

**Art. Nr. / Ordering No. 21-3025/-3100/-3250**

# **Onar<sup>®</sup>Lp**

***Legionella pneumophila Diagnostic Kit for qPCR***  
**version 2.0**

## **Gebrauchsinformation / Instructions for Use**

Reagenzien für 25/100/250 Reaktionen

Reagents for 25/100/250 reactions

## **Hersteller / Manufacturer:**

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

**ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK**  
**FOR IN VITRO USE ONLY**



CELL CULTURE CONTAMINATION & QUALITY CONTROL  
CLINICAL | WATER | VETERINARY DIAGNOSTICS  
MYCOPLASMA | BACTERIA | VIRUSES



## 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

Dieses Kit dient der quantitativen Direktbestimmung von *Legionella pneumophila* in Rachenabstrichen und Sputum.

## ERKLÄRUNG DES TESTS

*Legionella pneumophila* kommt ubiquitär in Oberflächenwasser und feuchtem Boden vor und ist als opportunistischer Erreger der sog. Legionärskrankheit und des Pontiac-Fiebers bekannt. Die Inkubationszeit beträgt 2 bis 10 Tage. Die Übertragung erfolgt wahrscheinlich aerogen. Typische Symptome der Legionellose sind hohes Fieber, Husten, Thoraxschmerzen, Diarrhoe, Verwirrtheit, mit zum Teil schweren Verlaufsformen.

Onar<sup>®</sup>Lp ist ein *in vitro* Testsystem zum quantitativen Nachweis von *Legionella pneumophila* in klinischen Proben. Im Vergleich zu immunologischen Methoden, mit denen sich eine primär atypische Pneumonie erst 2 bis 3 Wochen nach der Infektion nachweisen lässt, hat sich der PCR-basierte Erregernachweis insbesondere in der Frühdiagnostik bewährt. Gegenüber dem Nachweis mittels Kulturplatten zeichnet sich die PCR durch eine kürzere Analysedauer und höhere Sensitivität aus.

Der direkte Nachweis von *Legionella pneumophila* ist innerhalb von 1-2 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. Ausführliche Studien belegen die hohe Spezifität und Sensitivität von Onar<sup>®</sup>Lp, wodurch *Legionella pneumophila* Infektionen frühzeitig erkennbar werden.

## TESTPRINZIP

Das amplifizierte *mip* Gen ist innerhalb der Art *Legionella* hoch konserviert. Es werden alle *L. pneumophila* Serogruppen 1-14 und 16 detektiert. Kreuzaktivitäten zu Kommensalen des Rachenraums und anderen Krankheitserregern in den Atemwegen, z.B. Bordetellen, Chlamydien, Mycoplasmen, Mykobakterien, Pseudomonaden und Streptokokken sind nicht bekannt. Das Detektionslimit liegt bei 10 Genomäquivalenten pro PCR. Durch den breiten linearen Messbereich sind mit Onar<sup>®</sup>Lp zuverlässige Ergebnisse ohne eine zeitaufwendige Konditionierung des Probenmaterials möglich. Die Proben sind im Vergleich zum Antigentest deutlich stabiler.

Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* enthält dUTP statt dTTP, so dass die Option besteht verschleppte Amplifikate aus vorangegangenen Analysen durch Einsatz von Uracil-DNA Glycosylase (UNG) abzubauen und somit das Auftreten falsch positiver Ergebnis minimiert werden kann. UNG ist nicht Bestandteil von Onar<sup>®</sup>Lp.

## ENTHALTENE REAGENZIEN

Jedes Kit enthält Reagenzien für 25, 100 oder 250 Reaktionen. Das Verfallsdatum der ungeöffneten Packung ist auf dem Außenetikett vermerkt. Die Lagerung der Reagenzien 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](http://www.minerva-biolabs.com)).

Reagenz Bezeichnung	Anzahl			Deckelfarbe
	25 Reaktionen Art. Nr. 21-3025	100 Reaktionen Art. Nr. 21-3100	250 Reaktionen Art. Nr. 21-3250	
Lp Mix	1 x lyophilisiert	4 x lyophilisiert	10 x lyophilisiert	rot
Rehydration Buffer	1 x 1,8 ml	1 x 1,8 ml	2 x 1,8 ml	blau
Positive Control DNA	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	grün
Internal Control DNA	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	2 x lyophilisiert	gelb
PCR grade Water	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	weiß

## BENÖTIGTES, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Das Onar®Lp Kit enthält die Reagenzien für den spezifischen Nachweis von *Legionella pneumophila*. Allgemein übliche Verbrauchsmaterialien und Reagenzien eines PCR Labors sind nicht enthalten. Dazu zählen:

- qPCR-Gerät mit Filtersets für die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe FAM™ und ROX™
- PCR-Reaktionsgefäße, passend für das qPCR-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)
- Optional: Zur Kalibrierung empfehlen wir die Mitführung einer Verdünnungsreihe des *Legionella pneumophila* DNA Quantification Standards (Cat.-No. 52-0101).

