

# Onar®Ls

## ***Legionella* spp. Detection Kit for conventional 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	4
3.1 Gewinnung des Probenmaterials	4
3.2 Rehydratisierung der Reagenzien	4
3.3 Programmierung des Thermocyclers	5
3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)	5
3.5 Agarosegel-Lauf	6
3.6 Gelauswertung	6
Anlage	14

### **Contents**

1. Reagents and Materials	8
1.1 Testkit 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	10
3.3 Thermal Profile	10
3.4 The PCR Mastermix	11
3.5 Agarose Gel Run	11
3.6 Gel Evaluation	11
Appendix	14

## 1. Reagenzien und Materialien

### 1.1 Inhalt der Packung

Arbeitsanleitung

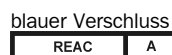
#### *Primer/Nucleotide Mix*

Lyophilisierte Primer und Desoxynukleotidtriphosphate  
dATP, dCTP, dGTP und dUTP; portioniert für 25 Tests



#### *PCR reaction buffer*

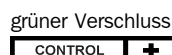
10x PCR Reaktionspuffer, 740 µl



100 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub>

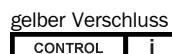
#### *Positive Control DNA*

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



#### *Internal Control DNA*

Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert



### 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien können bei Raumtemperatur versendet und bei +2°C - +8°C gelagert werden. Nach Aufnahme der lyophilisierten *Primer/Nukleotide*, der *Positive Control DNA* und der *Internal Control DNA* in Wasser ist der Kit unbedingt bei mindestens -18°C aufzubewahren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der hydratisierten Reagenzien sollte vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen und der *Primer/Nukleotide Mix* nach dem Auflösen aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im *Guarantee Certificate* angegebenen Datum haltbar.

### 1.3 Benötigte Geräte und Materialien

PCR-Thermocycler mit Heizdeckel

0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße

DNA-Elektrophoreseapparat und Materialien zur Agarosegel-Elektrophorese

Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen

deionisiertes, DNA-freies Wasser

DNA-Polymerase



**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

*Legionella spp.* kommen ubiquitär in Oberflächenwasser und feuchtem Boden vor und sind als opportunistische Krankheitserreger der Atemwege bekannt. Die Übertragung erfolgt aerogen. Typische Symptome der Legionellose sind hohes Fieber, Husten, Thoraxschmerzen, Diarrhoe, Verwirrtheit mit zum Teil schweren Verlaufsformen. Als Pontiac-Fieber wird die erstmals in Pontiac (USA) vorgekommene schwächere Form der Legionellose mit grippalen Symptomen bezeichnet.

Onar<sup>®</sup>Ls ist ein *in vitro*-Testsystem zur qualitativen Diagnostik von *Legionella spp.* in klinischen Proben. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die mitgelieferten Primer sind für einen Abschnitt der 16S rRNA-kodierenden Region des Legionellengenoms spezifisch. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von 245 bp und kann direkt im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Das Testsystem beinhaltet außerdem eine interne Kontrolle, welche im PCR-Ansatz mitgeführt werden kann. Die interne Kontrolle liefert bei einer erfolgreich durchgeführten PCR im Agarosegel ein Produkt in einer Größe von 150 bp. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse, z.B. durch Inhibition ausgeschlossen werden.

Der direkte Nachweis von *Legionella spp.* ist innerhalb von 2-3 Stunden möglich. Die Testkits wurden unter dem Aspekt einer hohen Praktikabilität und einer einfachen Handhabung konzipiert. Dadurch wird eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Tests ermöglicht. Klinische Studien belegen die hohe Spezifität und Sensitivität von Onar<sup>®</sup>Ls. Das gewählte Template ist innerhalb der Spezies *Legionella* hochkonserviert. Es werden u.a. die klinisch relevanten Spezies *L. pneumophila* SG 1-15, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii* und *L. gormanii* detektiert. Kreuzaktivitäten zu Kommensalen des Rachenraumes und anderen Krankheitserregern in den Atemwegen, z.B. Bordetellen, Chlamydien, Mycoplasmen, Mykobakterien, Pseudomonaden und Streptokokken sind nicht bekannt. Das Detektionslimit liegt bei 6 Genomäquivalenten pro 5 µl Probenvolumen. Durch den breiten linearen Messbereich sind mit Onar<sup>®</sup>Ls zuverlässige Ergebnisse ohne eine zeitaufwendige Konditionierung des Probenmaterials möglich. Die Proben sind im Vergleich zum Antigentest deutlich stabiler.

