

Art. Nr. / Order No. 12-1025/-1050/-1100/-1250

Onar[®]EUB

Bacteria Detection Kit for endpoint PCR
version 1.2

Gebrauchsinformation / Instructions for Use

Reagenzien für 25/50/100/250 Reaktionen

Reagents for 25/50/100/250 reactions

Hersteller / Manufacturer:

Minerva Biolabs GmbH, Koepenicker Strasse 325, 12555 Berlin, Germany

ZUR ANWENDUNG IN DER FORSCHUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE
FOR USE IN RESEARCH AND QUALITY CONTROL

Symbole / Symbols



Chargen-Nr. / Lot No.



Artikel-Nr. / Order No.



Verfallsdatum / Expiry date



Lagerung bei / Store at



Enthält Reagenzien für 25, 50, 100 oder 250 Bestimmungen
Contains reagents for 25, 50, 100 or 250 tests



Hersteller / Manufacturer

ANWENDUNGSGEBIET

Der Onar[®]EUB *Bacteria Detection Kit* dient der qualitativen Direktbestimmung von Bakterienkontaminationen in biologischen Proben wie Zellkulturen, Zellkulturprodukten oder Kulturmedien.

ERKLÄRUNG DES TESTS

Onar[®]EUB ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis der konventionellen Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR erlaubt eine schnelle und sensitive Detektion von bakteriellen Kontaminationen in biologischen Proben. Mit Onar[®]EUB sind 52 fg Eubakterien-DNA, entsprechend 12 Bakteriengenome (bezogen auf die Genomgröße von *Bacillus subtilis*), pro Probenvolumen detektierbar. Unter anderem werden folgende Bakterienarten detektiert: *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Escherichia*, *Serratia*, *Porphyromonas*, *Fusobacteria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Legionella*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*.

TESTPRINZIP

Die mitgelieferten Primer erlauben die Vervielfältigung eines Abschnitts der 16S rRNA-Region des Bakteriengenoms. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 467 bp (eine Ausnahme bildet *Micrococcus luteus* mit 447 bp) und kann elektrophoretisch direkt im Agarosegel am Ende der PCR („endpoint“ PCR) sichtbar gemacht werden. Das gewählte Template ist innerhalb der Bakterien hochkonserviert.

Das Testsystem beinhaltet außerdem eine Interne Kontrolle, die dem Primer/Nucleotide Mix bereits hinzugefügt wurde. Die Interne Kontrolle liefert in einer erfolgreich durchgeführten PCR ein 210 bp großes Produkt und erscheint im Agarosegel kurz unterhalb der Bande eines Bakterien-spezifischen Amplifikats.

Der *Primer/Nucleotide Mix* enthält dUTP statt dTTP. Optional können so verschleppte Amplifikate aus vorangegangenen Analysen durch Einsatz von Uracil-DNA Glycosylase (UNG) abgebaut und das Auftreten falsch positiver Ergebnisse minimiert werden. UNG ist nicht Bestandteil von Onar[®]EUB.

ENTHALTENE REAGENZIEN

Jedes Kit enthält Reagenzien für 25, 50, 100 oder 250 Reaktionen. Das Verfallsdatum der ungeöffneten Packung ist auf dem Außenetikett vermerkt. Die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung bei +2 bis +8 °C.

Das chargenspezifische Analysenzertifikat der Qualitätskontrolle (*Certificate of Analysis*) kann auf unserer Webseite heruntergeladen werden (www.minerva-biolabs.com).

Reagenz Bezeichnung	Anzahl				Deckel- farbe
	25 Reaktionen Art. Nr. 12-1025	50 Reaktionen Art. Nr. 12-1050	100 Reaktionen Art. Nr. 12-1100	250 Reaktionen Art. Nr. 12-1250	
Primer/Nucleotide Mix	1 x lyophilisiert	2 x lyophilisiert	4 x lyophilisiert	10 x lyophilisiert	rot
10x Reaction Buffer	1 x 0,5 ml	1 x 0,5 ml	1 x 0,5 ml	2 x 0,5 ml	blau
Positive Control DNA	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	grün
PCR grade Water	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	2 x 2,0 ml	4 x 2,0 ml	weiß

