

Aqua Screen®
Legionella pneumophila Detection Kit for qPCR
- Type 1 -

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 1. Reagenzien und Materialien | 2 |
| 1.1 Inhalt der Packung | 2 |
| 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien | 2 |
| 1.3 Benötigte Geräte und Materialien | 2 |
| 2. Anwendungsgebiete und Testprinzip | 3 |
| 3. Durchführung | 3 |
| 3.1 Gewinnung des Probenmaterials | 3 |
| 3.2 Rehydratisierung der Reagenzien | 3 |
| 3.3 Programmierung und Auswertung | 4 |
| 3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0 | 4 |
| 3.3.2 Rotogene 6000 (5-plex) | 5 |
| 3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix) | 6 |
| 3.5 Interpretation der Ergebnisse | 6 |
| 4. Fehleranalyse | 7 |
| 5. Gerätekompatibilität | 7 |

Contents

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1. Reagents and Materials | 8 |
| 1.1 Test Kit Components | 8 |
| 1.2 Stability and Storage | 8 |
| 1.3 Supplemental Requirements | 8 |
| 2. Application and Test Principle | 9 |
| 3. Test Protocol | 9 |
| 3.1 Preparation of Sample Material | 9 |
| 3.2 Rehydration of the Reagents | 9 |
| 3.3 Experimental Protocol | 10 |
| 3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0 | 10 |
| 3.3.2 Rotogene 6000 (5-plex) | 11 |
| 3.4 PCR Master mix Setup | 12 |
| 3.5 Result Interpretation | 12 |
| 4. Trouble shooting | 13 |
| 5. Instrument Compatibility | 13 |

1. Reagenzien und Materialien

1.1 Inhalt der Packung

Arbeitsanleitung

Primer/Probe/Nucleotide Mix

Primer, Sonde und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert

roter Verschluss

| | |
|------|---|
| REAC | B |
|------|---|

Rehydration Buffer

Rehydratisierungspuffer, 1,8ml

blauer Verschluss

| | |
|------|---|
| REAC | A |
|------|---|

Positive Control DNA

DNA-Fragmente des *Legionella pneumophila*-Genoms, mittels PCR hergestellt, nicht infektiös, lyophilisiert

grüner Verschluss

| | |
|---------|---|
| CONTROL | + |
|---------|---|

Internal Control DNA

Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert

gelber Verschluss

| | |
|---------|---|
| CONTROL | i |
|---------|---|

PCR grade Water

2 ml

weißer Verschluss

| | |
|------|---|
| REAC | H |
|------|---|

1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden gekühlt versendet und bei +2°C - +8°C aufbewahrt. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien nach Resuspension sollte vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen und der Primer/Probe/Nucleotide Mix nach dem Auflösen aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Produktzertifikat angegebenen Datum haltbar. Das Produktzertifikat finden Sie auf unserer Webseite (www.minerva-biolabs.com).

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

- qPCR-Gerät (Kompatibilität siehe Seite 7)
- geeignete PCR Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen (1 - 1000µl)
- MB Taq DNA Polymerase (1 Unit/Test)



Dieser Kit wurde mit unserer MB Taq DNA Polymerase validiert und erzielt mit ihr exzellente Ergebnisse (Cat # 53-0050; 53-0100; 53-0200; 53-0250).

Hinweis:

Bei der Verwendung anderer Polymerasen mit unserem Kit können wir weder hohe Sensitivität noch Kompatibilität garantieren. Sollten Sie unsere MB Taq DNA-Polymerase im Vergleich mit Ihrer eigenen Polymerase testen wollen, fordern Sie bitte ein kostenfreies MB Taq Testmuster (10 Units) an. Bei der Verwendung anderer Polymerasen muss eventuell, der Polymerase spezifische Reaktionspuffer verwendet.