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. Dabei werden unerwünschte PCR-Vorlagen 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. Der *Primer/Nucleotide Mix* enthält serienmäßig dUTP statt dTTP.

### 3. Durchführung

#### 3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Als Untersuchungsmaterialien können Nasopharyngealabstriche, Nasen- und Rachensekrete, Sputum, provoziertes Sputum, Bronchiallavage, infizierte Zellen (Zellkulturen) und Agarkulturen verwendet werden. Die Qualität der Probenahme beeinflusst in starkem Maße die Zuverlässigkeit der Testbefunde. Material aus den unteren Atemwegen ist für den Nachweis von *Legionella* besonders gut geeignet.

Beim Nasopharyngealsekret bietet sich die Verwendung eines dünnen Katheters und einer Vakuumpumpe mit Sekretfalle an. Die Mundhöhle kann vorab gespült und Speichel sowie Spülwasser verworfen werden. Bei einer Entnahme aus der Mundhöhle sollte vorher nicht gegessen oder gegurgelt werden. Der Tupfer wird hinter den Gaumenbögen nach oben gedreht und abgestrichen. Bei einer Entnahme über die Nasenhöhle wird der dünne Tupfer bis in den Nasopharynx geschoben und mehrfach abgestrichen. Dabei ist darauf zu achten, dass ausreichend Material entnommen wird. Anschließend wird der Tupfer in 1 ml Transferpuffer (z.B. 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% Natriumazid, 5% Natriumdodecylsulfat) ausgewaschen. Das Probenmaterial ist so für einige Zeit gekühlt stabil und sollte nach Möglichkeit gekühlt transportiert werden.

Zur Probenvorbereitung ist grundsätzlich eine DNA-Extraktion mit einem handelsüblichen DNA-Extraktionskit (z.B. QIAamp®, Qiagen) empfehlenswert, um Inhibitoren der PCR sicher zu entfernen und eine Konzentrierung der Legionellen-DNA bei größeren Probenvolumina zu erreichen. Der erhaltene DNA-Extrakt kann direkt für die Onar®*LS*-Diagnostik eingesetzt werden.

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 13.000 Umdrehungen/min zentrifugieren
2. Zugabe von deionisiertem, DNA-freiem Wasser

Primer/Nukleotid-Gemisch (je Portion á 25 Tests):	65 µl
Positivkontrolle:	300 µl
Interne Kontrolle:	300 µl
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. kurz vortexen, erneut für 5 Sekunden bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugieren



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

### 3.3 Programmierung des Thermocyclers

Die Durchführung der Programmierung Ihres Cyclers entnehmen Sie bitte dem Handbuch des Gerätes. Je nach Aufheizschnelligkeit Ihres Gerätes können Sie zwischen dem normalen und dem Kurzprogramm für Ihren Cycler wählen.

#### Programm:

1 Zyklus            94°C für 2 min  
35 Zyklen         94°C für 30 sec  
                      55°C für 30 sec  
                      72°C für 30 sec

auf 4 bis 8 °C abkühlen



**Die Dauer der Vorinkubation bei 94°C ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Bei 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 µl. Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt werden.

Der Mastermix wird auf Eis in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und vorsichtig gemischt.

Pipettierschema:

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen*
Wasser	12,3 µl	307,5 µl
10x Reaktionspuffer (blauer Deckel)	2,5 µl	62,5 µl
Primer/Nucleotid Mix (roter Deckel)	2,5 µl	62,5 µl
Interne Kontrolle (gelber Deckel)	2,5 µl	62,5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	5,0 µl

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

Für andere Enzymkonzentrationen muss die Verdünnung entsprechend angepasst werden.

Der Mastermix wird á 20 µl auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit 5 µl deionisiertem Wasser oder Elutionspuffer der DNA-Extraktion als Negativkontrolle, bzw. 5 µl Probe oder 5 µl Positivkontrolle (grüner Deckel) versetzt. Diese Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden.

