

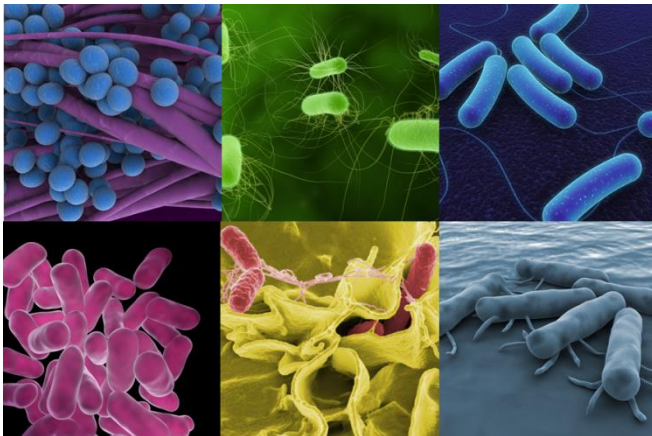
CONGEN

**SureFast<sup>®</sup> Pseudomonas  
aeruginosa PLUS**

Art. No. F5503

100 rxn

User Manual



April 2018

April 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 .....	6
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 *Pseudomonas aeruginosa* DNA nachgewiesen.

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, Agilent AriaDx, BioRad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 2.0<sup>1</sup>, Applied Biosystems 7500, BMS MIC, LTF MyGo Pro sowie am Qiagen RotorGene Q.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® *Pseudomonas aeruginosa* PLUS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  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.

### 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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

<sup>1</sup> 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**

	<b>Blockcycler/MIC</b>	<b>Rotorcycler/ LightCycler® 480 II</b>
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 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Diverse Geräte <b>FAM</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  Interne Amplifikationskontrolle: Diverse Geräte <b>VIC/HEX</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

**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:

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

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

April 2018

### 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.

Im FAM-Kanal wird der Parameter *Pseudomonas aeruginosa* und im VIC/HEX-Kanal wird die Interne Amplifikationskontrolle detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für *Pseudomonas aeruginosa* bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt (FAM). Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Fam-Kanal zeigt und die zugehörige Interne Amplifikationskontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** ist.

Eine Probe, die **negativ** im Fam-Kanal und **negativ** im VIC/HEX-Kanal (Interne Amplifikationskontrolle) 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.

## 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](mailto:info@congen.de).

## 1 General Information

### 1.1 Description

The test detects *Pseudomonas aeruginosa* DNA.

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, Agilent AriaDx, BioRad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 2.0<sup>2</sup>, Applied Biosystems 7500, BMS MIC, LTF MyGo Pro and Qiagen RotorGene Q.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFast® Pseudomonas aeruginosa PLUS real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  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.

### 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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

<sup>2</sup>For 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**

	<b>Blockcycler/MIC</b>	<b>Rotorcycler/ LightCycler® 480 II</b>
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 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Various devices <b>FAM</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II                   465 nm - 510 nm  Internal Amplification Control: Various devices <b>VIC/HEX</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II                   533 nm - 580 nm	
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: <a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>		

**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:

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

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.

April 2018

## 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.

*Pseudomonas aeruginosa* is detected in the FAM-channel and the internal amplification control will be detected in the VIC/HEX-channel.

A sample is stated **positive** for *Pseudomonas aeruginosa*, if the sample DNA shows an amplification in in the Fam-channel. A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the Fam-channel and the internal amplification control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive**.

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 samples 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](mailto:info@congen.de)