2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Diese Aqua Screen® PCR Einheit ist ein Testsystem zur quantitativen Detektion von *Legionella pneumophila* in Wasserproben. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die mitgelieferten Primer sind für einen Abschnitt der *mip*-kodierenden Region des *Legionella pneumophila* Genoms spezifisch. Innerhalb des amplifizierten Produktes bindet eine spezifische Sonde, deren Fluoreszenzsignal bei ~ 520 nm die Bildung des Produktes anzeigt. Das Testsystem beinhaltet außerdem eine Interne Kontrolle, die im PCR-Ansatz mitgeführt werden kann. Die interne Kontrolle liefert bei einer erfolgreichen PCR ein Produkt, das mit einer weiteren sequenzspezifischen Sonde bei ~ 610 nm detektiert wird. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse, z.B. durch Inhibition ausgeschlossen werden. Das gewählte Template ist innerhalb der Spezies *Legionella pneumophila* hochkonserviert. Kreuzaktivitäten zu anderen Legionellenarten und typischen Wasserkeimen sind nicht bekannt. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10 Genomkopien/Testansatz.

Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* enthält serienmäßig dUTP statt dTTP. Durch die Verwendung des hitzelabilen Enzyms Uracil-DNA Glycosylase (UNG) im PCR-Ansatz kann ein Verschleppen früherer PCR-Produkte in den neuen Reaktionsansatz vermieden werden. Dazu muss in vorangegangenen PCR-Ansätzen dTTP gegen dUTP ausgetauscht worden sein und eine Behandlung der neuen Ansätze mit UNG erfolgen. Unerwünschte PCR-Vorlagen werden an den UTPs gespalten und im anschließenden Denaturierungsschritt hydrolysiert. Gleichzeitig wird das Enzym durch die Hitze inaktiviert. Native DNA wird nicht abgebaut, da es kein Uracil enthält. UNG ist nicht Bestandteil dieses Kits.



Dieser Kit darf nicht für die klinische Diagnostik eingesetzt werden.

3. Durchführung

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Die Gewinnung des Probenmaterials ist im Handbuch des Aqua Screen®FastExtract ausführlich beschrieben. Die Probe sollte eine Gesamt-DNA-Last von maximal 100 µg/ml aufweisen. Eine Lagerung der Extrakte bei mindestens -18 °C über einen Zeitraum von einem Jahr ist möglich. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder eine Lagerung im Kühlschrank für mehr als 12 Stunden sollte vermieden werden.

3.2 Rehydratisierung der Reagenzien

1. Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugieren
2. Zugabe von 365 µl Rehydratisierungspuffer zum *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. Zugabe von DNA-freiem Wasser (im Kit enthalten)

| | |
|-----------------------------|--------|
| <i>Positive Control DNA</i> | 300 µl |
| <i>Internal Control DNA</i> | 300 µl |
4. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
5. DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren



Nach erfolgter Rehydratisierung müssen die Reagenzien auf Eis gehalten und bei mindestens -18°C gelagert werden.

3.3 Programmierung und Auswertung

Programme für weitere qPCR-Geräte werden auf unserer Homepage angeboten.

3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0

Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen 1
Analysemodus None



Die Dauer der Vorinkubation bei 95°C ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Bei anderen Hot-Start-Enzymen muss die Vorinkubation zur Aktivierung entsprechend verlängert werden. Bitte entnehmen Sie die Dauer dem Beipackzettel Ihrer Polymerase.

| Temperaturprofil [°C] | Segment 1 |
|-------------------------------|------------------|
| Zieltemperatur [°C] | 95 |
| Inkubationszeit [min] | 2:00 |
| Temperaturanstiegsrate [°C/s] | 20.0 |
| zweite Zieltemperatur [°C] | 0 |
| Temperaturschritte [°C] | 0.0 |
| Verzögerung [Zyklen] | 0 |
| Fluoreszenzmessung | None |

Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen 45
Analysemodus Quantifikation

| Temperaturprofil [°C] | Segment 1 | Segment 2 | Segment 3 | Segment 4 |
|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Zieltemperatur [°C] | 95 | 55 | 60 | 72 |
| Inkubationszeit [s] | 0 | 5 | 7 | 5 |
| Temperaturanstiegsrate [°C/s] | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| zweite Zieltemperatur [°C] | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Temperaturschritte [°C] | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Verzögerung [Zyklen] | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fluoreszenzmessung | None | None | Single | None |



Segment 3 darf nicht weggelassen werden!

