

## SureFast® Legionella 3plex (100 Reakt.)

Art. Nr. F5505

Juni 2017

### Beschreibung

SureFast® Legionella 3plex ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Legionella spp.* und *Legionella pneumophila*. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens drei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm und 670 nm (FAM, VIC/HEX und Cy5) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500 sowie am Qiagen RotorGene Q.

### Nachweisgrenze

Die SureFast® Legionella 3plex 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.

### 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  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern.

### Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit drei Detektionskanälen (522 nm, 553 nm und 670 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                         |
| <b>Gesamtvolumen</b>       | <b>20 µl</b>       | <b>220 µl</b>                  |

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

## 2. Geräteeinstellungen

|  | <b>Blockcycler</b>  | <b>Rotorcycler/<br/>LightCycler® 480 II</b> |
|--|---|---|
| Initial Denaturation (HOLD)<br>Cycles  | 1 min, 95°C<br>45   | 1 min, 95°C<br>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<br>(exemplarisch)   | Detection: End of Extension Phase<br><br>Nachweissystem <i>Legionella spp.</i> :<br>Diverse Geräte FAM-Kanal, Quencher: BHQ<br>Rotor-Gene Q Green<br>LightCycler® 480 II 465 nm - 510 nm<br><br>Nachweissystem <i>Legionella pneumophila.</i> :<br>Diverse Geräte Cy5-Kanal, Quencher: BHQ<br>Rotor-Gene Q Red<br>LightCycler® 480 II 618 nm - 660 nm<br><br>Interne Amplifikationskontrolle:<br>Diverse Geräte VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ<br>Rotor-Gene Q Yellow<br>LightCycler® 480 II 533 nm - 580 nm<br><br>Passive Reference: None |   |
| 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> |   |   |

## 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 Analyse 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** für *Legionella spp.* bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Eine Probe wird **negativ** für *Legionella spp.* bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** (VIC/HEX) ist.

Eine Probe wird **positiv** für *Legionella pneumophila* bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Cy5-Kanal zeigt. Eine Probe wird **negativ** für *Legionella pneumophila* bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Cy5-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** (VIC/HEX) ist.

Sollte die Probe in allen Kanälen inklusive dem VIC/HEX-Kanal **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.

**Weitere Informationen**

- Validierungsdaten

**Technischer Support**

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

**Description**

The SureFast® Legionella 3plex is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of *Legionella spp.* and *Legionella pneumophila*. 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 three fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm and 670 nm (FAM, VIC/HEX and Cy5) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500 and Qiagen RotorGene Q.

**Limit of Detection**

The SureFast® Legionella 3plex 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.

**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 three detection channels (522 nm, 553 nm and 670 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                         |
| <b>Total volume</b>       | <b>20 µl</b>        | <b>220 µl</b>                  |

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

## 2. Setup

|  | <b>Blockcycler</b>   | <b>Rotorcyclor/<br/>LightCycler® 480 II</b> |
|--|--|---|
| Initial Denaturation (HOLD)<br>Cycles  | 1 min, 95°C<br>45  | 1 min, 95°C<br>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<br>(exemplary)  | Detection: End of Extension Phase<br><br>Detection System <i>Legionella spp.</i> :<br>Various devices FAM-channel, Quencher: BHQ<br>Rotor-Gene Q Green<br>LightCycler® 480 II 465 nm - 510 nm<br><br>Detection System <i>Legionella pneumophila</i> :<br>Various devices Cy5-channel, Quencher: BHQ<br>Rotor-Gene Q Red<br>LightCycler® 480 II 618 nm - 660 nm<br><br>Internal Amplification Control:<br>Various devices VIC/HEX-channel, Quencher: BHQ<br>Rotor-Gene Q Yellow<br>LightCycler® 480 II 533 nm - 580 nm<br><br>Passive Reference: None |   |
| Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage:<br><a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a> |  |   |

## 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 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** for *Legionella spp.*, if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel. A sample is stated **negative** for *Legionella spp.*, if the sample DNA shows no amplification in the FAM-channel and the internal amplification control (inhibition control) of the sample is **positive** (VIC/HEX).

A sample is stated **positive** for *Legionella pneumophila*, if the sample DNA shows amplification in the Cy5-channel. A sample is stated **negative** for *Legionella pneumophila*, if the sample DNA shows no amplification in the Cy5-channel and the internal amplification control (inhibition control) of the sample is **positive** (VIC/HEX).

In case of a **negative** result in all channels including the VIC/HEX-channel 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.

## Product Information

- Validation Report

## Technical Support

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de).