BENÖTIGTES, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Der Onar[®]EUB Kit enthält die Reagenzien für den spezifischen Nachweis von Bakterien. Allgemein übliche Verbrauchsmaterialien und Reagenzien eines PCR Labors sind nicht enthalten. Dazu zählen:

- PCR-Gerät
- PCR-Reaktionsgefäße, passend für das PCR-Gerät
- 1,5 ml Reaktionsgefäß, DNA- und RNA-frei
- Mikrozentrifuge für 1,5 ml und PCR-Reaktionsgefäße
- Pipette zum Ansetzen und Dispensieren des Reaktionsmixes mit Filterspitzen (10, 100 und 1000 µl)
- DNA-freie hot-start DNA-Polymerase (1 Unit/Test) mit einer Konzentration von 2 U/µl

Onar[®]EUB sollte ausschließlich mit EUB-Polymerase durchgeführt werden.

Prinzipiell kann der Kit mit jeder Polymerase durchgeführt werden. Polymerasen verschiedener Hersteller sind jedoch häufig mit bakterieller DNA verunreinigt und führen zu falsch-positiven Ergebnissen. Daher empfehlen wir ausdrücklich die Verwendung unserer DNA-freien EUB-Polymerase (Art.-Nr. 54-0100 für 100 Units, Art.-Nr. 54-0500 für 500 Units).

PROBENMATERIAL

1. Antibiotika können die Bakterienkonzentration unter die Nachweisgrenze des Testes von $2,4 \times 10^3$ Bakterien/ml drücken. Daher sollten die Zellen vor dem Test für mindestens eine Passage in Antibiotika-freiem Medium kultiviert werden. Zellkulturüberstände sollten bei 90 bis 100 % Konfluenz getestet werden.

2. Zur Probenvorbereitung ist grundsätzlich eine DNA-Extraktion mit einem handelsüblichen DNA-Extraktionskit (z.B. Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit, Art. Nr. 56-1100) empfehlenswert, um Inhibitoren der PCR sicher zu entfernen und einen quantitativen Aufschluss der im Probenmaterial enthaltenen Bakterien zu erreichen.
3. Die Probe sollte eine Gesamt-DNA-Last von 300 µg/ml nicht überschreiten.
4. Die Lagerung der Extrakte ist bei mindestens -18 °C über einen Zeitraum von einem Jahr möglich.
5. Die hohe Empfindlichkeit der PCR-Methode erhöht die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse, z.B. durch Kreuzkontaminationen oder unsauberes Arbeiten. Alle Arbeiten sollten unter Beachtung der geltenden Laborregeln durchgeführt werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

Dieser Kit ist ausschließlich für Forschungszwecke bestimmt und darf nicht für die klinische Diagnostik eingesetzt werden.

Dieser Kit sollte nur von geschulten Personen verwendet werden.

Das Probenmaterial muss als potentiell infektiös betrachtet und nach den lokalen oder nationalen Vorschriften behandelt werden.

Dieser Kit enthält keine Gefahrstoffe und kann gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Die hohe Empfindlichkeit der PCR-Methode erhöht die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse, z.B. durch Kreuzkontaminationen oder unsauberes Arbeiten. Alle Arbeiten sollten unter Beachtung der geltenden Laborregeln durchgeführt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Der Test sollte mit Negativ- und Positivkontrollen sowie den Proben in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf +2 bis +8 °C gebracht werden.

1. Rehydratisierung der Reagenzien

Nach Rehydratisierung können die Reagenzien bei $< -18\text{ °C}$ gelagert und bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden und die rehydratisierten *Positive Control DNA* ggf. aliquotiert gelagert werden.

1.	Primer/Nucleotide Mix Positive Control DNA	Deckel rot Deckel grün	Lyophilisate für 5 Sekunden bei maximaler Umdrehung in der Tischzentrifuge zentrifugieren.
2.	Primer/Nucleotide Mix	Deckel rot	Zugabe von 65 μl PCR grade Water (Deckel weiß)
3.	Positive Control DNA	Deckel grün	Zugabe von 300 μl PCR grade Water (Deckel weiß)
4.	Primer/Nucleotide Mix Positive Control DNA	Deckel rot Deckel grün	5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
5.	Primer/Nucleotide Mix Positive Control DNA	Deckel rot Deckel grün	DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

2. Herstellung des Reaktionsmixes

- Der Reaktionsmix wird bei Raumtemperatur in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für die benötigte Anzahl an Tests und Kontrollen angesetzt.