## PROBENMATERIAL

Zur Vermeidung einer Inhibition der PCR sollten die Proben in geeigneter Weise vorbereitet werden. Das Kit wurde mit den folgenden Extraktionsverfahren für Abstrichtupfer und Sputum validiert:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (Art.Nr. 56-1100)
- Qiagen, QIAmp DNA Mini Kit (Art.Nr. 51 304), Protokoll für *Swab Samples*

*Legionella pneumophila* siedelt hauptsächlich auf den Schleimhäuten der Atemwege. Gute Erfahrungen wurden mit dem direkten Einsatz von ausgewaschenen Rachenabstrichen gemacht. Die Abstrichtupfer sollten nicht länger als 6 Stunden ungekühlt und nicht länger als 48 Stunden gekühlt transportiert worden sein. Besonders geeignet sind trockene Tupfer aus Dacron® oder Kunstfaser:

1. 200 µl Auswaschpuffer (10 mM Tris.HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, 0,5 % Tween20) oder Swab Wash Buffer (Minerva Biolabs, Art. Nr. 57-1100) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (DNA-frei) vorlegen.
2. Tupfer in den Auswaschpuffer stecken und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen
3. Tupfer an der Seitenwand des Reaktionsgefäßes ausdrücken.
4. Eluat direkt in den Test einsetzen

Die Qualität des Rachenabstrichs durch den Einsender und die Art des verwendeten Abstrichtupfers beeinflusst unkontrollierbar die Menge enthaltener Begleitsubstanzen und damit direkt die Qualität des Probenmaterials. Die Methode kann daher nicht allgemeingültig validiert werden. DNA-Extrakte und Eluate aus Abstrichtupfern lassen sich 6 Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahren. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von < -18 °C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

## VORSICHTSMAßNAHMEN

Zur in vitro Diagnostik.

Dieses Kit sollte nur von geschulten Personen verwendet werden.

Alle Patientenproben sollten als potentiell infektiös betrachtet und nach den lokalen oder nationalen Vorschriften behandelt werden.

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

## TESTDURCHFÜHRUNG

Der Test sollte mit Negativ- und Positivkontrollen sowie den Patientenproben in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Zur Quantifizierung ist eine Verdünnungsreihe eines geeigneten Standards (z. B. Art. Nr. 52-0101) mitzuführen. Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf +2 bis +8 °C gebracht werden.

## 1. Rehydratisierung der Reagenzien

Nach Rekonstitution können die Reagenzien bei 2 bis 8 °C bis zu 4 Tage oder bei < -18 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden und die rekonstituierten Kontrollreagenzien (Interne Amplifikationskontrolle und die Positivkontrolle) ggf. aliquotiert gelagert werden.

1.	Lp Mix Internal Control Positive Control	Deckel rot Deckel gelb Deckel grün	Alle Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugieren.
2.	Lp Mix	Deckel rot	Zugabe von 365 µl Rehydratisierungspuffer (Deckel blau)
3.	Internal Control	Deckel gelb	Zugabe von 300 µl PCR grade Water (Deckel weiß)
4.	Positive Control	Deckel grün	Zugabe von 300 µl PCR grade Water (Deckel weiß)
5.	Lp Mix Internal Control Positive Control	Deckel rot Deckel gelb Deckel grün	5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
6.	Lp Mix Internal Control Positive Control	Deckel rot Deckel gelb Deckel grün	DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

## 2. Herstellung des Mastermixes

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

1.		für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen
	Lp Mix	15,0 µl	350,0 µl
	Internal Control DNA	1,0 µl	25,0 µl
2.	Reaktionsmix durch Schnippen des Gefäßes vorsichtig mischen.		
3.	In jedes PCR-Reaktionsgefäße 15 µl geben. Überschuss verwerfen		

## 3. Beschickung der Testansätze

- Negativkontrolle:  
Zugabe von wahlweise 10 µl Elutionspuffer der verwendeten DNA-Extraktion (vgl. Kapitel Probenmaterial) oder PCR Grade Water (Deckel weiß)
- Probe: Zugabe von jeweils 10 µl
- Positivkontrolle: Zugabe von jeweils 10 µl Positive Control (Deckel grün)
- Testansätze kurz zentrifugieren, in den Thermocycler stellen und Programm starten.