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert, die Reaktionsgefäße in den Block des Thermocyclers gestellt und das Thermocycler-Programm gestartet.

### 3.5 Agarosegel-Lauf

- 1,5 %iges Standard-Agarosegel mit 5 mm-Kamm. Zur Verbesserung der Sensitivität sollte das Gel so dünn wie möglich gegossen werden.
- 5 µl jedes PCR-Reaktionsansatzes, gemischt mit Brom-Phenolblau-Ladepuffer, pro Bahn auftragen



**Es sollte nur Brom-Phenolblau in geringer Konzentration als Laufmarker verwendet werden.**

- Elektrophorese nach 2 cm Wegstrecke stoppen (je nach Elektrophoresekammer z.B. nach 20 Minuten bei 100 V)

### 3.6 Gelauswertung

Bei Verwendung der Internen Kontrolle wird eine fehlerfreie PCR durch eine Bande bei 150 bp angezeigt. Bei Zunahme der Konzentration an Legionellen-DNA ( $> 5 \times 10^6$  Partikel/ml) nimmt die Intensität der Internen Kontrolle durch die übermäßige Bildung des Legionellen-Amplikons ab.

#### Relevante Amplikongrößen:

Interne Kontrolle	150 bp
<i>Legionella sp.</i>	245 bp

#### Ergebnisse einer erfolgreichen PCR:

PCR-Ansatz	Bandenmuster
Negativkontrolle	Bande bei 150 bp
Positivkontrolle	Bande bei 245 bp, aber auch zusätzliche Bande bei 150 bp möglich

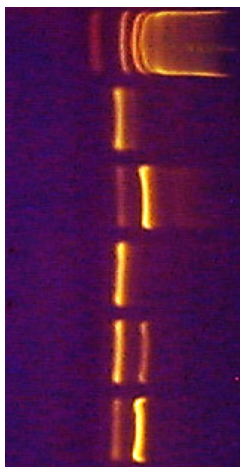
Findet bei den Kontrollansätzen keine Amplifikation statt, kann dies folgende Ursachen haben:

- Aktivität der verwendeten Polymerase nicht ausreichend
- Kontroll-DNA enthaltende Röhrchen wurden vor Rehydratisierung nicht herunter zentrifugiert
- Programmierfehler
- Pipettierfehler

Zur Fehleranalyse sollten zuerst das Thermocycler-Programm sowie das Pipettierschema überprüft werden. Anschließend empfiehlt sich die Durchführung von Probeläufen bestehend aus 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.

Interpretation möglicher Bandenmuster der Proben:

<b>Bandenmuster Interpretation</b>	
Bande bei 150 bp	negative Probe
Bande bei ca. 245 bp, mit zusätzlicher Bande bei 150 bp	<i>Legionella</i> -positive Probe mit schwacher Infektion
starke Bande bei ca. 245 bp	<i>Legionella</i> -positive Probe mit starker Infektion
keine Bande	Inhibition der PCR durch Bestandteile in der Probe



100 bp DNA Leiter

Negativkontrolle mit interner Kontrolle

Positivkontrolle mit interner Kontrolle

negative Probe

positive Probe, schwach infiziert

positive Probe, stark infiziert

Vereinzelt kann es zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte kommen, die als schwache, meist diffuse Banden unterschiedlicher Größen im Gel sichtbar werden. Diese Banden, hervorgerufen durch unspezifisches Annealing, bedeuten keine Kontamination, solange sie nicht die oben angegebenen Größen aufweisen.

Bei nachgewiesener Inhibition der PCR durch die Probe muss eine DNA-Extraktion mit einem handelsüblichen Extraktionskit durchgeführt und die Probe erneut getestet werden. Im Anhang finden Sie eine Liste von DNA-Extraktionskits, die mit diesem PCR-Kit validiert wurden.

