

# Aqua Screen®

## *Legionella spp.* Detection Kit for real-time PCR

### 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	4
3.3.1 LightCycler® I/II	4
3.3.2 SmartCycler® II, Stratagen-Cylcer®	5
3.3.3 ABI Prism® 7500	5
3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)	6
3.5 Auswertung und Interpretation des Testergebnisses	6
3.5.1 Auswertung LightCycler® II	6
3.5.2 Auswertung SmartCycler® II	8
Anlage	20

### Contents

1. Reagents and Materials	11
1.1 Kit Components	11
1.2 Stability and Storage	11
1.3 Supplemental Requirements	11
2. Application and Test Principle	12
3. Test Protocol	12
3.1 Preparation of Sample Material	12
3.2 Rehydration of the Reagents	12
3.3 Experimental Protocol	13
3.3.1 LightCycler® I/II	13
3.3.2 SmartCycler® II, Stratagen-Cylcer®	14
3.3.1 ABI Prism® 7500	14
3.4 The PCR Mastermix	15
3.5 Test Evaluation	15
3.5.1 Evaluation LightCycler® II	16
3.5.2 Evaluation SmartCycler® II	17
Appendix	20

## 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



#### *Internal Control Probe*

Sonde für die Interne Kontrolle, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert

gelber Verschluss



*PCR 10x Reaction Buffer I* für LightCycler I/II, Rotorgene; Smartcycler; Stratagen  
PCR 10x Reaktionspuffer, 500 µl

blauer Verschluss I



*PCR 10x Reaction Buffer II* für ABI Prism® 7500  
PCR 10x Reaktionspuffer, 500 µl

blauer Verschluss II



#### *Positive Control DNA*

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

grüner Verschluss



#### *Internal Control DNA*

Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert

gelber Verschluss



### 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur versendet und müssen bei +2°C bis +8°C gelagert werden. Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* und die *Internal Control Probe* sind lichtgeschützt aufzubewahren. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien sollte vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen, *Primer/Probe/Nucleotide Mix* und die *Internal Control Probe* nach dem Auflösen aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Produktzertifikat (das Produktzertifikat finden Sie auf unserer Webseite) angegebenen Datum haltbar.

### 1.3 Benötigte Geräte und Materialien

real-time PCR Gerät

dem real-time PCR Gerät entsprechende PCR-Reaktionsgefäße

Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen

deionisiertes, DNA-freies Wasser

MB TAQ DNA-Polymerase hot-Start (1 Unit/Test)



**Dieser Kit erzielt exzellente Ergebnisse mit unserer MB TAQ DNA-Polymerase (Cat # 53-0050; 53-0100; 53-0200; 53-250).**

**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. Es kann bei der Verwendung anderer Polymerasen notwendig sein, den mit der Polymerase mitgelieferten Reaktionspuffer zu verwenden.**

## 2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Diese Aqua Screen® PCR Einheit ist ein Testsystem zur quantitativen Detektion von *Legionella spp.* in Wasserproben. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die mitgelieferten Primer sind für einen Abschnitt der 16S rRNA-kodierenden Region des Legionellengenoms spezifisch. Innerhalb des amplifizierten Produktes bindet eine spezifische Sonde, deren Fluoreszenzsignal bei 520 nm die Bildung des Produktes anzeigt. Dem Testkit liegt eine Interne Amplifikationskontrolle bei. Bei einer erfolgreich durchgeführten PCR liefert die Interne Kontrolle ein Signal bei 600 nm. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse, z.B. durch Inhibition ausgeschlossen werden. Das gewählte Template ist innerhalb der Art *Legionella* hochkonserviert. Es werden u.a. die Spezies *L. pneumophila* SG 1-15, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii* und *L. gormanii* detektiert. Kreuzaktivitäten zu anderen 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® Extraktionskits 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 deionisiertem, DNA-freiem Wasser

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	65 µl
<i>Internal Control Probe</i>	65 µl
<i>Positive Control DNA</i>	300 µl
<i>Internal Control DNA</i>	300 µl
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. DNA kurz vortexen und anzentrifugieren



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

### 3.3 Programmierung

#### 3.3.1 LightCycler® I/II

Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen	1
Analysemodus	None
<b>Temperaturprofil [°C]</b>	<b>Segment 1</b>
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	Quantification			
<b>Temperaturprofil [°C]</b>	<b>Segment 1</b>	<b>Segment 2</b>	<b>Segment 3</b>	<b>Segment 4</b>
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
<b>Temperaturprofil [°C]</b>	<b>Segment 1</b>
Zieltemperatur [°C]	40
Inkubationszeit [s]	30
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0
Temperaturschritte [°C]	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0
Fluoreszenzmessung	None