Programmschritt 3: Kühlung

Zyklen 1
Analysemodus None

| Temperaturprofil [°C] | Segment 1 |
|-------------------------------|------------------|
| Zieltemperatur [°C] | 40 |
| Inkubationszeit [s] | 30 |
| Temperaturanstiegsrate [°C/s] | 20.0 |
| zweite Zieltemperatur [°C] | 0 |
| Temperaturschritte [°C] | 0.0 |
| Verzögerung [Zyklen] | 0 |
| Fluoreszenzmessung | None |

Auswertung der Rohdaten:

- Es erfolgt zunächst die Auswahl der Fluoreszenzkanäle F1 und F2 bzw. Channel 1 und 2.
- Zu Darstellung der Amplifikationskurven und den probenspezifischen ct-Werten wird auf *Quantification* geklickt.
- Der Threshold wird von der Software automatisch gelegt.
- Amplifikationskurven ohne signifikanten Anstieg sind als negativ zu werten.

| Target | <i>L. pneumophila</i> | Interne Kontrolle |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| Kanäle beim LC 1.2, 1.5 | F1 (520) | F2 (610) |
| Kanäle bei LC 2.0 | Channel 1 (520) | Channel 2 (610) |

3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)

Programmschritt 1: Vorinkubation

| | |
|-----------------|----------|
| Einstellung | Hold |
| Zieltemperatur | 95 °C |
| Inkubationszeit | 3:00 min |



Bitte achten Sie vor dem Start des Laufes auf die korrekte Filterauswahl:

Target (*L. pneumophila*): Green (470-510 nm)
Interne Kontrolle: Orange (585-610 nm)

Programmschritt 2: Amplifikation

| | |
|---------------|---|
| Einstellung | Cycling |
| Zyklen | 45 |
| Denaturierung | 95 °C für 5 sek |
| Annealing | 55 °C für 10 sek —> Datenerfassung (Filter Green und Orange) |
| Extension | 72°C für 7 sek |
| Gain | automatisch (auto Gain) |
| Slope Correct | aktiviert |
| Ignore First | deaktiviert |

Auswertung der Rohdaten:

- Öffnen des Fensters *Analysis*
- Auswahl des Reiters *Quantitation*
- Auswahl des jeweiligen Kanals (Green oder Orange)
- Starten der Analyse durch doppeltes Anklicken.
- Es öffnen sich folgende Fenster:
 - Quantitation Analysis - Cycling A* (green oder orange)
 - Quant. Results - Cycling A* (green oder orange)
 - Standard Curve - Cycling A* (green oder orange)
- Im Fenster *Quantitation Analysis* erst *linear scale* und dann *slope correct* wählen
- Einstellung des Threshold (entfällt wenn eine Standardreihe mitgeführt und *Autothreshold* angewählt wurde)
 - Im Fenster *CT Calculation* den Threshold setzen (Wert 0-1)
 - Thresholdlinie in Grafik platzieren. Die Thresholdlinie sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Im Fenster *Quant. Results* können die ct-Werte abgelesen werden.
- Proben, die keine ct-Werte zeigen sind als negativ zu werten.

| Target | <i>L. pneumophila</i> | Interne Kontrolle |
|--------|-----------------------|-------------------|
| Kanal | Green | Orange |

3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion beträgt 25 μl . Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle (NK) und eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt werden. Der Mastermix wird auf Eis in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und vorsichtig gemischt.

Pipettierschema:

| | für 1 Reaktion | für 25 Reaktionen* |
|----------------------------------|--------------------|---------------------|
| Primer/Probe/Nucleotide Mix | 14,0 μl | 350,0 μl |
| Internal Control DNA | 1,0 μl | 25,0 μl |
| Polymerase (5 U/ μl) | 0,2 μl | 5,0 μl |

+ Template DNA / NK oder PK 10,0 μl

*entspricht dem Inhalt eines Primer/Probe/Nucleotide Mix-Röhrchens

Für andere Enzymkonzentrationen muss die Verdünnung entsprechend angepasst werden.



Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR dürfen nicht mehr als 60 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommt.

Der Mastermix wird á 15 μl auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit 10 μl deionisiertem Wasser oder Elutionspuffer der DNA-Extraktion als Negativkontrolle, bzw. 10 μl Probe oder 10 μl Positivkontrolle versetzt. Diese Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert, die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Thermocycler-Programm gestartet.

3.5 Interpretation des Ergebnisses

| <i>L.pneumophila</i> PCR | Interne Kontrolle | Interpretation |
|--------------------------|-------------------|-------------------------------|
| positiv | irrelevant | <i>L. pneumophila</i> positiv |
| negativ | negativ | Inhibition der PCR |
| negativ | positiv | <i>L. pneumophila</i> negativ |

Die Präsenz von *L. pneumophila* in der Probe wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals für *L. pneumophila* angezeigt. Bei Verwendung der Internen Kontrolle wird eine fehlerfreie PCR durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Kanal für die Interne Kontrolle angezeigt. Die Interne Kontrolle ist so gering dosiert, dass sie bei großen Mengen an *L. pneumophila* in der Probe nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das Signal im Kanal für *L. pneumophila* erkennbar.

Werden 10 μl Testvolumen verwendet, so wird für die Berechnung die Gesamtmenge an Genomäquivalenten in der verwendeten Wasserprobe, das Ergebnis der real-time PCR mit 10 multipliziert (bezogen auf 100 μl Eluat).

Beispiel: 500 ml Probenwasser werden für die Untersuchung verwendet. Anhand der qPCR wird ein Ergebnis von 60 DNA-Kopien in einem Testvolumen von 10 μl ermittelt. 60 mal 10 ergibt 600. Also befanden sich in den 500 ml Probenwasser 600 intakte Legionellenpartikel (lebende kultivierbare, lebende jedoch nicht kultivierbare und tote jedoch intakte Legionellen), bzw. 120 Legionellenpartikel auf 100 ml Wasser.

4. Fehleranalyse

Zur Fehleranalyse sollten zuerst das Thermocycler-Programm sowie das Pipettierschema überprüft werden. Anschließend empfiehlt sich die Durchführung von Probeläufen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle. Bei Verwendung anderer DNA-Polymerasen als der empfohlenen sind die unter Punkt 1 aufgeführten Hinweise zu beachten. Die Polymerase-Konzentration kann dabei auf bis zu 2,5 U/Reaktion erhöht werden. Bitte beachten Sie, dass sich das gesamte Pipettierschema verändert.

Findet bei den Kontrollansätzen keine Amplifikation statt, kann dies folgende Ursachen haben:

- Aktivität der verwendeten Polymerase nicht ausreichend oder Enzym nicht kompatibel mit Kitpuffer
- Programmierfehler
- Pipettierfehler
- Probenelutionspuffer nicht für die Komplettierung der Negativkontrollen verwendet

5. Gerätekompatibilität

| Gerät | Typ 1 | Typ 2 |
|-------------------------|-------|-------|
| LightCycler® 1.2 | +v | - |
| LightCycler® 1.5 | + | - |
| LightCycler® 2.0 | + | o |
| LightCycler® 480 | + | o |
| Rotorgene 3000 | + | o |
| Rotorgene 6000 (5-plex) | +v | o |
| ABI Prism® 7000 | - | + |
| ABI Prism® 7300 | - | + |
| ABI Prism® 7500 | - | +v |
| ABI Prism® 7700 | - | + |
| ABI Prism® 7900 | - | + |
| iCycler iQ® | o | o |
| iQ™ 5 | + | o |
| Opticon 2 | - | o |
| Chromo 4 | o | o |
| MX3000P | o | o |
| MX4000 | o | o |

+ = empfehlende Kit-Variante

- = Detektion der internen Kontrolle nicht möglich

o = nicht getestet, aber Kompatibilität zu erwarten

v = validiert

1. Reagents and Materials

1.1 Test Kit Components

Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN Mix)

Primer set, probes and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized

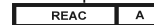
red cap



Rehydration Buffer

1.8 ml

blue cap



Positive Control DNA

Fragment of *Legionella pneumophila* DNA prepared by PCR, non-infectious, lyophilized

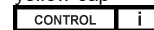
green cap



Internal Control DNA

Plasmid DNA, non-infectious, lyophilized

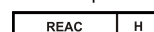
yellow cap



PCR Grade Water

2 ml

white cap



Please find the guarantee certificate and the conformity declaration on our website.