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

- Beladung des Cyclers, dabei festen Sitz der PCR-Gefäße in den Gefäßaufnahmen des Gerätes und der Deckel auf den PCR-Gefäßen überprüfen.
- Programmierung des PCR-Geräts oder Überprüfung gespeicherter Temperaturprofile (siehe Anhang für Temperaturprofile marktgängiger qPCR-Geräte; Protokolle für weitere qPCR-Geräte sind auf Anfrage verfügbar)
- Start des PCR-Geräts und Aufzeichnung der Messdaten.

## 4. Start der Reaktion

- Speichern der Daten nach Beendigung des Programms
- Auslesen der Kanäle für die Fluoreszenzfarbstoffe FAM™ und ROX™  
Darstellung der Daten als 2. Ableitung
- Ermittlung der Ct-Werte für die Negativkontrollen, die Positivkontrollen und die Proben
- Auswertung unter Beachtung der labor- und gerätespezifischen Referenzbereiche

## 5. Darstellung der Testergebnisse

### Referenzbereiche für ausgewählte qPCR-Geräte:

qPCR-Gerät	Hersteller	Bewertung des <i>threshold cycle</i>		
		positiv	grenzwertig	negativ
LightCycler® 1.2	Roche Diagnostics	< 40	≥ 40	kein Ct
ABI Prism® 7500	Applied Biosystems	< 40	≥ 40	kein Ct
Rotor-Gene® 6000	Corbett Research	< 40	≥ 40	kein Ct
Mx3005P®	Agilent Technologies	< 40	≥ 40	kein Ct

## ANMERKUNGEN ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

1. Diese Gebrauchsinformation muss für eine erfolgreiche Benutzung des Onar<sup>®</sup>Lp 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. Inhibitionen können durch die Probenmatrix direkt aber auch durch den Probenelutionspuffer anderer DNA-Extraktionskits als der Empfohlenen verursacht werden. Die Negativkontrollen sollten daher immer mit dem verwendeten Probenelutionspuffer komplettiert werden.
4. Je Ansatz sollte mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt werden, die auch die Probenaufbereitung berücksichtigt. Die Mitführung einer Positivkontrolle erleichtert die Auswertung. Typische Ct-Werte für die Interne Kontrolle und die Positivkontrolle werden auf dem *Certificate of Analysis* ausgewiesen und können zur orientierenden Qualitätskontrolle dienen.
5. 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 LOD<sub>95</sub>) Niveau herzustellen bzw. kommerzielle Kontrollen, z.B. Minerva Biolabs *Quantification Standard Legionella pneumophila* (Art. Nr. 52-0101), zu verwenden. Eine Teilnahme an externen Qualitätskontrollprogrammen, wie z.B. von der INSTAND e. V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V. angeboten, wird empfohlen.

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Wie bei allen diagnostischen Tests darf die endgültige klinische Beurteilung nicht auf den Resultaten eines einzelnen Tests beruhen, sondern sollte vom Arzt erst nach der Evaluation aller klinischen Daten und Laborbefunde erfolgen.

Die hier angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereich für die Ct-Werte der Kontrollen und den Nachweisbereich erstellen.

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

Nachweis von <i>Legionella pneumophila</i> FAM <sup>™</sup> -Kanal	Interne Kontrolle ROX <sup>™</sup> -Kanal	Interpretation
positiv	irrelevant	<i>Legionella pneumophila</i> positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negativ	positiv	<i>Legionella pneumophila</i> negativ

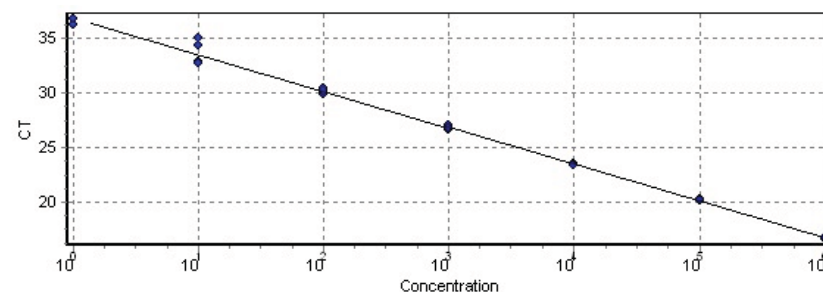
## LEISTUNGSDATEN

Die Präzision des Onar<sup>®</sup>Lp wurde unter Verwendung genomischer DNA Präparationen (*Legionella pneumophila*) bei verschiedenen Konzentrationen auf einem RotorGene<sup>®</sup> 6000 Instrument ermittelt.