### 3.3.2 SmartCycler® II, Stratagen-Cycler®

#### Detektor Einstellungen:

für die Ziel-DNA Sonde: Reporter - FAM  
Quencher - none

für die Interne Kontroll-Sonde: Reporter - ROX/Texas Red  
Quencher - none



**Die ROX-Referenz-Funktion muss ausgeschaltet sein. Beide Detektoren müssen für jedes verwendete Reaktionsgefäß aktiviert werden.**

#### Zeiten und Temperaturen:

Polymeraseaktivierung <small>(Dauer muss der verwendeten Polymerase angepasst werden)</small>	für 40 Zyklen		
	Denaturierung	Annealing	Extention
HOLD	CYCLE		
2 min 95°C Optik aus	30 sek 95°C Optik aus	30 sek 60°C Optik ein	30 sek 72°C Optik au

### 3.3.1 z.B. ABI 7500

Polymeraseaktivierung: 2 min bei 95°C,

PCR: 45 Zyklen

95°C: 30 sec

55°C: 30 sec

60°C: 45 sec und Fluoreszenzmessung



**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.**

### 3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion beträgt 25  $\mu\text{l}$ . Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt werden. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und vorsichtig gemischt.

#### Pipettierschema:

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen*
Wasser	9,8 $\mu\text{l}$	245,0 $\mu\text{l}$
10x Reaction Buffer I oder II (blauer Deckel)	2,5 $\mu\text{l}$	62,5 $\mu\text{l}$
Primer/Probe/Nucleotide Mix (roter Deckel)	2,5 $\mu\text{l}$	62,5 $\mu\text{l}$
Internal Control DNA (gelber Deckel)	2,5 $\mu\text{l}$	62,5 $\mu\text{l}$
Internal Control Probe (gelber Deckel)	2,5 $\mu\text{l}$	62,5 $\mu\text{l}$
Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{l}$	5,0 $\mu\text{l}$

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

Für andere Enzymkonzentrationen muss die Verdünnung entsprechend angepasst werden.



**Der Mastermix ist auf Eis zu pipettieren. Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR dürfen nicht mehr als 45 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommt.**

Der Mastermix wird á 20  $\mu\text{l}$  auf die PCR-ReaktionsgefäÙe verteilt und mit 5  $\mu\text{l}$  deionisiertem Wasser oder Elutionspuffer der DNA-Extraktion als Negativkontrolle, bzw. 5  $\mu\text{l}$  Probe oder 5  $\mu\text{l}$  Positivkontrolle versetzt. Diese Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die ReaktionsgefäÙe nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden.

Der Ansatz wird kurz zentrifugiert, die ReaktionsgefäÙe in den Thermocycler gestellt und das Thermocycler-Programm gestartet.

### 3.5 Auswertung und Interpretation des Testergebnisses

#### 3.5.1 LightCycler II

Die Analyse der erhaltenen Daten ist in zwei Bereiche aufgeteilt

- die quantitative Analyse unter Verwendung der Quantifizierungssoftware der Legionellen-DNA in Fluoreszenzkanal F1 bzw. des FAM-Signals
- die quantitative Analyse unter Verwendung der Quantifizierungssoftware der Internen Kontroll-DNA in Fluoreszenzkanal F2, bzw. des ROX-Signals

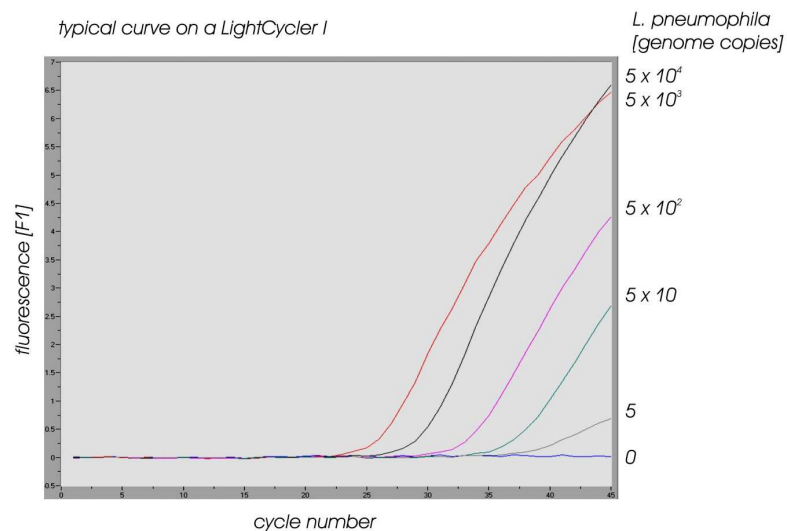
Die folgenden Amplifikationskurven wurden bei der Durchführung des Testsystems mit einer Verdünnungsreihe von *Legionella pneumophila* Quantifizierungsstandard (Bestell-Nr. 52-0101) mit dem LightCycler<sup>®</sup> erhalten. Es werden die Fluoreszenzwerte gegen die Zyklanzahl aufgetragen. Geichzeitig wurde die Amplifikation der Internen Kontrolle in Kanal F2 verfolgt.