## 1. Reagents and Materials

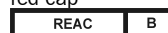
### 1.1 Testkit Components

Instruction manual

#### *Primer/ Nucleotide Mix*

Lyophilized primers and deoxynucleotide triphosphates  
dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions

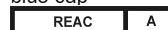
red cap



#### *PCR Reaction Buffer*

10x buffer, 740 µl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM KCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub>

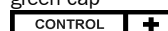
blue cap



#### *Positive Control DNA*

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

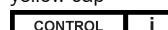
green cap



#### *Internal Control DNA*

plasmid DNA, lyophilized, non-infectious

yellow cap



### 1.2 Stability and Storage

Kit components are stable during shipping. Upon receipt, store at +2 to +8°C. After rehydration of the *primer/nucleotide mix*, the *positive control* and the *internal control*, store below -18°C and avoid repeated freezing and thawing. For repeated testing of low sample numbers, *primer/nucleotide mix* and controls should be aliquoted after rehydration. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the Guarantee Certificate.

### 1.3 Supplemental Requirements

PCR thermal cycler  
mineral oil, if required for the particular thermal cycler used  
PCR reaction tubes  
agarose gel electrophoresis apparatus  
microcentrifuge, micropipettes and filtered tips  
deionized, DNA-free water  
polymerase



**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

*Legionella* spp. ubiquitously colonize surface water and wet soil, and are the cause of the legionnaires' disease. Transmission is aerogenic. Typical symptoms are high fever, cough, thorax ache, diarrhea, discomposure, sometimes with heavy progression.

The Onar<sup>®</sup>Ls test system is an *in vitro* test for the qualitative diagnosis of *Legionella* spp. in clinical samples. The test is based on the polymerase chain reaction and allows rapid diagnosis of *Legionella* infections. The supplied primerset is specific for a segment of the 16S rRNA region of the *Legionella* genome. The amplified PCR product is 245 bp long and can be rendered visible directly in the agarose gel. Direct detection of *Legionella* is possible within 2-3 hours. The manual input is minimal. The test kit was designed from the aspect of high practicality and ease of handling. Thus the test has a high degree of precision and reproducibility.

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 amplicon is 150 bp in size. Detailed studies confirm the high specificity and sensitivity of Onar<sup>®</sup>Ls. The selected template is highly preserved within the *Legionella* species. Clinical relevant species are detected, e.g. *L. pneumophila* SG 1-15, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii* and *L. gormanii*. Cross activity with pharyngeal commensals or other pathogens in the respiratory tract, like *Bordetella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Mycobacteria*, *Pseudomonas* and *Streptococci* is not known. The detection limit is 6 genome equivalents per 5 µl sample volume. Due to the broad linear detection range, reliable results can be obtained with Onar<sup>®</sup>Ls without time-consuming conditioning of the sample material. The samples are markedly more stable compared to the antigen test.

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. Therefore dTTP is replaced by dUTP in this kit. UNG is not provided with this kit.

## 3. Test Protocol

### 3.1 Preparation of Sample Material

Nasopharyngeal swabs, nasal and pharyngeal secretions, sputum, provoked sputum, bronchial lavage, tissue and infected cells or cultures can be used as test materials. The quality of sample-taking has a major influence on the reliability of the test results. Material from the lower respiratory tract is particularly suitable for detecting *Legionella*. A fine catheter and a vacuum pump with secretion trap can be used for nasopharyngeal secretions. The oral cavity can be rinsed beforehand, and saliva and rinsing water discarded. Taking a sample from the oral cavity should not be preceded by eating or gargling. The swab is turned upwards behind the arch of the palate and wiped. When taking a sample through the nasal cavity, the thin swab is advanced into the nasopharynx and wiped repeatedly. Ensure that adequate material is obtained. The swab should be washed out in 1 ml transfer buffer (e.g. 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,1% sodium azide, 5% sodium dodecylsulfate). The sample material is stable for a few days and should be transported cooled.

DNA extraction with a commercially available DNA extraction kit (e.g. QIAamp®, Qiagen) is always advisable when preparing the samples in order to remove inhibitors of the PCR safely and to concentrate the *Legionella* DNA at greater sample volumes. The obtained DNA extract can be used directly for the Onar®Ls test. 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:

primer/nucleotide mix (per portion of 25 reactions)	65 µl
positive control	300 µl
internal control	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 Thermal Profile

The programming process of your cycler is explained in the manual of the instrument. Two programs, a normal thermal program and a short program, are possible depending on the heating speed of your cycler.