Pipettierschema bei Verwendung einer Polymerase mit einer Ausgangskonzentration von 2 U/ μl :

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen
PCR grade Water	14,5 μl	362,5 μl
10x Reaction Buffer	2,5 μl	62,5 μl
Primer/Nucleotide Mix	2,5 μl	62,5 μl
Polymerase (5 U/ μl)	0,5 μl	12,5 μl

- Reaktionsmix durch Schnippen des Gefäßes vorsichtig mischen.
- In jedes PCR-Reaktionsgefäße 20 μl geben.

3. Beschickung der Testansätze

Die Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden.

- Negativkontrollen:
Zugabe von wahlweise 5 μl Elutionspuffer des verwendeten DNA-Extraktionskits (vgl. Kapitel „Probenmaterial“) oder PCR grade Water (Deckel weiß)
- Proben: Zugabe von jeweils 5 μl Extrakt oder Zellkulturüberstand
- Positivkontrollen: Zugabe von jeweils 5 μl Positive Control DNA (Deckel grün)
- Alle Ansätze verschließen, kurz zentrifugieren, in den Thermocycler stellen und Programm starten.

4. Start der Reaktion

- Beladung des Cyclers, dabei festen Sitz der PCR-Gefäße in den Gefäßaufnahmen des Gerätes und der Deckel auf den PCR-Gefäßen überprüfen.
- Erstprogrammierung des PCR-Geräts oder Aufruf und Prüfung eines gespeicherten Profils:
1 Zyklus 94 °C für 2 min
35 Zyklen 94 °C für 30 sec
55 °C für 30 sec
72 °C für 30 sec
1 Zyklus 72 °C für 10 min
auf 4 °C bis 8 °C abkühlen
- Start des PCR-Geräts

5. Darstellung der Testergebnisse

- 1,5 %iges Standard-Agarosegel mit laborüblicher Menge an DNA-Farbstoff ansetzen (maximal 5 mm dick, 5 mm-Kamm)
- 5 μl jedes PCR-Reaktionsansatzes, gemischt mit Bromphenolblau-Ladepuffer, pro Bahn auftragen (es sollte nur Bromphenolblau in geringer Konzentration als Laufmarker verwendet werden, um die Banden nicht zu überdecken)
- Elektrophorese nach 2 cm Wegstrecke stoppen (je nach Elektrophoresekammer z.B. nach 20 Minuten bei 100 V)
- Auswertung:

Interne Kontrolle	191 bp
Bakterien	466 - 468 bp
<i>Micrococcus luteus</i>	447 bp

ANMERKUNGEN ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

1. Diese Gebrauchsinformation muss für eine erfolgreiche Benutzung des Onar®EUB weitgehend verstanden worden sein. Die gelieferten Reagenzien einer Charge sind als integrale Einheit zu verstehen. Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht vermischt werden. Die Reagenzien des Kits dürfen nach Ablauf der Haltbarkeit nicht mehr verwendet werden.
2. Jegliche Abweichung vom Testverfahren kann die Resultate beeinträchtigen.
3. Bei Verwendung anderer als der validierten MB EUB-Polymerase sind die unter „Benötigtes, aber nicht im Kit enthaltene Material“ aufgeführten Hinweise zu beachten. Es kann bei der Verwendung anderer Polymerasen notwendig sein, den mit der Polymerase mitgelieferten Reaktionspuffer zu verwenden.
4. Inhibitionen können durch die Probenmatrix direkt aber auch durch den Probenelutionspuffer anderer DNA-Extraktionskits als der Empfohlenen verursacht werden. Die Negativkontrollen sollten zur Überprüfung mit dem verwendeten Probenelutionspuffer komplettiert werden.
5. Je Ansatz sollte mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt werden, die auch die Probenaufbereitung berücksichtigt. Die Mitführung einer Positivkontrolle erleichtert die Auswertung.
6. Die Verwendung von Kontrollproben ist ratsam, um die von Tag zu Tag Gültigkeit der Resultate zu sichern. Die Kontrollen sollten in gleicher Weise wie die Proben durchgeführt werden. Es wird dem Labor empfohlen, eigene Kontrollproben mit einem hohen, medialen und niedrigen (z.B. 3x LOD₉₅) Niveau herzustellen. Eine Teilnahme an externen Qualitätskontrollprogrammen wird empfohlen.