Die dargestellte Intraassay Variation basiert auf der Streuung der Ct-Werte von Proben gleicher Konzentrationen innerhalb eines Testansatzes mit je 4 Replikaten pro Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert des Variationskoeffizienten (VK) aus 5 Wiederholungen. Die dargestellte Interassay Variation basiert auf der Streuung der Ct-Werte von Proben gleicher Konzentrationen aus zwei unabhängigen Testansätzen mit je 4 Replikaten pro Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert des VK aus 3 Wiederholungen.

Konzentrationsniveau [GE/PCR]	Intraassay Varianz VK [%]	Interassay Varianz VK [%]	Chargen Varianz VK [%]
10	2,51	5,27	4,08
100	0,90	1,97	2,97
1000	0,37	1,73	2,80
10000	0,46	1,86	2,93
100000	0,45	2,12	3,50
1000000	0,29	2,14	4,87
10000000	0,33	1,21	2,07

Eine typische Standardkurve für Onar<sup>®</sup>Lp ist unten dargestellt. Die Linearregression wurde aus 4 Replikaten je Verdünnungsstufe (von 1 bis 10<sup>6</sup> GE/PCR) mit dem RotorGene<sup>®</sup> 6000 ermittelt.



- Analytische Sensitivität: 2 GE/ $\mu$ l
- Analytische Spezifität: 100% für *Legionella pneumophila* SG 1-14 und SG 16  
Keine Kreuzreaktivität mit anderen *Legionella*-Spezies, relevanten Kommensalen oder DNA humanem Ursprungs
- Linearität: 50 bis 10<sup>6</sup> GE-PCR
- Pipettierzeiten < 60 Minuten ohne Einfluss
- Lagerung der Komponenten nach Rehydratisierung bei 2 bis 8 °C  $\leq$  4 d ohne Einfluss

## Anhang: Programmierung und Datenerfassung verschiedener qPCR-Geräte

### 1. LightCycler® 1.2, 1.5, 2.0 und 480

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen	1
Analysemodus	None
<b>Temperaturprofil</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

#### LightCycler® 2.0:

**Bitte achten Sie bei der Programmierung auf die Einstellung der „Seek Temperature“, diese sollte auf mindestens 90 °C eingestellt sein.**

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen	45
Analysemodus	Quantification

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

#### Programmschritt 3: Kühlung

Zyklen	1
Analysemodus	None
<b>Temperaturprofil</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

### Auswertung der Rohdaten:

- Es erfolgt zunächst die Auswahl der Fluoreszenzkanäle F1 und F2 bzw. Channel 1 und 3
- Zur Darstellung der Amplifikationskurven und den probenspezifischen *ct*-Werten wird auf *Quantification* geklickt.
- Der Threshold wird von der Software automatisch gelegt.
- Amplifikationskurven ohne signifikanten Anstieg sind als negativ zu werten.

Target	<i>L. pneumophila</i>	Interne Kontrolle
Kanäle beim LC 1.2, 1.5	F1 (530)	F2 (640)
Kanäle bei LC 2.0, 480	Channel 1 (530)	Channel 3 (610)

### 2. Rotorgene® 6000 (5-plex)

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min

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

**Legionella pneumophila: Green (470-510 nm)**  
**Interne Kontrolle: Orange (585-610 nm)**

#### Programmschritt 2: Amplifikation

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

### Auswertung der Rohdaten:

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

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

### 3. ABI Prism® 7500

#### Detektoreinstellungen:

für die Target-DNA Sonde: Reporter - FAM™, Quencher - none

für die Interne Kontroll-Sonde: Reporter - ROX™, Quencher - none

Die ROX™-Referenz-Funktion muss ausgeschaltet sein.

Beide Detektoren müssen für jedes verwendete Reaktionsgefäß aktiviert werden.

Die Fluoreszenzmessung erfolgt während der Extension.

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen	45
Einstellung	Cycle
Denaturierung	95 °C für 30 sek
Annealing	55 °C für 30 sek
Extension	60 °C für 45 sek

#### Auswertung der Rohdaten:

- Die Grundeinstellungen erfolgen in der rechten Funktionsleiste:

Data: Delta RN vs. Cycle

Detector: FAM™ und ROX™

Line Color: Well Color

target	<b>L. pneumophila</b>	<b>Interne Kontrolle</b>
Kanal	FAM™	ROX™

- Mit der rechten Maustaste öffnet sich ein neues Fenster, dort erfolgt die Einstellung der *Graph settings*

Folgende Einstellungen sollten dort angewählt und im Anschluß mit *ok* bestätigt werden:

Real Time Settings: Linear

Y-Axis Post Run Settings: Linear und Auto Scale

X-Axis Post Run Settings: Auto Scale

Display Options: 2

- Zur Berechnung der *ct*-Werte und deren Darstellung im Report bitte auf *Analyze* klicken.
- Der Threshold sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Proben ohne ausgewiesenen *ct*-Wert sind als negativ zu werten.