#### Cycler Program:

1 cycle	94°C for 2 min
35 cycles	94°C for 30 sec
	55°C for 30 sec
	72°C for 30 sec

cool down to 4 to 8 °C



**The incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 94°C. Please see polymerase data sheet for duration.**

### 3.4 The PCR Mastermix

Total volume per reaction is 25  $\mu$ l. When setting up reactions, calculations should also include positive and negative controls. Pipet mastermix on ice into a 1.5 ml reaction tube and mix gently.

#### Pipetting schemes:

	for 1 reaction	for 25 reactions*
water	12.3 $\mu$ l	307.5 $\mu$ l
10x reaction buffer (blue cap)	2.5 $\mu$ l	62.5 $\mu$ l
primer/nucleotide mix (red cap)	2.5 $\mu$ l	62.5 $\mu$ l
internal control (yellow cap)	2.5 $\mu$ l	62.5 $\mu$ l
Taq Pol. (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l	5.0 $\mu$ l

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

For other polymerase concentrations the amount of water needs to be adjusted. The mastermix can also be prepared for 25 reactions, aliquoted as needed and stored below -18°C for up to 3 months.

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

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 (green cap) in order to avoid cross contamination.

### 3.5 Agarose Gel Run

- 1.5% standard agarose gel with 5 mm-comb
- load 5  $\mu$ l of each PCR reaction, mixed with bromophenol blue loading buffer per lane. **Only bromophenol blue in a low concentration should be used as a run marker.**
- stop electrophoresis after 2 cm run distance (depending on the electrophoresis chamber used e.g. run for 20 minutes at 100 V)

### 3.6 Gel Evaluation

If internal control DNA was used, a distinct 150 bp band should appear in every lane indicating a successfully performed PCR. This band may fade out with increased amount of amplicons formed, caused by *Legionella* DNA loads of  $> 5 \times 10^6$  copies/ml. The initial concentration of positive control DNA exceeds  $5 \times 10^6$  copies/ml in order to account for DNA loss resulting from repeated freezing and thawing.

#### Amplicon sizes:

Internal control	150 bp
<i>Legionella</i> sp.	245 bp

#### Results of a successfully performed PCR:

negative control	band at 150 bp
positive control	band at 245 bp , possibly an additional band at 150 bp

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

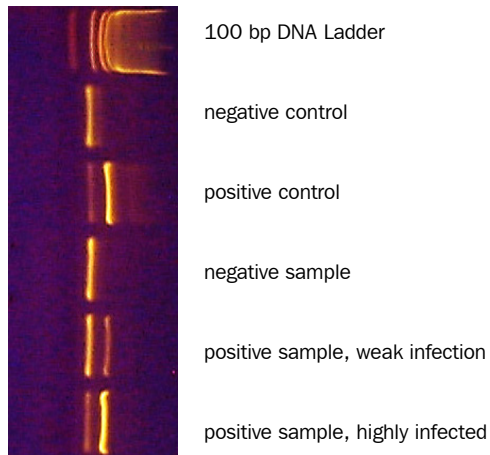
Before rerun of a negative and a positive control please check thermocycler protocol and pipetting scheme. When using polymerases other than the MB TAQ DNA Polymerase, please note the comments made under chapter 1.3. The concentration can then be raised up to 2.5 U/reaction. Please note the complete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

Interpretation of possible band patterns:

<b>Band pattern</b>	<b>Interpretation</b>
band at 150 bp	negative sample
band at 245 bp and at 150 bp	<i>Legionella sp.</i> -positive sample with weak infection
strong band at 245 bp	<i>Legionella sp.</i> -positive sample, highly infected
no band	PCR inhibition

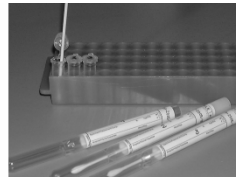
With Onar<sup>®</sup>Ls designed for high sensitivity and therefore prone to nonspecific annealing, bands of various length that are less intensive can be produced, but not indicate positive results. Possible primer self-annealing produces another band of 80-90 bp in length, but also does not affect the precision or results of the test.