Die Signale der Internen Kontrolle sind im Kanal 610 nm schwach sichtbar. Für eine bessere Darstellung der Signale wählen Sie bitte folgende Vorgehensweise:

- „Select channel 610“
- „Select channel denominator 530“
- Klicken Sie mit der rechten Maustaste die Y-Achse an und wählen „chart preference“, um die Skalierung der Achse zu ändern
- „Y-automatic“ bitte deaktivieren und 0-2 einstellen
- zum Schluss bitte die Änderungen mit „safe“ bestätigen

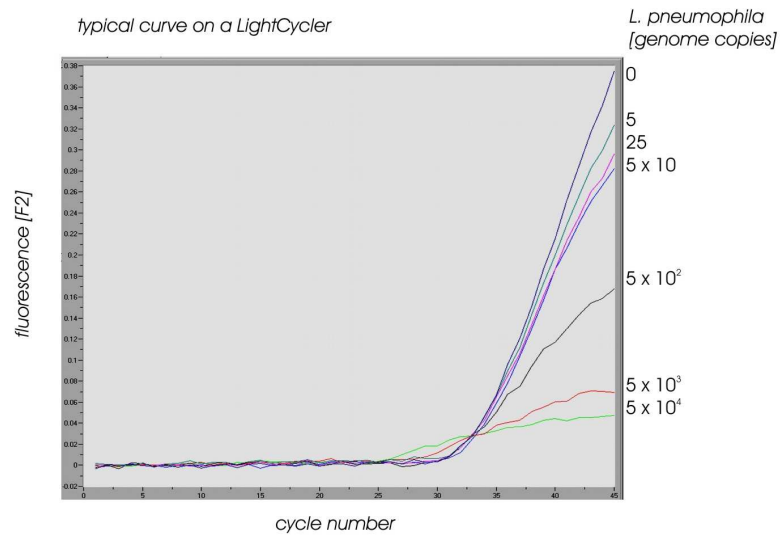
**Folgende Ergebnisse werden sichtbar:**

Negativkontrolle und Negativproben haben ein ansteigendes Fluoreszenzsignal zwischen Ct 31-35. Positivkontrolle und positive Proben haben ein abnehmendes Fluoreszenzsignal (nur in dieser Darstellungsweise). Inhibierte Probe haben kein ansteigendes und kein abnehmendes Fluoreszenzsignal, bitte führen sie eine DNA-Extraktion durch.



Amplifikation der Verdünnungsreihe mit ca.  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$ , 50 und 5 Genomäquivalenten pro PCR-Ansatz. Die Messung erfolgte in Fluoreszenzkanal F1.

Die Amplifikation von Legionellen-spezifischer DNA wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals in Kanal F1 angezeigt. Bei Mitführen einer Standardverdünnungsreihe von genomischer Legionellen-DNA kann die Konzentration an Legionellen in der Probe berechnet werden. Liegt keine PCR-Inhibition vor, wird bei Verwendung der Internen Kontrolle eine fehlerfreie PCR durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals in Kanal F2 angezeigt. Die Interne Kontrolle ist so gering dosiert, dass sie bei großen Mengen an Legionellen-DNA nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das Signal in Kanal F1 erkennbar.



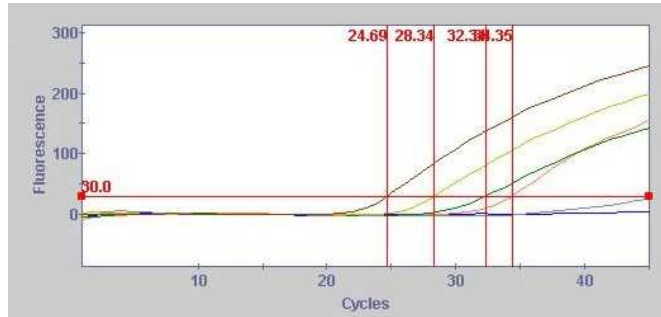
Die selben Proben ergeben folgende Amplifikation der Internen Kontroll-DNA in Abhängigkeit von einer Verdünnungsreihe mit ca.  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 50, 25 und 5 Genomäquivalenten pro PCR-Ansatz. Die Messung erfolgte in Fluoreszenzkanal F2.

