Legionella Screen PLUS

Art. No. F5502

100 rxn

User Manual



June 2018

 **Inhalt** /  **Content**

1.	Allgemeines	2
1.1	Beschreibung	2
1.2	Nachweisgrenze	2
1.3	DNA-Präparation	2
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	2
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	2
1.6	Geräteeinstellungen	3
2	Qualitative Analyse	3
2.1	Protokoll	3
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	3
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	4
2.2	Interpretation der Ergebnisse	4
3	Weitere Informationen	4
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	4
3.2	Technischer Support	4
1	General Information	5
1.1	Description	5
1.2	Limit of Detection	5
1.3	DNA-preparation	5
1.4	Kit components and storage	5
1.5	Additionally required equipment and materials	5
1.6	Setup	6
2	Qualitative Analysis	6
2.1	Protocol	6
2.1.1	Preparation of the master-mix	6
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	7
2.2	Interpretation of results	7
3	Further Information	7
3.1	Product Information	7
3.2	Technical Support	7

1. Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird *Legionella* spp. DNA nachgewiesen. Die Positive Control entspricht dem Grenzwert der *Legionella* spp. Konzentration aus der Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (PLUS) ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 510 nm und 580 nm (FAM und VIC/HEX) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 480 Cobas, Roche LightCycler® 2.0¹, Applied Biosystems 7500 sowie am Qiagen RotorGene Q.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Legionella Screen PLUS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFast® PREP Aqua Kit empfohlen.

Findet die Auswertung über den Grenzwert von 100 CFU/100 ml (Positive Control) aus der TrinkwV 2001 statt, muss der SureFast® PREP Aqua Kit verwendet werden und 100 ml der Probelösung filtriert werden.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP Aqua)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

¹ Für die Benutzung des Roche LightCycler® 2.0 ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) verwendet werden.

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler/MIC	Rotorcycler/ LightCycler® 480 II
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	1 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase Nachweissystem: Diverse Geräte FAM -Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LightCycler 2.0 530 nm - none LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm Interne Amplifikationskontrolle: Diverse Geräte VIC/HEX -Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LightCycler 2.0 560 nm - none LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm Passive Reference: None	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download		

2 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle und Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Es wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen und zentrifugieren. Die Taq Polymerase sollte nicht aufgetaut und nicht im Vortex gemischt werden.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle (Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix).
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Reaktionsgefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analysen-Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt (FAM). Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im FAM-Kanal vor dem Signal der Positive Control, liegt die Konzentration der Probe über dem Grenzwert für *Legionella* spp. von 100 CFU/100 mL. Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im FAM-Kanal nach dem Signal der Positive Control, liegt die Konzentration der Probe unter dem Grenzwert.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** (VIC/HEX) ist. Sollte die Probe sowie die interne Amplifikationskontrolle **negativ** sein, sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten

3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an info@congen.de.

1 General Information

1.1 Description

The test detects *Legionella* spp. DNA. The Positive Control corresponds to the limit of *Legionella* spp. concentration of the German drinking water ordinance 2001.

Each reaction contains an internal amplification control (PLUS). The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at 510 nm and 580 nm (FAM and VIC/HEX) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 2.0², Roche LightCycler® 480 Cobas, Applied Biosystems 7500 and Qiagen RotorGene Q.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Legionella Screen PLUS real-time PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA copies. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Aqua is recommended.

If the evaluation is carried out following the German drinking water ordinance 2001 stating a limit of 100 CFU/100 ml (Positive Control), the SureFast® PREP Aqua has to be used and 100 ml of the sample have to be filtered.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at -20°C and protected from light.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP Aqua)
- real-time PCR instrument with four detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps) pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

²For the use of the Roche LightCycler® 2.0 a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010) must be used for the color compensation of such devices.

1.6 Setup

	Blockcycler/MIC	Rotorcycler/ LightCycler® 480 II
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	1 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of Extension Phase Detection System: Various devices FAM -Channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LightCycler 2.0 530 nm - none LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm Internal Amplification Control: Various devices VIC/HEX -Channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LightCycler 2.0 560 nm - none LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm Passive Reference: None	
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/downloads		

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control and extraction control. The master-mix includes an internal amplification control (inhibition control) for each reaction.

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix by vortexing and centrifuge before opening and use. The tube of the Taq Polymerase should be kept at -20°C and not be mixed by vortexing.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
Total volume	20 µl	220 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- Close the tube of the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells or capillaries.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells or capillaries into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. The control reactions need to give the correct results.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplification in the detection system (FAM). If the sample DNA is detected before the signal of the Positive Control (FAM), the concentration of the sample DNA is above the *Legionella spp.* limit of 100 CFU/100 mL. If the sample DNA is detected after the signal of the Positive Control (FAM), the concentration of the sample DNA is under the *Legionella spp.* limit.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system and the internal amplification control (inhibition control) of the sample is **positive** (VIC/HEX). If the sample DNA and the internal amplification control are **negative** the sample contains PCR inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the sample is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Validation Report

3.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to info@congen.de