

**SureFast® Parasitic Water Panel 4plex (100 Reakt.)**

Art. Nr. F5506

Version 1.1

Beschreibung

SureFast® Parasitic Water Panel 4plex ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* und *Cryptosporidium* spp.. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm (FAM, VIC, ROX und Cy5) detektieren können verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Roche LightCycler® 480 II/Roche cobas z 480 Analyzer¹, Applied Biosystems 7500 und BioRad CFX96.

Nachweisgrenze

Die SureFast® Parasitic Water Panel 4plex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

DNA-Präparation

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

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.

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm, 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

Protokoll

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.

¹ Für die Benutzung des Roche LightCycler® 480 oder cobas z 480 Analyzer ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) verwendet werden.

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler	Rotorcycler/ LightCycler® 480 II
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	1 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase Nachweissystem <i>Giardia intestinalis</i> : Diverse Geräte FAM-Kanal, Quencher: BHQ LC480 II 465 nm, 510 nm Interne Amplifikationskontrolle: Diverse Geräte VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ LC480 II 533 nm, 580 nm Nachweissystem <i>Entamoeba histolytica</i> : Diverse Geräte ROX-Kanal, Quencher: BHQ LC480 II 533 nm, 610 nm Nachweissystem <i>Cryptosporidium</i> spp.: Diverse Geräte Cy5-Kanal, Quencher: BHQ LC480 II 618 nm, 660 nm	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download		

3. 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.

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.

Giardia intestinalis-DNA wird im FAM-Kanal, *Entamoeba histolytica*-DNA im ROX-Kanal, *Cryptosporidium* spp.-DNA im Cy5-Kanal und die interne Amplifikationskontrolle im VIC/HEX-Kanal nachgewiesen.

Eine Probe wird als **positiv** für den jeweiligen Parameter (*Giardia intestinalis*/*Entamoeba histolytica*/*Cryptosporidium* spp.) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im entsprechenden Kanal (FAM/ROX/Cy5) zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter (*Giardia intestinalis*/*Entamoeba histolytica*/*Cryptosporidium* spp.) bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im entsprechenden Kanal (FAM/ROX/Cy5) zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (VIC/HEX) **positiv** ist (siehe dazu auch untenstehende Tabelle).

Ergebnis im jeweiligen Kanal				
FAM-Kanal <i>Giardia intestinalis</i>	ROX-Kanal <i>Entamoeba histolytica</i>	Cy5-Kanal <i>Cryptosporidium</i> spp.	VIC/HEX-Kanal Amplifikationskontrolle	Ergebnis
positiv	positiv/negativ	positiv/negativ	positiv /negativ	<i>Giardia intestinalis</i> DNA nachweisbar
positiv/negativ	positiv	positiv/negativ	positiv /negativ	<i>Entamoeba histolytica</i> DNA nachweisbar
positiv/negativ	positiv/negativ	positiv	positiv /negativ	<i>Cryptosporidium</i> spp. DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar [#]

[#] Eine Probe, die **negativ** für alle Parameter und **negativ** im VIC/HEX-Kanal (interne Amplifikations- bzw. Extraktionskontrolle) ist, kann nicht bewertet werden. In diesem Fall sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden oder die Nukleinsäure-Extraktion hat nicht ordnungsgemäß funktioniert. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

Weitere Informationen

- Validierungsdaten

Technischer Support

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

Description

The SureFast® Parasitic Water Panel 4plex is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium* spp.. Each reaction contains an internal amplification control. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at 510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm (FAM, VIC, ROX and Cy5) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Roche LightCycler® 480 II/Roche cobas z 480 Analyzer² and Applied Biosystems 7500, BioRad CFX 96.

Limit of Detection

The SureFast® Parasitic Water Panel 4plex 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.

DNA-preparation

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

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.

Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument, equipped with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm, 660 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

Protocol

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 For the use of the Roche LightCycler® 480 instrument or cobas z 480 Analyzer a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must be used for the color compensation of such devices.

2. Setup

	Blockcycler	Rotorcycler/ LightCycler® 480 II
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of Extension Phase Detection system <i>Giardia intestinalis</i> : various devices FAM-channel, Quencher: BHQ LC480 II 465 nm, 510 nm PCR inhibition control: various devices VIC/HEX-channel, Quencher: BHQ LC480 II 533 nm, 580 nm Detection system <i>Entamoeba histolytica</i> : various devices ROX-channel, Quencher: BHQ LC480 II 533 nm, 610 nm Detection system <i>Cryptosporidium</i> spp.: various devices Cy5-channel, Quencher: BHQ LC480 II 618 nm, 660 nm	
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/downloads		

3. Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- 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.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells.
- Centrifuge all tubes/wells shortly at low speed.
- Place tubes/wells into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

Interpretation of results

The *Giardia intestinalis* DNA is detected in the FAM-channel, the *Entamoeba histolytica* DNA is detected in the ROX-channel, the *Cryptosporidium* spp. DNA is detected in the Cy5-channel and the internal amplification control is detected in the VIC/HEX-channel.

A sample is stated **positive** for the respective parameter (*Giardia intestinalis*/*Entamoeba histolytica*/*Cryptosporidium* spp.), if the sample DNA shows amplification in the respective channel (FAM/ROX/Cy5).

A sample is stated **negative** for the respective parameter (*Giardia intestinalis*/*Entamoeba histolytica*/*Cryptosporidium* spp.), if the sample DNA shows no amplification in the respective channel (FAM/ROX/Cy5) and the internal amplification control (VIC/HEX) of the sample is **positive** (see also table below).

result in the respective channel				
FAM-channel <i>Giardia intestinalis</i>	ROX-channel <i>Entamoeba histolytica</i>	Cy5-channel <i>Cryptosporidium</i> spp.	VIC/HEX-channel amplification control	result
positive	positive/negative	positive/negative	positive/ negative	<i>Giardia intestinalis</i> DNA detected
positive/negative	positive	positive/negative	positive/ negative	<i>Entamoeba histolytica</i> DNA detected
positive/negative	positive/negative	positive	positive/ negative	<i>Cryptosporidium</i> spp. DNA detected
negative	negative	negative	negative	invalid*

* If the sample DNA and the internal amplification control are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances or the sample preparation was not successful. Under these circumstances an evaluation of the sample is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

Product Information

- Validation Report

Technical Support

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