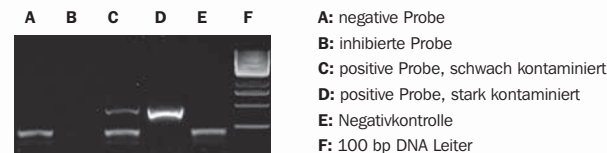
INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei einem erfolgreichen Testansatz wird die Interne Kontrolle mit einer Bandengröße von 210 bp im Gel sichtbar. Enthält die Probe mehr als 5×10^6 Kopien/ml an Bakterien-DNA wird die Interne Kontrolle mit ansteigender Bakterienlast verdrängt und dann nicht mehr amplifiziert. In diesem Fall wird ein erfolgreicher Testansatz durch die Bakterien-spezifische Bande angezeigt. Die *Positive Control DNA* enthält deutlich mehr als 5×10^6 Kopien/ml, um den Verlust durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen auszugleichen und verdrängt weitgehend die Interne Kontrolle.

Nachweis von Mykoplasmen Bande bei ca. 467 bp	Interne Kontrolle Bande bei 210 bp	Interpretation
positiv	irrelevant	mit Bakterien kontaminierte Probe
negativ	negativ	Inhibition der PCR oder fehlerhafter Testansatz
negativ	positiv	kein Nachweis von Bakterien in der Probe

Vereinzelt kann es zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte kommen, die als schwache, meist diffuse Banden unterschiedlicher Größen im Gel sichtbar werden. Diese Banden werden durch unspezifisches Annealing bei der Verwendung von Proben mit mehr als 300 µg/ml DNA gebildet und bedeuten keine Kontamination, solange sie nicht die oben angegebenen Größen aufweisen. Primerdimere können eine diffuse Bande bei 80-90 bp bilden, jedoch ohne Auswirkungen auf die analytische Charakteristik des Tests.

Bei ersichtlicher Inhibition der PCR durch die Probe (geringere Bandenintensität im Vergleich zur Negativkontrolle) muss eine DNA-Extraktion durchgeführt und die Probe erneut getestet werden (siehe Kapitel „Probenmaterial“).



Typisches Gelbild für Onar®EUB

ANALYTISCHE CHARAKTERISTIKA DES TESTS

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze liegt bei 52 fg bakterieller DNA/PCR. Diese DNA-Last entspricht bei der Genomgröße von *Bacillus subtilis* 12 Genome.

Kreuzreaktivität und Spezifität

Onar®EUB weist keine eukaryontische DNA nach. Auch Viren, Hefen oder Pilzen werden nicht erkannt.

INDICATION

The Onar[®]EUB *Bacteria Detection Kit* is used for direct detection of bacteria contamination in cell cultures, cell culture derived biologicals and cell culture media.

EXPLANATION OF THE TEST

Onar[®]EUB is a nucleic acid amplification test based on conventional polymerase chain reaction (PCR). The PCR allows a rapid and sensitive detection of bacterial contamination in biological samples. With Onar[®]EUB 52 fg DNA, corresponding to 12 bacterial genomes (relative to the size of the genome of *Bacillus subtilis*) are detected per sample volume. Among others, the following types of bacteria can be detected: *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Escherichia*, *Serratia*, *Porphyromonas*, *Fusobacteria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Legionella*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*.

TEST PRINCIPLE

The supplied primer sets allow the polymerase to reproduce of a portion of the 16S rRNA region of the bacterial genome. The selected template is highly conserved within the bacteria. The amplified PCR products have a size of approx. 467 bp (one exception is *Micrococcus luteus* with 447 bp). The amplicons can be made directly visible on an agarose gel at endpoint of PCR. The test system also includes an internal control in the Primer/Nucleotide Mix. The internal control provides in a successfully reaction a 210 bp PCR product in the agarose gel which appears just below the band of a bacteria-positive sample.