1.2 Stability and Storage

Kit components are stable during shipping. Upon receipt, store at +2°C to +8°C. After rehydration of the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* store below -18°C and avoid repeated freezing and thawing. Protect the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* from light. For repeated testing of low sample numbers, the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* and the controls should be aliquoted. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the box label.

1.3 Supplemental Requirements

- qPCR machine
- corresponding PCR reaction tubes
- microcentrifuge, micropipettes and filtered tips (1 - 1000 µl)
- polymerase

Please do not use the product after the date of expiry. Discard remaining reagents.

The test provides excellent results with MB Taq DNA Polymerase (Cat # 53-0050/0100/0200/0250). We can neither guarantee a high level of sensitivity nor compatibility with other polymerases. If you intend to test our MB Taq DNA Polymerase in parallel with your in-house polymerase, please feel free to contact us and get a gratis MB Taq sample (10 units).

2. Application and Test Principle

The Aqua Screen® PCR test system is a test for the quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples.

The test is based on the polymerase chain reaction. The supplied primer set is specific for a segment of the *mip* region of the *Legionella* genome. The target probe emits fluorescent light at ~520 nm. Aqua Screen *L.pneumophila* qPCR also provides internal control DNA, which can be added to the reaction. When running the PCR with the internal control DNA, a successful performed reaction with a negative result is indicated by a distinct fluorescent signal. The internal control is detected by another probe, which emits light at ~610 nm.

Detailed studies confirm the high specificity and sensitivity of Aqua Screen®. The selected template is highly preserved within *Legionella pneumophila*. Cross activity with other *Legionella* species or species typical for water contamination is not known.

The heat-labile Uracil-DNA Glycosylase (UNG) is suitable for preventing carry-over contamination between PCRs. This technique relies on the incorporation of deoxyuridine triphosphate (dUTP) during all amplification reactions and the pretreatment of all successive PCR mixtures with the heat-labile UNG. The UNG cleaves DNA at any site where a deoxyuridylate residue has been incorporated. Subsequently, the resulting abasic sites are hydrolyzed due to the high temperature during the initial denaturation step, and cannot serve as PCR templates any longer. The heat-labile UNG is inactivated at the same time. Native DNA (e.g., the template DNA) does not contain Uracil and is therefore not degraded by this procedure. UNG is not provided with this kit.



This kit is not intended for clinical diagnostics or testing of human samples.

3. Test Protocol

3.1 Preparation of Sample Material

The preparation of the sample material is explained in the Aqua Screen® *FastExtract* manual.

The extracts can be stored at a temperature of at least -18 °C for a period of one year. Repeated freezing and defrosting, or storage in the refrigerator for more than 12 hours should be avoided. The sample should not contain more than 100 µg/ml DNA.

3.2 Rehydration of the Reagents

1. centrifuge tubes with lyophilized components (5 sec at maximum speed)
2. add 365 µl of Rehydration Buffer to *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. add appropriate amount of deionized, DNA-free water

| | |
|-----------------------------|--------|
| <i>Positive Control DNA</i> | 300 µl |
| <i>Internal Control DNA</i> | 300 µl |
4. incubate for 10 minutes at room temperature
5. vortex and centrifuge again



Keep reagents on ice and store below -18°C after rehydration.

3.3 Experimental Protocols and Result Reading

3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0

Program 1: Pre-incubation

Cycles 1
Analysis Mode None

Temperature Targets [°C] Segment 1

| | |
|------------------------------------|------|
| Target Temperature [°C] | 95 |
| Incubation time [min] | 2:00 |
| Temperature Transition Rate [°C/s] | 20.0 |
| Secondary Target Temperature [°C] | 0 |
| Step Size [°C] | 0.0 |
| Step Delay [Cycles] | 0 |
| Acquisition Mode | None |



The incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95°C. Please see polymerase data sheet for duration.