### 3.5.2 SmartCycler® II

Die Analyse der erhaltenen Daten ist in zwei Bereiche aufgeteilt

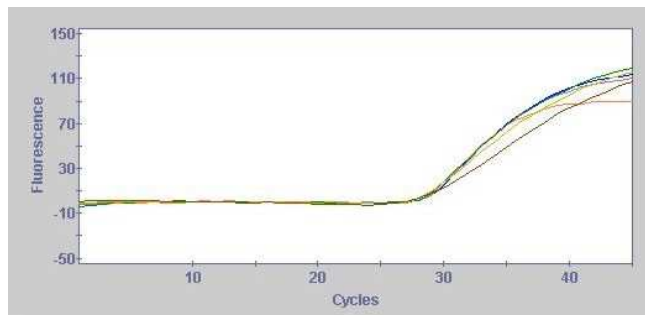
- die quantitative Analyse des FAM-Signals unter Verwendung der Quantifizierungssoftware zur Bestimmung der Konzentration detektierter Legionellen-DNA
- die qualitative Analyse des ROX-Signals des Internen Kontroll-Systems (Amplifikationskontrolle)

Die folgenden Amplifikationskurven wurden bei der Durchführung des Testsystems mit einer Verdünnungsreihe von *Legionella pneumophila* Quantifizierungsstandard (Bestell-Nr. 52-0101) mit dem SmartCycler®II erhalten. Es werden die Fluoreszenzwerte gegen die Zyklanzahl aufgetragen.



Amplifikation der Verdünnungsreihe mit ca.  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 und 1 Genomäquivalenten von *Legionella pneumophila* pro PCR-Ansatz.

Gleichzeitig wurde die Amplifikation der Internen Kontrolle verfolgt.



Amplifizierung der Internen Kontroll-DNA in Abhängigkeit von einer Verdünnungsreihe mit ca.  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 und 1 Genomäquivalenten von *Legionella pneumophila* pro PCR-Ansatz.

Eine Legionellenkontamination wird durch einen Anstieg des FAM-Fluoreszenzsignals angezeigt. Bei Mitführen einer Standardverdünnungsreihe von genomischer Legionellen-DNA kann die Konzentration der Legionellen in der Probe berechnet werden. Liegt keine PCR-Inhibition vor, wird bei Verwendung der Internen Kontrolle eine fehlerfreie PCR durch einen Anstieg des ROX-Fluoreszenzsignals angezeigt. Die Interne Kontrolle ist so gering dosiert, dass sie bei großen Mengen an Legionellen-DNA nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das FAM-Signal erkennbar.

Werden 5  $\mu$ l Testvolumen verwendet, so wird für die Berechnung die Gesamtmenge an Genomäquivalenten in der verwendeten Wasserprobe, das Ergebnis der real-time PCR mit 20 multipliziert (bezogen auf 100  $\mu$ l Eluat).

Beispiel: 500 ml Probenwasser werden für die Untersuchung verwendet. Anhand der real-time PCR wird ein Ergebnis von 30 DNA-Kopien in einem Testvolumen von 5  $\mu$ l ermittelt. 30 mal 20 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.

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

- Aktivität der verwendeten Polymerase nicht ausreichend
- Kontroll-DNA enthaltende Röhrchen wurden vor Rehydratisierung nicht herunter zentrifugiert
- Programmierfehler
- Pipettierfehler
- Inhibition des Probenmaterials (wenn nicht mit Aqua Screen extrahiert)

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 1.3 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.

## NOTIZEN

## 1. Reagents and Materials

### 1.1 Test Kit Components

Instruction manual

*Primer/Probe/Nucleotide Mix*

primer set, probe and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized

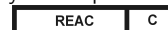
red cap



*Internal Control Probe*

probe, aliquoted for 25 reactions, lyophilized

yellow cap



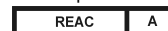
*PCR 10x Reaction Buffer I* for LightCycler I/II; Rotorgene; Smartcycler; Stratagene  
500 µl

blue cap I



*PCR 10x Reaction Buffer II* for ABI Prism® 7500  
500 µl

blue cap II



*Positive control DNA*

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

green cap



*Internal control DNA*

Plasmid DNA, non-infectious, lyophilized

yellow cap



### 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*, the *Internal Control Probe*, the *Positive Control* and the *Internal Control*, store below -18°C and avoid repeated freezing and thawing. Protect the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* and *Internal Control Probe* from light. For repeated testing of low sample numbers, *Primer/Probe/Nucleotide Mix*, *Internal Control Probe* and controls should be aliquoted after rehydration. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the Guarantee Certificate (please find the Certificate on our website).