If the PCR of a sample is inhibited, PCR inhibitors can easily be removed from the sample by performing a DNA extraction with a commercially available kit. A list of recommended DNA extraction kits is provided in the appendix.

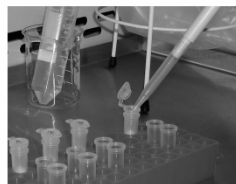


Scheme of the protocol

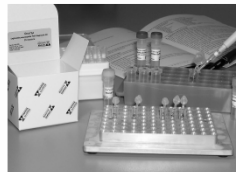
**Sample**



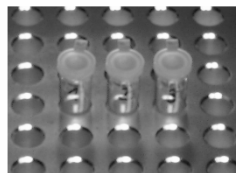
**DNA  
Purification**  
(optional)



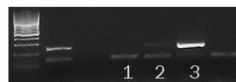
**Instrument and  
Reaction  
Setup**



**PCR  
Thermal  
Cycling**



**Analysis**



1. negative sample
2. positive sample, weak infection
3. positive sample, strong infection

## EG-Konformitätserklärung/EC Conformity Declaration

Minerva Biolabs GmbH, Köpenicker Straße 325, 12555 Berlin, Germany

Der bezeichnete Kit entspricht den einschlägigen grundlegenden Anforderungen der aufgeführten EG-Richtlinien und Normen. Bei einer nicht mit uns abgestimmten Änderung des Kits verliert diese Erklärung ihre Gültigkeit.

The device named below fulfills the relevant fundamental requirements of the EC directives and standards listed. In the case of unauthorized modifications to the device, this declaration becomes invalid.

Produktbezeichnung, Device name: **Onar<sup>®</sup>Ls**

Produkttyp, Device type: **Legionella species Diagnostic Kit for conventional PCR**

Einschlägige EU-Richtlinien, Relevant EC directives: **EU-Richtlinie 98/79/EG für In-Vitro-Diagnostika vom 27.10.1998**

25.11.2005

-----  
Berlin, Datum



Geschäftsführung/Managing Director



Entwicklungsleiter/Development Manager

### 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.

The Polymerase Chain Reaction (PCR) process is covered by patents owned by Hoffmann-La Roche. Use of the PCR process requires a license.

## Minerva Biolabs' International Distributors

### Argentina

Chemetron Latinoamericana S.A.  
Tel: +54 11 4393 9613  
Fax: +54 11 4953 8918  
Web: www.chemetron.com.ar  
Email: info@chemetron.com.ar

### Australia

Biocene Pty. Ltd.  
Tel: +61 2 99668166  
Fax: +61 2 99668300  
jenny@biocene.com

### Austria

BioProducts  
Tel: +43 2268 61 65 11  
Fax: +43 2268 61 65 44  
Email: info@bioproducts.at  
Web: www.bioproducts.at

### Belgium, Luxembourg

Lucron Bioproducts bvba  
Tel: +32 92 82 05 31  
Fax: +32 92 82 05 32  
Email: info@lucronbioproducts.com  
Web: www.lucronbioproducts.com

### Canada + USA

Medicorp Inc.  
Tel: +1 514 7331 900  
Fax: +1 514 7331 212  
Email: mktg@medicorp.com  
Web: www.medicorp.com

### Czech Republic

BIO-Consult Laboratorijs spol. sro.  
Tel: +42 2 4447 1239  
Fax: +42 2 4447 1239  
Email: info@bioconsult.cz  
Web: www.bioconsult.cz

### Finland

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

### Germany & Eastern Europe

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

### 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

### Korea

Morebio  
Tel: +82 2 406 2942  
Fax: +82 2 406 2942  
Email: info@morbeio.co.kr  
Web: www.morebio.co.kr

### 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

### New Zealand

Medical & Scientific Ltd.  
Tel: +64 96 34 10 36  
Fax: +64 96 34 51 46  
Email: nzms@nzms.co.nz  
Web: www.nzms.co.nz

### Norway

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

### Poland

STI  
Tel: +48 61 641 77 59  
Fax: +48 61 641 77 58  
Email: office@sti.biz.pl  
Web: www.sti.biz.pl