REAGENTS

Each kit contains reagents for 25, 50, 100 or 250 reactions. The expiry date of the unopened package is marked on the package label. The kit components are stored until use at +2 to +8 °C. The lot specific *Certificate of Analysis* can be downloaded from our website (www.minerva-biolabs.com).

Kit Component Label Information	Quantity				Cap Color
	25 reactions Order No. 12-1025	50 reactions Order No. 12-1050	100 reactions Order No. 12-1100	250 reactions Order No. 12-1250	
Primer/Nucleotide Mix	1 x lyophilized	2 x lyophilized	4 x lyophilized	10 x lyophilized	red
10x Reaction Buffer	1 x 0.5 ml	1 x 0.5 ml	1 x 0.5 ml	2 x 0.5 ml	blue
Positive Control DNA	1 x lyophilized	1 x lyophilized	1 x lyophilized	1 x lyophilized	green
PCR grade Water	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	2 x 2.0 ml	4 x 2.0 ml	white

NEEDED, BUT NOT INCLUDED IN THE KIT

The Onar[®]EUB *Bacteria Detection Kit* contains the reagents for the specific detection of bacteria. General industrial supplies and reagents, usually available PCR laboratories are not included:

- PCR device
- PCR reaction tubes for the specific PCR device
- 1.5 ml reaction tubes, DNA- and RNA-free
- Micro centrifuge for 1.5 ml PCR reaction tubes
- Pipettes with corresponding filter tips to prepare and dispense the reaction mix (10, 100 and 1000 µl)
- DNA-free hot-start DNA polymerase (1 unit/reaction) with a concentration of 1 U/µl or 5 U/µl

Onar[®]EUB should be performed only with EUB-Polymerase

In general the kit can be performed with any polymerase. However, polymerases of different manufacturers can be contaminated with bacterial DNA leading to false-positive results. Therefore we strictly recommend the use of only DNA-free EUB-Polymerase from Minerva Biolabs (Order No. 54-0100 for 100 units or Order No. 54-0500 for 500 units).

SPECIMEN

1. Antibiotics can maintain the bacterial contamination at a level beneath the detection limit of the test (2.4×10^3 bacteria/ml). Therefore, prior to testing, the cells should be pre-cultured in the absence of antibiotics for at least one passage.
2. DNA extraction with a commercially available DNA extraction kit (e.g. MB DNA Extraction Kit, Order No. 56-1100) is always advisable when preparing the samples in order to remove inhibitors of the PCR safely and to lyse bacteria completely. The obtained DNA extract can be used directly for the Onar[®]EUB test avoiding inhibition. DNA extracts and heat-inactivated samples can be kept for 6 days at +2 to +8 °C. Longer storage times require a temperature of -18 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided.
3. The sample should not contain more than 300 µg/ml DNA.
4. The extract can be stored at a temperature of at least -18 °C for a period of one year.
5. To avoid false positive results, we recommend the use of deionized, DNA-free water, aerosol-preventive filter tips and gloves.

PRECAUTIONS

Onar®EUB is intended for research use only. Not for clinical diagnostics or testing of human samples.

This kit should be used only by trained persons.

All samples should be considered potentially infectious and handled according to local or national regulations.

This kit does not contain hazardous substances and may be disposed of according to local regulations.

Cross contamination may lead to false-positive results. The test should be performed according to good laboratory practice.

TEST PROCEDURE

The test should be carried out with negative and positive controls and samples in duplicate. All reagents and samples must be equilibrated to +2 to +8 °C prior use.

1. Rehydration of the reagents

After reconstitution, the reagents should be stored at below -18 °C. Repeated freezing and thawing

1.	Primer/Nucleotide Mix	red cap	Spin all lyophilized components for 5 sec at maximum speed of the centrifuge
	Positive Control DNA	green cap	
2.	Primer/Nucleotide Mix	red cap	Add 65 µl PCR grade Water (white cap)
3.	Positive Control DNA	green cap	Add 300 µl PCR grade Water (white cap)
4.	Primer/Nucleotide Mix	red cap	Incubate 5 min at room temperature
	Positive Control DNA	green cap	
5.	Primer/Nucleotide Mix	red cap	Vortex DNA briefly and spin for 5 sec
	Positive Control DNA	green cap	

should be avoided and the reconstituted *Positive Control DNA* stored in aliquots.