Program 2: Amplification

Cycles 45
Analysis Mode Quantification

Temperature Targets [°C] Segment 1 Segment 2 Segment 3 Segment 4

| | | | | |
|------------------------------------|------|------|--------|------|
| Target Temperature [°C] | 95 | 55 | 60 | 72 |
| Incubation time [s] | 0 | 5 | 7 | 5 |
| Temperature Transition Rate [°C/s] | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Secondary Target Temperature [°C] | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Step Size [°C] | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Step Delay [Cycles] | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Acquisition Mode | None | None | Single | None |



Segment 3 is essential for the performance of the kit. Do not skip or modify this step.

Program 3: Cooling

Cycles 1
Analysis Mode None

Temperature Targets [°C] Segment 1

| | |
|------------------------------------|------|
| Target Temperature [°C] | 40 |
| Incubation time [s] | 30 |
| Temperature Transition Rate [°C/s] | 20.0 |
| Secondary Target Temperature [°C] | 0 |
| Step Size [°C] | 0.0 |
| Step Delay [Cycles] | 0 |
| Acquisition Mode | None |

Result Reading:

- Select the fluorescence channels F1 and F2 or Channel 1 and Channel 2 at the LC 2.0
- Click on *Quantification* to generate the amplification plots and the specific *ct*-values
- The threshold will be generated automatically.
- Samples showing no significant increase in the amplification plot can be considered as negative.

| target | <i>L. pneumophila</i> | Internal control |
|-------------------------|-----------------------|------------------|
| channel for LC 1.2, 1.5 | F1 (520) | F2 (610) |
| channel for LC 2.0 | channel 1 (520) | channel (610) |

3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)



Program Step 1: Pre-incubation

| | |
|------------------|-------------|
| Setting | Hold |
| Hold Temperature | 95 °C |
| Hold Time | 3 min 0 sec |

Please check the correct settings for the filter combination:

green filter (470-510): *L. pneumophila*

filter orange (585-610): internal control

Program Step 2: Amplification

| | |
|---------------|---|
| Setting | Cycling |
| Cycles | 45 |
| Denaturation | 95°C for 5 sec |
| Annealing | 55°C for 10 sec —> acquiring to Cycling A (green and orange) |
| Elongation | 72°C for 7 sec |
| Gain setting | automatic (auto Gain) |
| Slope Correct | activated |
| Ignore First | deactivated |

Result Reading:

- Open the menu *Analysis*
- Select *Quantitation*
- Check the required filter set (green or orange) according to the following table and start data analysis by double click.
- The following windows will appear:
 - Quantitation Analysis - Cycling A (green or orange)*
 - Quant. Results - Cycling A (green or orange)*
 - Standard Curve - Cycling A (green or orange)*
- In window *Quantitation Analysis*, select first *inear scale* and than *slope correct*
Threshold setup (not applicable if a standard curve was carried with the samples and auto threshold was selected)
 - In window *CT Calculation* set the threshold value to 0-1
 - Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- The *ct*-values can be taken from the window *Quant. Results*.
- Samples showing no *ct*-value can be considered as negative.

3.4 PCR Master Mix Setup

Total volume per reaction is 25 μl . When setting up reactions, calculations should also include positive (PC) and negative controls (NC). Pipet master mix on ice into a 1.5 ml reaction tube and mix gently.

Pipetting scheme:

| | for 1 reaction | for 25 reactions |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|
| primer/probe/nucleotide mix* | 14.0 μl | 350.0 μl |
| Internal Control DNA (yellow cap) | 1.0 μl | 25.0 μl |
| polymerase (5 U/ μl) | 0.2 μl | 5.0 μl |

+ template DNA, NC or PC 10.0 μl

* the equivalent of the content of one red-capped vial

For other polymerase concentrations the amount of enzyme and the amount of water added to the mix need to be adjusted.