### 1.3 Supplemental Requirements

real-time PCR Thermocycler

vials required for the particular thermal cycler used

micro centrifuge, micropipettes and filtered tips

deionized, DNA-free water

MB TAQ DNA Polymerase hot-Start



**The test provides excellent results with MB TAQ DNA-Polymerase (Cat # 53-0050; 53-0100; 53-200; 53-0250).**

**Note: 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). However, if you want to use your own polymerase, it may be necessary to use the specific buffer provided with this polymerase.**

## 2. Application and Test Principle

The Aqua Screen® PCR kit is a test for the quantitative detection of *Legionella spp.* in water samples. The test is based on the polymerase chain reaction. The supplied primer set is specific for a segment of the 16S rRNA region of the *Legionella* genome. The target probe emits fluorescent light at 520 nm. By using the supplied internal control, false-negative results (e.g. due to inhibition of the reaction by the sample matrix) can be excluded individually for each sample. The internal control is detected by another probe emitting fluorescent light at 600 nm. Detailed studies confirm the high specificity and sensitivity of Aqua Screen®. The selected template is highly preserved within the *Legionella* species. Clinically relevant species being detected are e.g. *L. pneumophila* SG 1-15, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii* and *L. gormanii*. Cross activity with other species typical for water contamination is not known. The detection limit is 10 genome equivalents per 5 µl sample volume.

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® extraction kit 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 appropriate amount of deionized, DNA-free water

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	65 µl
<i>Internal Control Probe</i>	65 µl
<i>Positive Control DNA</i>	300 µl
<i>Internal Control DNA</i>	300 µl
3. incubate for 5 minutes at room temperature
4. vortex and centrifuge again



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

### 3.3 Experimental Protocol

#### 3.3.1 LightCycler® I/II

Program 1: Pre-incubation

Cycles	1
Analysis Mode	None
<b>Temperature Targets [°C]</b>	<b>Segment 1</b>
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			
<b>Temperature Targets [°C]</b>	<b>Segment 1</b>	<b>Segment 2</b>	<b>Segment 3</b>	<b>Segment 4</b>
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
<b>Temperature Targets [°C]</b>	<b>Segment 1</b>
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

### 3.3.1 SmartCycler® II, Stratagene-Cycler®

#### Detector Settings:

Target Probe: Reporter - FAM  
Quencher - none

Internal Control Probe: Reporter - ROX/Texas Red  
Quencher - none

**The ROX Reference needs to be disabled. Activate both detectors for each well.**

#### Program:

Polymerase Activation (Duration depends on the polymerase used)	each of 40 cycles		
	Denature	Anneal	Extend
HOLD	CYCLE		
2 min	30 sec	30 sec	30 sec
95°C	95°C	60°C	72°C
optics off	optics off	optics on	optics off

### 3.3.2 e.g. ABI Prism® 7500

Polymerase Activation: 2 min 95°C,

PCR: 45 Cycles

95°C: 30 sec

55°C: 30 sec

60°C: 45 sec Fluorescence measurement



**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.**

### 3.4 The PCR Master mix

Total volume per reaction is 25  $\mu$ l. When setting up reactions, calculations should also include positive and negative controls.

Pipet master mix on ice into a 1.5 ml reaction tube and mix gently.

Pipetting schemes:

	for 1 reaction	for 25 reactions*
water	9.8 $\mu$ l	245.0 $\mu$ l
10x reaction buffer I or II (blue cap)	2.5 $\mu$ l	62.5 $\mu$ l
primer/probe/nucleotide mix (red cap)	2.5 $\mu$ l	62.5 $\mu$ l
internal control probe (yellow cap)	2.5 $\mu$ l	62.5 $\mu$ l
internal control DNA (yellow cap)	2.5 $\mu$ l	62.5 $\mu$ l
polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l	5.0 $\mu$ l

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

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

Aliquot 20  $\mu$ l of master mix into each PCR reaction tube.