### 4. Mx3005P®

- im Setupmenü, Reiter „Plate Setup“ die belegten Wells markieren
- unter Collect Fluorescence Data FAM™ und ROX™ auswählen
- Reference Dye of „none“ setzen entsprechend Grundeinstellung
- unter „well type“ können die Art der Probe (Negativ- oder Positivkontrolle, Probe, Standard) spezifiziert werden
- Eingabe des Temperaturprofils unter Reiter „Thermal Profile Design“:
  - Segment 1 (Pre-Melt): 2 min, 95 °C
  - Segment 2: 30 sec, 95 °C  
30 sec, 55 °C - data collection end  
45 sec, 60 °C - data collection end  
45 Zyklen
- Unter Menü „Run“ im Fenster „Run Status“ auf „Start“ klicken

#### Auswertung der Rohdaten:

- im Menü „Analysis“ auf Reiter „Analysis Selection/Setup“ zu analysierende Positionen markieren
- im Fenster „algorithm enhancement“ müssen die Optionen:
  - Amplification-based threshold
  - Adaptive baseline
  - Moving averageaktiviert sein
- auf Reiter „Results“ und „Amplification Plots“ den Threshold automatisch setzen und die *Ct*-Werte unter „Text Report“ ablesen

## INDICATION

The Onar<sup>®</sup>Lp test system is an in vitro test for quantitative diagnosis of *Legionella pneumophila* in clinical samples.

## EXPLANATION OF THE TEST

*Legionella pneumophila* is ubiquitous in surface water and moist soil and is known as an opportunistic pathogen of Legionnaires' disease and Pontiac fever. The incubation period is 20-10 days. The airborne transmission is unlikely. Typical symptoms of Legionnaires' disease include high fever, cough, chest pain, diarrhea, confusion, some with severe cases.

Onar<sup>®</sup>Lp is an in vitro assay for the quantitative detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. Compared to immunological methods that can detect a primary atypical pneumonia first 2 to 3 weeks after infection, the PCR-based detection of pathogens has proven especially helpful in the early diagnosis. Compared with the detection by culture, PCR is characterized by a shorter analysis time and higher sensitivity.

The direct detection of *Legionella pneumophila* is possible within 1-2 hours. The kits were designed under the aspect of high practicality and ease of use. This ensures high accuracy and reproducibility of the assay. Extensive studies demonstrate the high specificity and sensitivity of Onar<sup>®</sup>Lp, required for the early identification of *Legionella pneumophila* infections.

## TEST PRINCIPLE

The amplified *mip* gene is highly conserved within the species *Legionella*. It allows detection of all *L. pneumophila* serogroups 1-14 and 16. Cross activities to commensals of the oropharynx and other pathogens in the respiratory tract, eg bordetella, chlamydia, mycoplasma, mycobacteria, pseudomonas and streptococci are not known. The detection limit is 10 genome equivalents per PCR. Because of the wide linear range reliable results without a time-consuming conditioning of the sample material are possible with Onar<sup>®</sup>Lp. The samples are compared to the antigen test significantly more stable.

Onar<sup>®</sup>Lp contains the nucleotide dUTP instead of dTTP. The heat-labile Uracil-DNA Glycosylase (UNG) is suitable to prevent carry-over contamination between PCRs. This technique relies on the incorporation of deoxyuridine triphosphate (dUTP) during all amplified reactions and the pretreatment of all successive PCR mixtures with the heat-labile UNG. UNG is not provided with Onar<sup>®</sup>Lp.

## REAGENTS

Each kit contains reagents for 25, 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](http://www.minerva-biolabs.com)).

Kit Component Label Information	Quantity			Cap Color
	25 reactions Order No. 21-3025	100 reactions Order No. 21-3100	250 reactions Order No. 21-3250	
Lp Mix	1 x lyophilized	4 x lyophilized	10 x lyophilized	red
Rehydration Buffer	1 x 1.8 ml	1 x 1.8 ml	2 x 1.8 ml	blue
Positive Control DNA	1 x lyophilized	1 x lyophilized	1 x lyophilized	green
Internal Control DNA	1 x lyophilized	1 x lyophilized	2 x lyophilized	yellow
PCR grade Water	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	white

## NEEDED, BUT NOT INCLUDED IN THE KIT

The Onar<sup>®</sup>Lp kit contains the reagents for the specific detection of *Legionella pneumophila*. General industrial supplies and reagents, usually available PCR laboratories are not included:

- qPCR device with filter sets for the detection of the fluorescence dyes FAM<sup>™</sup> and ROX<sup>™</sup>
- PCR reaction tubes for the specific qPCR 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 und 1000 µl)
- Optional: For calibration we recommend our *Legionella pneumophila* DNA Quantification Standard (Cat.-No. 52-0101).