### Portugal

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

### Slovenia

Kemomed d.o.o.  
Tel: +386 4 201 50 50  
Fax: +386 4 201 50 55  
Email: info@kemomed.si  
Web: www.kemomed.si

### Spain

LacClinics 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: +90 212 220 15 64  
Fax: +90 212 248 20 00  
Email: muratyazici@genomedtr.com  
Web: www.genomed-biotech.com

## Related Products

### Taq DNA Polymerase

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

### Diagnostic Kits for Conventional PCR

21-1025	Onar <sup>®</sup> Ls, <i>Legionella species</i>	25 tests
21-1100	Onar <sup>®</sup> Ls, <i>Legionella species</i>	100 tests
21-1250	Onar <sup>®</sup> Ls, <i>Legionella species</i>	250 tests

20-1025	Venor <sup>®</sup> Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25 tests
20-1100	Venor <sup>®</sup> Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100 tests
20-1250	Venor <sup>®</sup> Mp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	250 tests

### Diagnostic Kits for Real-Time PCR

21-2025	Onar <sup>®</sup> Ls-QP, <i>Legionella species</i>	25 tests
21-2100	Onar <sup>®</sup> Ls-QP, <i>Legionella species</i>	100 tests
21-2250	Onar <sup>®</sup> Ls-QP, <i>Legionella species</i>	250 tests
21-3025	Onar <sup>®</sup> Lp-QP, <i>Legionella pneumophila</i>	25 tests
21-3100	Onar <sup>®</sup> Lp-QP, <i>Legionella pneumophila</i>	100 tests
21-3250	Onar <sup>®</sup> Lp-QP, <i>Legionella pneumophila</i>	250 tests
20-2025	Venor <sup>®</sup> Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25 tests
20-2100	Venor <sup>®</sup> Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100 tests
20-2250	Venor <sup>®</sup> Mp-QP, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	250 tests

### Quantification Standards 100 µl each

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup> genomes/µl
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup> genomes/µl
52-0112	<i>Mycoplasma orale</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup> genomes/µl
52-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i> DANN Standard	1x10 <sup>6</sup> genomes/µl

### Genomic DNA Extracts 100 µl each

51-0101	<i>Legionella pneumophila</i> , ATCC 33152	+/- 10 ng / 100 µl
51-1514	<i>Legionella pneumophila subsp. fraseri</i> , DSMZ 7514	+/- 10 ng / 100 µl
51-1515	<i>Legionella pneumophila subsp. pasculli</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
51-1723	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , NC 001723	+/- 10 ng / 100 µl
51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566	+/- 10 ng / 100 µl
51-0792	<i>Clostridium acetobutylicum</i> , DSMZ 792	+/- 10 ng / 100 µl
51-5571	<i>Bordetella pertussis</i> , DSMZ 5571	+/- 10 ng / 100 µl
51-3415	<i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415	+/- 10 ng / 100 µl
51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177	+/- 10 ng / 100 µl
51-0111	<i>M. hominis</i> , NC 010111	+/- 10 ng / 100 µl
51-0112	<i>M. orale</i> , NC 010112	+/- 10 ng / 100 µl
51-0113	<i>M. salivarium</i> , NC 010113	+/- 10 ng / 100 µl
51-0115	<i>M. gallisepticum</i> , NC 010115	+/- 10 ng / 100 µl
51-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i> , NC010116	+/- 10 ng / 100 µl
51-0117	<i>M. fermentans PG19</i> , NC 010117	+/- 10 ng / 100 µl
51-0119	<i>M. pneumoniae</i> , NC010119	+/- 10 ng / 100 µl
51-0129	<i>M. arginini</i> , NC 010129	+/- 10 ng / 100 µl
51-0130	<i>M. hyorhinis</i> , NC 010130	+/- 10 ng / 100 µl
51-0162	<i>M. arthritis</i> , NC 010162	+/- 10 ng / 100 µl
51-0195	<i>M. genitalium</i> , NC 010195	+/- 10 ng / 100 µl
51-1746	<i>M. penetrans</i> , NC 11746	+/- 10 ng / 100 µl

### DNA Remover™

15-2025	DNA Decontamination Reagent, spray bottle	250 ml
15-2200	DNA Decontamination Reagent, refill bottles	4x 500 ml