**Keep the master mix on ice while proceeding with the samples. The total duration from master mix preparation to PCR cycling must not exceed 45 minutes to avoid a decrease in the fluorescent signal.**

Add 5  $\mu$ l of sample (as described above) to PCR reaction tube per sample being tested. After pipetting the negative control, the tube must be sealed before proceeding with the samples. Also pipetting of the samples and sealing the tubes must be completed before proceeding with the positive control in order to avoid cross contamination.

### 3.5 Test Evaluation

The analysis of the obtained data is divided into two parts:

- quantitative analysis of Legionella DNA in fluorescence channel F1 or FAM-specific signal
- qualitative analysis of Internal Control DNA in fluorescence channel F2 or ROX-specific signal

The following amplification curves were obtained by performing the described procedure with a dilution series of *Legionella pneumophila* Quantification Standard (Cat no. 52-0101) and the *LightCycler*<sup>®</sup> 1 / II instrument. The fluorescence values versus cycle number are displayed. In the same run the amplification of Internal Control DNA was shown in channel F2.

### 3.5.1 Data analysis with LightCycler® II

The internal control signals are weakly visible in channel 610 nm. Please use the following procedure to a better presentation:

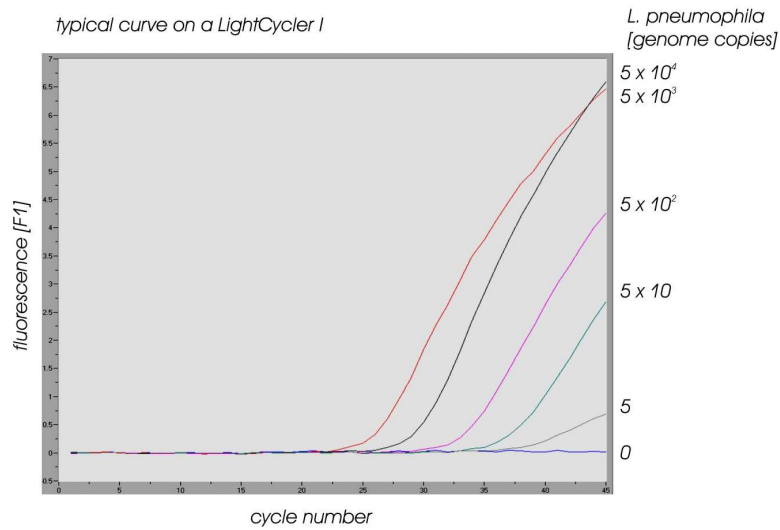
- „Select channel 610 nm“
- „Select channel denominator 530“
- single click the Y-axis with the right mouse button and choose chart preference to change the scale of the axis
- deselect „Y-automatic“ and fill in 0-2
- at last please save your changes with „save“

#### Please look at the results:

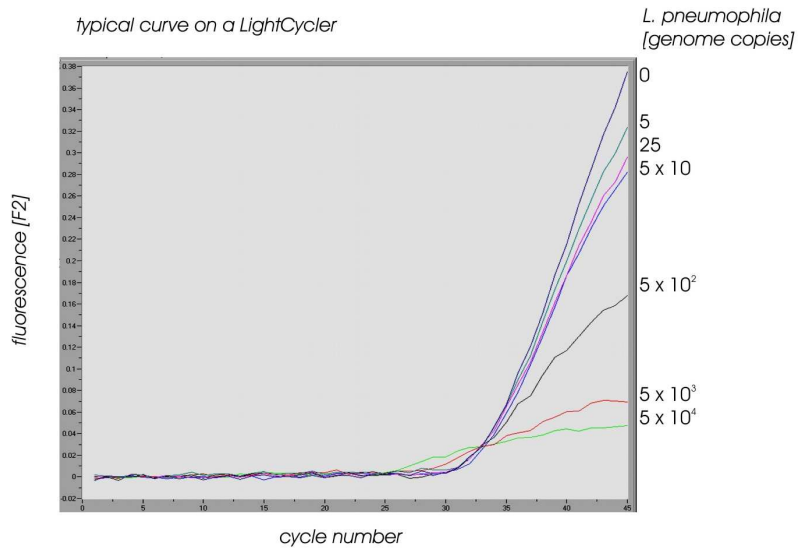
negative control and negative samples: increase of fluorescence between crossing threshold 31-35

positive control and positive sample: decrease of fluorescence (only in this mode)

inhibited samples: no in- or decrease of fluorescence, PCR is inhibited, please carry out DNA extraction and analyse again.



Amplified dilution series of approx.  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$ , 50 and 5 genome equivalents as starting template. As a negative control, the template DNA was replaced with PCR-grade water. The fluorescence channel was set to F1.