## SPECIMEN

To avoid inhibition of PCR, samples should be appropriately prepared. The assay was validated using the following extraction procedures for swab and sputum:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (No. 56-1100)
- Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit (No. 51 304), Protocol for Swab Samples

Good experiences were made with the direct use of swabs squeezed in an appropriate buffer solution. The swab should not be stored for longer than 6 hours without and not longer than 48 hours with refrigeration. Particularly suitable are dry swab from Dacron® or synthetic fibers

- |    |   |
|----|---|
| 1. | Pipette 200 µl wash buffer (10 mM Tris.HCl pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5 % Tween20) or Swab Wash Buffer (Minerva Biolabs, Order No. 57-1100) into a 1.5 ml reaction tube |
| 2. | Stick the swab into the buffer, incubate for 5 min at room temperature  |
| 3. | Squeeze out the buffer by pressing the swab against the inner wall of the reaction tube   |
| 4. | Use the eluate directly for PCR   |

The quality of the smear taken by the sender and the type of swab used may have uncontrollable influences on the amount of accompanied substances and thus on the quality of the sample material. It is not possible to validate this practicable method universally and in appropriate detail. DNA extracts and eluates 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.

#### PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use. This kit should be used only by trained persons. All samples should be considered potentially infectious and handled at the local or national regulations. This kit does not contain hazardous substances and may be disposed of according to local regulations.

#### TEST PROCEDURE

The test should be carried out with negative and positive controls and patient samples in duplicate. For quantification, a dilution series of an appropriate standard (Cat. No. 52-0101) is kept. 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 2 to 8 °C for up to 4 days or below -18 °C till the expiration date stated on the box label. Repeated freezing and thawing should be avoided and reconstituted controls (internal amplification control and the positive control) stored in aliquots.

1.	<i>Lp</i> Mix Internal Control Positive Control	red cap yellow cap green cap	Spin all lyophilized components for 5 sec at maximum speed of the mini centrifuge
2.	<i>Lp</i> Mix	red cap	Add 365 µl rehydration buffer (blue cap)
3.	Internal Control	yellow cap	Add 300 µl PCR grade Water (white cap)
4.	Positive Control	green cap	Add 300 µl PCR grade Water (white cap)
5.	<i>Lp</i> Mix Internal Control Positive Control	red cap yellow cap green cap	Incubate 5 min at room temperature
6.	<i>Lp</i> Mix Internal Control Positive Control	red cap yellow cap green cap	Vortex DNA briefly and spin for 5 sec

#### 2. Preparation of the Reaction Mix

Prepare the required amount of master mix at room temperature in a 1.5 ml reaction tube for all control and test reactions.			
1.		for 1 reaction	for 25 reactions
	<i>Lp</i> Mix	15.0 µl	350.0 µl
	Internal Control DNA	1.0 µl	25.0 µl
2.	Homogenize the reaction mix by carefully snapping the tube		
3.	Add 15 µl to each PCR tube, discard remaining material.		

### 3. Loading the test tubes

- Negative Control:
1. Add 10 µl elution buffer from DNA extraction (ref. Chapter sample material) or PCR Grade Water (white cap).
  2. Sample: Add 10 µl of each sample.
  3. Positive Control: Add 10 µl Positive Control (green cap).
  4. Spin all PCR tubes briefly, load the qPCR cyclers and start the program.

Preparation of the master mix and sample loading should not take more than 45 minutes to avoid a reduction in the fluorescent signal. The pipetting sequence should be respected and the tubes closed after each sample load.

### 4. Starting the reaction

1. Load the cycler, check each PCR tube and the cycler lid for tight fit.
2. Program the qPCR cycler or check stored temperature profiles. See Appendix for temperature profiles of selected qPCR cyclers. Programs for additional cyclers might be available on request.
3. Start the program and data reading.

### 5. Result reading

1. Save the data at the end of the run.
2. Read the channels for the fluorescence dyes FAM™ and ROX™ and show the 2nd deviation of the data.
3. Read the calculation of the Ct values for the negative controls, the positive controls and the samples.
4. Evaluate in accordance with the laboratory and instrument-specific reference ranges.