The total duration from master mix preparation to PCR cycling must not exceed 60 minutes to avoid a decrease in the fluorescent signal.

Aliquot 15 μl of master mix into each PCR reaction tube. Pipette 10 μl of sample elution buffer or DNA-free water per tube as negative control. Seal the tubes. Add 10 μl of sample per PCR reaction tube. Seal these tubes as well before proceeding with the positive controls or standards. Add 10 μl of the positive control to the remaining tubes as the last step in order to avoid cross contamination.

3.5 Result Interpretation

The presence of *Legionella pneumophila* in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the *Legionella pneumophila* channel during PCR. The concentration of the contaminant can be calculated by a software comparing the crossing cycle number of the sample with a standard curve created in the same run.

A successfully performed PCR without inhibition is indicated by an increasing fluorescence signal in the internal control channel, provided the Internal Control was added to the master mix. *Legionella pneumophila* DNA and Internal Control DNA are competitors in PCR. Because of the very low concentration of Internal Control in the PCR mix, the signal strength in this channel is reduced with increasing *Legionella pneumophila* DNA loads in the sample.

| <i>L.pneumophila</i> PCR | Internal Control | Interpretation |
|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| positive | irrelevant | <i>L. pneumophila</i> positive |
| negative | negative | PCR inhibition |
| negative | positive | <i>L. pneumophila</i> negative |

If a 10 μl test volume is used, then the total quantity of genomic equivalents present in the water sample can be calculated by multiplying the qPCR result by 10 (elution volume of extraction 100 μl).

Example: A 500 ml water sample is used for the analysis. On the basis of the real-time PCR, a result of 60 DNA copies is determined using a test volume of 10 µl. 60 multiplied by 10 totals 600. Result: in 500 ml sample water, there were 600 intact legionella particles (viable culturable, viable but not culturable (VBNC), and dead yet still intact legionella). That results in 120 legionella particles per 100 ml of water.

4. Trouble shooting

Before repeating a negative and a positive control run please check the cycler protocol and pipetting scheme. When using polymerases other than the MB TAQ DNA Polymerase, please note the comments made under chapter 1. The concentration can then be raised up to 2.5 U/reaction. Please note the complete change of the pipetting scheme.

Insufficient (inhibition) or no amplification of the internal control may be due to the following reasons:

- activity of *Taq* polymerase is insufficient or enzyme not compatible with the kit buffer
- programming mistake
- pipetting mistake
- sample elution buffer and sample used to complete the negative control are different

5. Instrument Compatibility

| Instrument | type 1 | type 2 |
|-------------------------|----------------|----------------|
| LightCycler® 1.2 | + ^v | - |
| LightCycler® 1.5 | + | - |
| LightCycler® 2.0 | + | o |
| LightCycler® 480 | + | o |
| Rotorgene 3000 | + | o |
| Rotorgene 6000 (5-plex) | + ^v | o |
| ABI Prism® 7000 | - | + |
| ABI Prism® 7300 | - | + |
| ABI Prism® 7500 | - | + ^v |
| ABI Prism® 7700 | - | + |
| ABI Prism® 7900 | - | + |
| iCycler iQ® | o | o |
| iQ™5 | + | o |
| Opticon 2 | - | o |
| Chromo 4 | o | o |
| MX3000P | o | o |
| MX4000 | o | o |

+ = recommended Kit version
 - = the internal control is not detectable
 o = untested but presumed to be compatible
 v = validated

Appendix

Limited Product Warranty

This warranty limits our liability for replacement of this product. No warranties of any kind, express or implied, including, without limitation, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, are provided. Minerva Biolabs shall have no liability for any direct, indirect, consequential, or incidental damages arising out of the use, the results of use, or the inability to use this product.

Notice to Purchaser

This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction („PCR”) covered by patents owned by Hoffmann-La Roche, Inc., and F. Hoffmann-La Roche Ltd. („Roche”). No license under these patents to use the PCR process is conveyed expressly or by implication to the purchaser of this product. Minerva Biolabs does not encourage or support the unauthorized or unlicensed use of the PCR process. Use of this product is restricted to persons that either have a license to perform PCR or are not required to obtain a license.