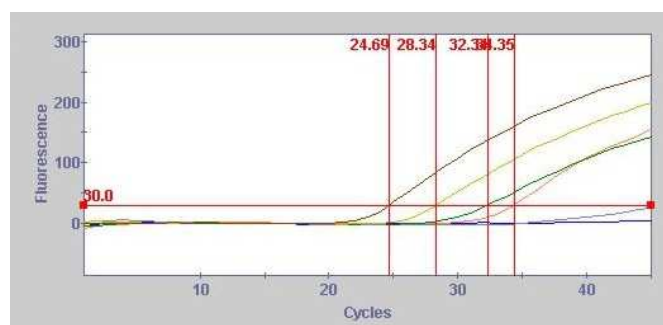
Same run, same samples as shown above. In this figure the amplification of the internal control is shown. The fluorescence channel was set to F2.

### 3.5.2 SmartCycler® II

The analysis of the obtained data is divided into two parts:

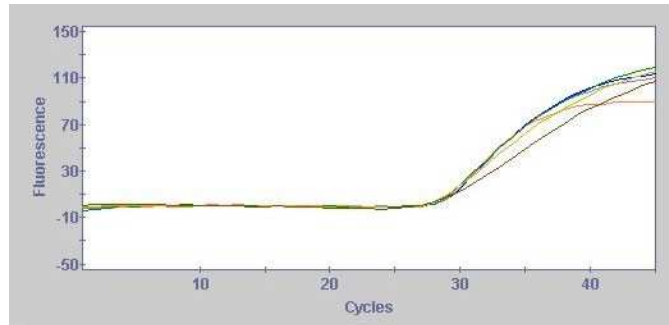
- quantitative analysis of the FAM-Signal of Legionella DNA
- qualitative analysis of the ROX-Signal of Internal Control DNA

The following amplification curves were obtained by performing the described procedure with a dilution series of *Legionella pneumophila* Quantification Standard (Cat no. 52-0101) and the SmartCycler® II instrument. The fluorescence values versus cycle number are displayed.



Amplified dilution series of approx.  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 and 1 genome equivalents of *Legionella pneumophila* as starting template. As a negative control, the template DNA was replaced with PCR-grade water.

In the same run the amplification of Internal Control DNA was observed.



Amplified Internal Control DNA and a dilution series of *Legionella pneumophila* as starting template. As a negative control, the *Legionella* DNA was replaced with PCR-grade water

A legionella contamination is indicated by an increasing fluorescence signal in channel F1 during PCR. With the use of titrated DNA standard (Cat. no. 52-0101), the quantity of legionella DNA can be determined. If a 5  $\mu$ l test volume is used, then the total quantity of genomic equivalents present in the water sample can be calculated by multiplying the real-time PCR result by 20 (elution volume of extraction 100  $\mu$ l).

Example: A 500 ml water sample is used for the analysis. On the basis of the real-time PCR, a result of 30 DNA copies is determined using a test volume of 5  $\mu$ l. 30 multiplied by 20 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.

No amplification of control DNA may be due to the following reasons:

- activity of polymerase is insufficient
- control DNA tubes have not been spun down before rehydration
- programming mistake
- pipetting mistake
- Inhibition of sample material (if samples were not extracted with Aqua Screen)

Before rerun of a negative and a positive control please check thermocycler protocol and pipetting scheme. When using polymerases other than the *MB TAQ* DNA Polymerase, please note the comments made under chapter 1.3. The concentration can then be raised up to 2.5 U/reaction. Please note the complete change of the pipetting scheme.

NOTES

## **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.

## Minerva Biolab's International Aqua Screen® Distributors

### Belgium, Luxemburg

Lucron Bioproducts  
Tel.: +32 (92) 820531  
Fax: +32 (92) 820532  
E-mail: info@lucronbioproducts.com  
Web: www.lucronbioproducts.com

### Finland

Immuno Diagnostic Oy  
Tel: +358 3 615 370  
Fax: +358 3 682 2039  
Email: info@immunodiagnostic.fi  
Web: www.immunodiagnostic.fi

### France

AES Chemunex  
Tel: +33 2 23 50 12 12  
Fax: +33 2 23 50 12 00  
Email: contact@aeschemunex.com  
Web: www.aeschemunex.com

### Greece

Bioanalytica S.A.  
Tel: +30 210 6400 318  
Fax: +30 210 6462 748  
Email: bioanalyt@hol.gr  
Web: www.bioanalytica.gr