#### Reference range for selected qPCR devices:

qPCR device	Manufacturer	Evaluating the threshold cycle		
		positive	borderline	negative
LightCycler® 1.2	Roche Diagnostics	< 40	≥ 40	no Ct
ABI Prism® 7500	Applied Biosystems	< 40	≥ 40	no Ct
RotorGene® 6000	Corbett Research	< 40	≥ 40	no Ct
Mx3005P®	Agilent Technologies	< 40	≥ 40	no Ct

### NOTES ON THE TEST PROCEDURE

1. This leaflet must be widely understood for a successful use of Onar®Lp. 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. 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 sample elution buffer.
4. For each test setup, at least one negative control may be included also including sample preparation. Positive controls facilitate the evaluation of the test. Typical Ct values for the internal control and positive control are shown on the Certificate of Analysis and can be used for orienting quality control.
5. 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 LOD<sub>95</sub>) level or establish commercial controls, for example, Minerva Biolabs Quantification Standard *Legionella pneumophila* (Order No. 52-0101). Participation in external quality control programs, such as offered by the INSTAND e.V., the Society for the promotion of quality assurance in medical laboratories, is recommended.

### INTERPRETATION OF RESULTS

As with all diagnostic tests the final clinical assessment should not be based on the results of a single test, but should be done by doctors only after the evaluation of all clinical and laboratory findings. The values given here are only a guide. Each laboratory should establish its own reference range for the Ct values of controls and samples.

The presence of *Legionella pneumophila* in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the target channel. When using the internal control, an error-free PCR is indicated by an increasing fluorescence signal in the channel for internal control. The Internal control is present at a very low concentration that it is no longer amplified at high concentrations of target DNA. A successful PCR is then detected by the signal in the target channel.

Detection of <i>Legionella pneumophila</i> FAM™ channel	Internal control ROX™ channel	interpretation
positive	irrelevant	<i>Legionella pneumophila</i> positive
negative	negative	PCR inhibition
negative	positive	<i>Legionella pneumophila</i> negative

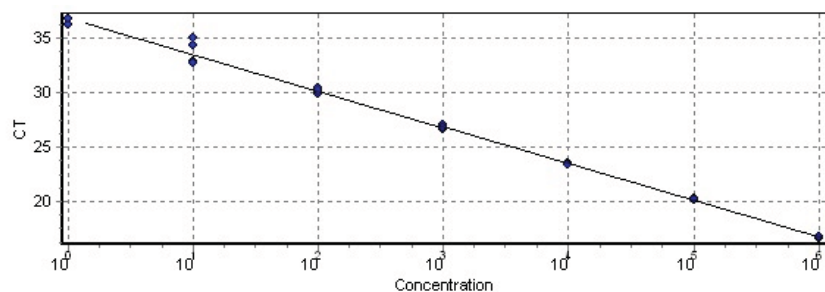
## ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE TEST

The precision of the Onar<sup>®</sup>Lp was determined using genomic DNA preparations (*Legionella pneumophila*) at different concentrations generated on a RotorGene<sup>®</sup> 6000 instrument.

The intra-assay variation shown is based on the scattering of the Ct values of samples of the same concentrations within a test batch, each with four replicates per concentration. Given is the mean coefficient of variation (CV) from five repetitions. The inter-assay variation shown is based on the scattering of the Ct values from samples of equal concentrations of two independent assays, each with four replicates per concentration. Given is the average of the retail price of 3 reps.

Concentration [GU/PCR]	Intraassay Variation VC [%]	Interassay Variation VC [%]	Lot Variation VC [%]
10	2,51	5,27	4,08
100	0,90	1,97	2,97
1000	0,37	1,73	2,80
10000	0,46	1,86	2,93
100000	0,45	2,12	3,50
1000000	0,29	2,14	4,87
10000000	0,33	1,21	2,07

A typical standard curve for Onar<sup>®</sup>Lp is shown below. The linear regression was determined from four replicates per dilution level (1 to 10<sup>6</sup> GU/PCR) with the RotorGene<sup>®</sup> 6000.



Analytical Sensitivity: 2 GU/μl

Analytical Specificity: 100 % for *Legionella pneumophila* sero group 1-14 and 16

No cross reactivity with other *Legionella* species, relevant commensals or DNA of human origin

Linearity 50 to 10<sup>6</sup> GU/PCR

Pipetting time < 60 minutes without influence

Storage of components after rehydration at 2 to 8 °C up to 4 days without effect

## Appendix: Programming and data recording devices of different qPCR

### 1. LightCycler<sup>®</sup> 1.2, 1.5, 2.0 and 480

#### Program 1: Pre-incubation

Cycles	1
Analysis Mode	None
<b>Temperature Targets</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

#### LightCycler<sup>®</sup> 2.0:

**Please check the correct settings for the „seek temperature“, this should be adjusted on at least 90°C.**

#### Program 2: Amplification

Cycles	45			
Analysis Mode	Quantification			
<b>Temperature Targets</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

#### Program 3: Cooling

Cycles	1
Analysis Mode	None
<b>Temperature Targets</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