2. Preparation of the reaction mix

1. Prepare the required amount of reaction mix at room temperature in a 1.5 ml reaction tube for all control and test reactions.

Pipetting scheme using a polymerase with a concentration of 2 U/µl:

	for 1 reaction	for 25 reactions
PCR grade Water	14.5 µl	365.5 µl
10x Reaction Buffer	2.5 µl	62.5 µl
Primer/Nucleotide Mix	2.5 µl	62.5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0.5 µl	12.5 µl

2. Homogenize the reaction mix by carefully snapping the tube.
3. Add 20 µl to each PCR tube, discard remaining material.

3. Loading the test tubes

The pipetting sequence should be respected and the tubes closed after each sample load.

1. Negative Controls:
add 5 µl elution buffer from DNA extraction kit (ref. chapter "Sample Material") or PCR grade Water (white cap).
2. Samples: add 5 µl of cell culture supernatant or DNA extract.
3. Positive Control: add 5 µl Positive Control DNA (green cap).
4. Close and spin all PCR tubes briefly, load the PCR cycler and start the program.

4. Starting the reaction

1. Load the cycler, check each PCR tube and the cycler lid for tight fit.
2. Program the PCR cycler or check stored temperature profiles.
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 °C to 8 °C
3. Start the program.

5. Result reading

1. Cast a 1.5 % standard agarose gel including DNA stain (maximal 5 mm thick, 5 mm comb).
2. Load 5 µl 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).
3. Stop electrophoresis after 2 cm run distance (depending on the electrophoresis chamber used run for approx. 20 minutes at 100 V).
4. Result reading:

Internal control	191 bp
bacteria	466-468 bp
<i>Micrococcus luteus</i>	447 bp

NOTES ON THE TEST PROCEDURE

1. This leaflet must be widely understood for a successful use of Onar®*EUB*. The reagents supplied should not be mixed with reagents from different lots and used as an integral unit. The reagents of the kit should not be used beyond its shelf life.
2. Any deviation from the test method can affect the results.
3. When using other than the validated MB *EUB*-Polymerase please note the instructions outlined in the chapter "Needed, but not included in the kit". If you want to use your own polymerase, it may be necessary to use the specific buffer provided with this polymerase.
4. Inhibition may be caused by the sample matrix, but also by sample elution buffer of DNA extraction kits not recommended or validated. Negative controls should always be completed with the use of sample elution buffer.
5. For each test setup, at least one negative control should be included, possibly reflecting sample preparation. Positive controls facilitate the evaluation of the test.
6. The use of control samples is advised to secure the day-to-day validity of results. The controls should be carried out in the same manner as the samples. It is recommended to run laboratory specific control samples with a high, medial and low (e.g. 3x LOD₉₅) level. Participation in external quality control programs is recommended.

INTERPRETATION OF RESULTS

If Internal Control DNA was used, a distinct 210 bp band should appear in every lane indicating a successfully performed PCR. This band may fade out with increased amounts of target amplicon formed, caused by mycoplasma DNA loads of $> 5 \times 10^6$ copies/ml. The initial concentration of positive control DNA exceeds 5×10^6 copies/ml in order to account for DNA loss resulting from repeated freezing and thawing. Consequently, the internal control is usually not visible in the positive control reaction.

Detection of bacteria band at approx. 467 bp	Internal control band at 210 bp	Interpretation
positive	irrelevant	bacteria present in the sample
negative	negative	PCR inhibition
negative	positive	no bacteria detectable in the sample

Rarely unspecific PCR products can be formed and become visible in the gel as faint, diffuse bands of different sizes (not 210 or 467 bp), but do not indicate positive results. These unspecific products are mainly caused by non-specific annealing due to overloading the PCR reaction with samples containing more than 300 µg/ml of DNA. Possible primer self-annealing produces another band of 80-90 bp in length, but does not affect the precision or results of the test.

In apparent inhibition of PCR by the sample (lower band intensity compared to negative control) a DNA extraction has to be performed and the sample will be tested again (see chapter "Specimen").

A typical gel figure is shown below:



ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE TEST

Analytical Sensitivity

The detection limit is 12 genomes/PCR based on the *Bacillus subtilis* genome size or 52 fg of genomic DNA/sample.