Limited License

The use of this product for the detection of Legionella contamination is covered by a Scorpions license from DxS Ltd. Further information on Scorpions licenses can be obtained from DxS Ltd, 48 Grafton St, Manchester, UK M13 9XX.

Trademarks

LightCycler is a registered trademark of a member of the Roche Group. ABI Prism is a registered trademark of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries. Aqua Screen is a registered trademark of Minerva Biolabs.

Related Products

Supplements

| | | |
|---------|-----------------------|-----------|
| 53-0050 | MB TAQ DNA Polymerase | 50 units |
| 53-0100 | MB TAQ DNA Polymerase | 100 units |
| 53-0200 | MB TAQ DNA Polymerase | 200 units |
| 53-0250 | MB TAQ DNA Polymerase | 250 units |

Filtration Unit

| | | |
|---------|-----------------|--------|
| 31-0300 | Filtration Rack | 1 unit |
|---------|-----------------|--------|

Aqua Screen® Fast Extract Kit

| | | |
|---------|----------------|-----------------|
| 32-1010 | Extraction Kit | 10 extractions |
| 32-1050 | Extraction Kit | 50 extractions |
| 32-1200 | Extraction Kit | 200 extractions |

Diagnostic Kits for Conventional PCR

| | | |
|---------|---|-----------|
| 33-1025 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for conv. PCR | 25 tests |
| 33-1100 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for conv. PCR | 100 tests |
| 33-1250 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for conv. PCR | 250 tests |
| 34-1025 | <i>Legionella pneumophila</i> Detection Kit for conv. PCR | 25 tests |
| 34-1100 | <i>Legionella pneumophila</i> Detection Kit for conv. PCR | 100 tests |
| 34-1250 | <i>Legionella pneumophila</i> Detection Kit for conv. PCR | 250 tests |

Diagnostic Kits for qPCR

| | | |
|---------|--|-----------|
| 33-2025 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for qPCR type 1 | 25 tests |
| 33-2100 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for qPCR type 1 | 100 tests |
| 33-2250 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for qPCR type 1 | 250 tests |
| 33-4025 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for qPCR type 2 | 25 tests |
| 33-4100 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for qPCR type 2 | 100 tests |
| 33-4250 | <i>Legionella</i> spp. Detection Kit for qPCR type 2 | 250 tests |
| 34-2025 | <i>L. pneumophila</i> Detection Kit for qPCR type 1 | 25 tests |
| 34-2100 | <i>L. pneumophila</i> Detection Kit for qPCR type 1 | 100 tests |
| 34-2250 | <i>L. pneumophila</i> Detection Kit for qPCR type 1 | 250 tests |
| 34-4025 | <i>L. pneumophila</i> Detection Kit for qPCR type 2 | 25 tests |
| 34-4100 | <i>L. pneumophila</i> Detection Kit for qPCR type 2 | 100 tests |
| 34-4250 | <i>L. pneumophila</i> Detection Kit for qPCR type 2 | 250 tests |

Genomic DNA Extracts 100 µl each

| | | |
|---------|---|--------------------|
| 51-0101 | <i>Legionella pneumophila</i> , ATCC 33152 | +/- 10 ng / 100 µl |
| 51-1514 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> , DSMZ 7514 | +/- 10 ng / 100 µl |
| 51-1515 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pascaliei</i> , DSMZ 7515 | +/- 10 ng / 100 µl |
| 51-1368 | <i>Legionella bozemanii</i> , NC 011368 | +/- 10 ng / 100 µl |
| 51-1370 | <i>Legionella dumoffii</i> , NC 011370 | +/- 10 ng / 100 µl |

Quantification Standards

| | | |
|---------|--|------------------------------|
| 52-0101 | <i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard | 1x10 ⁶ genomes/µl |
|---------|--|------------------------------|

matching funnels

| | | |
|---------|--|------------|
| 31-3050 | 250ml, polycarbonate, for single use, steril | 50 funnels |
|---------|--|------------|