#### Result Reading:

- Select the fluorescence channels F1 and F2 or Channel 1 and 3 at the LC 2.0
- Click on *Quantification* to generate the amplification plots and the specific ct-values
- The threshold will be generated automatically.
- Samples showing no significant increase in the amplification plot can be considered as negative.

target	<i>L. pneumophila</i>	Internal control
channel for LC 1.2, 1.5	F1 (530)	F2 (640)
channel for LC 2.0, 480	channel 1 (530)	channel 3 (610)

## 2. RotorGene® 6000 (5-plex)

#### Program Step 1: Pre-incubation

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

**Please check the correct settings for the filter combination:**  
**green filter (470-510): *Legionella pneumophila***  
**filter orange (585-610): internal control**

#### Program Step 2: Amplification

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

#### Result Reading:

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

## 3. ABI Prism® 7500

#### Detector Settings:

*Legionella* Target Probe: Reporter - FAM™, Quencher - none  
Internal Control Probe: Reporter - ROX™, Quencher - none

**The ROX™ Reference needs to be disabled. Activate both detectors for each well.**  
**Measurement of fluorescence during extension.**

#### Program Step 1: Pre-incubation

Setting	Hold
Temperature	95 °C
Incubation time	3:00 min

#### Program Step 2: Amplification

Cycles	45
Setting	Cycle
Denaturing	95 °C für 30 sek
Annealing	55 °C für 30 sek
Extension	60 °C für 45 sek

#### Result Reading:

- Enter the following basic setting at the right task bar:

Data:	Delta RN vs. Cycle	Target	<i>L. pneumophila</i>	Internal Control
Detector:	FAM™ and ROX™	Channel	FAM™	ROX™
Line Color:	Well Color			

- Open a new window with for the *Graph settings* by clicking the right mouse button  
Select the following setting and confirm with *ok*:  
Real Time Settings: Linear  
Y-Axis Post Run Settings: Linear and Auto Scale  
X-Axis Post Run Settings: Auto Scale  
Display Options: 2
- Initiate the calculation of the ct-values and the graph generation by clicking on *Analyze* within the report window.
- Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- Samples showing no ct-value can be considered as negative.

#### 4. Mx3005P®

- Mark the wells in use in the setup menu, tab “Plate Setup”
- Select FAM™ und ROX™ for “Collect Fluorescence Data”
- Check that the Reference Dye function is set to “none” according to the ground settings of the device
- Specify the type of sample (negative control, positive control, standards, sample) by using the tab “well type”
- Program the temperature profile by using the tab “Thermal Profile Design”:
  - Segment 1 (Pre-Melt): 2 min, 95 °C
  - Segment 2:
    - 30 sec, 95 °C
    - 30 sec, 55 °C - data collection end
    - 45 sec, 60 °C - data collection end
    - 45 cycles
- Start the program in the menu “Run” by clicking on “Start” in the window “Run Status”

#### Interpretation of the raw data:

- Select the “Analysis” menu, click the tab “Analysis Selection/Setup” and mark all positions for analysis
- Activate the following options in window “algorithm enhancement”:
  - Amplification-based threshold
  - Adaptive baseline
  - Moving average
- Set the threshold to automatic in tab “Results” and “Amplification Plots”
- Read the *Ct values* in “Text Report”

## 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.

### Limited License

The use of this product for clinical diagnostics of pathogens 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. FAM™ and ROX™ are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries. Mx3005P is a trademark of Agilent Technologies. RotorGene is a registered trademark of Qiagen GmbH. Dacron® is a registered trademark of DuPont. Onar is registered trademarks of Minerva Biolabs GmbH.

## Related Products

### MB Taq DNA Polymerase

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

### Clinical Diagnostic Kits for qPCR

20-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Mp <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25/100/250 tests
21-3025/-3100/-3250	Onar <sup>®</sup> Lp <i>Legionella pneumophila</i>	25/100/250 tests
22-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> MRSA Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	25/100/250 tests
23-2025/-2100	Onar <sup>®</sup> Syphilis <i>Treponema pallidum</i>	25/100 tests
24-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ct <i>Chlamydia trachomatis</i>	25/100/250 tests
25-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Pertussis <i>Bordetella pertussis/parapertussis</i>	25/100/250 tests

### Quantification Standards, 100 $\mu$ l each, 1x10<sup>8</sup> genomes/ $\mu$ l

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard
52-0119	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard

### Genomic DNA Extracts, 100 $\mu$ l each, +/- 10 ng / 100 $\mu$ l

51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566
51-5571	<i>Bordetella pertussis</i> , DSMZ 5571
51-3415	<i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415
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
---------	-----------------------	-----------------

Letzte fachliche Überarbeitung: August 2011

Last technical revision: August 2011



## Manufacturer

---

Minerva Biolabs GmbH  
Koeppenicker 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™