Cross-reactivity

A cross-reactivity with eukaryotic DNA origin could not be found. The kit is also not detecting any yeast, fungies or viruses.

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.

Trademarks

Onar is a registered trademark of Minerva Biolabs GmbH, Germany.

Last technical revision: August 2011

Letzte technische Überarbeitung: August 2011

Related Products

MB Taq DNA Polymerase

53-0050/-0100/-0200/-0250	MB Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	50/100/200/250 units
53-1050/-1100/-1200/-1250	MB Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)	50/100/200/250 units

Diagnostic Kits for conventional PCR

11-1025/-1050/-1100/-1250	Venor [®] GeM Mycoplasma Detection Kit	25/50/100/250 tests
11-7024/-7048/-7096/-7240	Venor [®] GeM Advance Mycoplasma Detection Kit	24/48/96/240 tests
11-2025/-2050/-2100/-2250	Venor [®] GeM OneStep Mycoplasma Detection Kit	25/50/100/250 tests
12-1025/-1050/-1100/-1250	Onar [®] EUB Bacteria Detection Kit	25/50/100/250 tests

Diagnostic Kits for qPCR

11-3025/3100/3250	Venor [®] GeM-qEP Mycoplasma Detection Kit	25/100/250 tests
12-2025/2100/2250	Onar [®] qEUB Bacteria Detection Kit	

Mycoplasma Elimination

10-0200/0500/1000	Mynox [®] Mycoplasma Elimination Reagent	2/5/10 treatments
10-0201/0501/1001	Mynox [®] Gold Mycoplasma Elimination Reagent	2/5/10 treatments

Quantification Standards, 100 μ l each, 1x10⁶ genomes/ μ l

52-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
52-0129	<i>Mycoplasma arginini</i>
52-0117	<i>Mycoplasma fermentans</i>
52-0115	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
52-0130	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
52-0112	<i>Mycoplasma orale</i>
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
52-0124	<i>Mycoplasma synoviae</i>
52-0164	<i>Spiroplasma citri</i>

Genomic DNA Extracts, 100 μ l each, +/- 10 ng / 100 μ l (selection)

51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177
51-0111	<i>Mycoplasma hominis</i> , NC 010111
51-0112	<i>Mycoplasma orale</i> , NC 010112
51-0117	<i>Mycoplasma fermentans</i> PG19, NC 010117
51-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , NC 010119
51-0129	<i>Mycoplasma arginini</i> , NC 010129
51-0162	<i>Mycoplasma arthritidis</i> , NC 010162
51-0195	<i>Mycoplasma genitalium</i> , NC 010195
51-1746	<i>Mycoplasma penetrans</i> , NC 11746

DNA Remover™

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

Extraction Kit

56-1100	MB DNA Extraction Kit	100 extractions
---------	-----------------------	-----------------

Mycoplasma Off®

15-1000	Surface Disinfectant Spray, spray bottle	1000 ml
15-5000	Surface Disinfectant Spray, refill bottles	5 x 1000 ml
15-1001	Disinfection Wipes, dispenser box	120 wipes
15-5001	Disinfection Wipes, refill sachets	5 x 120 wipes

ZellShield™

13-0050/-0150	Contamination Prevention Reagent 100x concentrate	1000 ml/ 5 x 1000 ml
---------------	---	----------------------

PCR Ultra Pure Water

55-0015/-0075	PCR Grade Water for all PCRs and RT-PCRs, cDNA synthesis sequencing and cycle sequencing	1.5 ml/ 5 x 1.5 ml
---------------	--	--------------------



Manufacturer

Minerva Biolabs GmbH
Koenpinner Str. 325
D-12555 Berlin
Germany



Ordering

Tel. +49 (0)30 2000 437-0
Fax +49 (0)30 2000 437-9
order@minerva-biolabs.com



Product Information

www.minerva-biolabs.com
info@minerva-biolabs.com



Technical Service

Tel. +49 (0)30 2000 437-0
support@minerva-biolabs.com

Made in Germany

Minerva Biolabs GmbH develops and manufactures products in accordance with EN ISO 9001:2008 and EN ISO 13485:2003 quality system requirement.
Reg.No. SY 60026567 0001 & SX 60025009 0001



...as precise as diagnostics should be™