### Germany

Mast Diagnostica GmbH  
Tel: +49 4533 2007 0  
Fax: +49 4533 2007 68  
Email: verkauf@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

### Great Britain

Cambio Ltd.  
Tel: +44 1954 210 200  
Fax: +44 1954 210 300  
Email: support@cambio.co.uk  
Web: www.cambio.co.uk

### India

Zelle Biotechnology Pvt. Ltd.  
Tel: +91 22 2685 87 41  
Fax: +91 22 2685 87 44  
Email: anurag@zellebiotech.com

### Ireland

Medical Supply Company  
Tel: +353 1 8224 222  
Fax: +323 1 8224 100  
Email: dmcglade@medical-supply.ie  
Web: www.medical-supply.ie

### Israel

NBT New Biotechnology Ltd.  
Tel: +972 2 673 2001  
Fax: +972 2 673 1611  
Email: nbtsales@nbtld.com

### Italy

Biospa  
Tel: +39 2 891 391  
Fax: +39 2 891 20996  
Email: biospa@spaspa.it  
Web: www.spaspa.it/biospa.htm

### Japan

Funakoshi Co. Ltd.  
Tel: +81 3 5684 1615  
Fax: +81 3 5684 1775  
Email: info@funakoshi.co.jp  
Web: www.funakoshi.co.jp

### Korea

Bio and Information Corp  
Tel: +82 31 7139 439  
Fax: +82 31 7139 438  
Email: sales@bioninfo.com  
Web: www.bioninfo.com

### Lithuania

Interlux  
Tel: +370 5 27 86 850  
Fax: +370 5 27 96 728  
Email: marius@interlux.lt  
Web: www.interlux.lt

### Netherlands

Lucron Bioproducts B.V.  
Tel: +31 485 51 16 75  
Fax: +31 485 51 20 52  
Email: lucron@lucron.nl  
Web: www.lucron.nl

### Norway

E. Pedersen & Son  
Tel: +47 22 95 59 59  
Fax: +47 22 95 59 40  
Email: eped@eped.com  
Web: www.eped.com

### Portugal

Quilaban Lda.  
Tel: +21 923 63 50  
Fax: +21 923 63 89  
Email: quilaban@quilaban.pt  
Web: www.quilaban.pt

### Spain

LabClinics S.A.  
Tel: +34 3 446 47 00  
Fax: +34 3 348 10 39  
Email: info@labclinics.com  
Web: www.labclinics.com

### Sweden

ANL-Produkter AB  
Tel: +46 8 99 00 90  
Fax: +46 8 99 20 40  
Email: info@anl.se  
Web: www.anl.se

### Switzerland

Socochim SA  
Tel: +41 21 721 04 50  
Fax: +41 21 721 04 51  
Email: info@socochim.ch  
Web: www.socochim.ch

### Turkey

Genomed Saglik Hizmetleri A.S.  
Tel: +90 212 248 20 00  
Fax: +90 212 220 15 64  
Email: muratyazici@genomedtr.com  
Web: www.genomed-biotech.com

## 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
35-1025	Aqua Screen® Cleaner, spray bottle	250 ml
35-1200	Aqua Screen® Cleaner, refill bottles	4 x 500 ml

### Filtration Unit

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

### Extraction Unit

32-0150	Extraction Kit	15 extractions
32-0500	Extraction Kit	50 extractions
32-2000	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 Real-Time PCR

33-2025	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for real-time PCR	25 tests
33-2100	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for real-time PCR	100 tests
33-2250	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for real-time PCR	250 tests
33-5025	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for real-time PCR (AFNOR XP T90-471)	25 tests
33-5100	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for real-time PCR (AFNOR XP T90-471)	100 tests
33-5250	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for real-time PCR (AFNOR XP T90-471)	250 tests
34-2025	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit for real-time PCR	25 tests
34-2100	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit for real-time PCR	100 tests
34-2250	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit for real-time PCR	250 tests
34-5025	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit for real-time PCR (AFNOR XP T90-471)	25 tests
34-5100	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit for real-time PCR (AFNOR XP T90-471)	100 tests
34-5250	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit for real-time PCR (AFNOR XP T90-471)	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>pascullei</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 Quantification Standard	1x10 <sup>6</sup> genomes/µl
---------	---	------------------------------

**Spare parts**

35-0100	Glass funnel, 1000 ml capacity	1 unit
35-0110	Adapter	3 units
35-0120	Membrane filter holder	3 units
35-0130	Stopper	2x10 units
35-0140	Funnel-syringe	3 units

