

Aqua Screen®

Legionella Detection Kit for qPCR - Type 1 & 2-

Inhaltsverzeichnis

1. Produkthinweise	2
1.1 Enthaltene Reagenzien	2
1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien	2
1.3 Benötigte Materialien	2
2. Anwendungsgebiete und Testprinzip	3
3. Durchführung	3
3.1 Probenentnahme und Lagerung	3
3.2 Rehydratisierung der Reagenzien	3
3.3 Programmierung und Auswertung	4
3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0 (für Kits vom Typ 1)	4
3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex) (für Kits vom Typ 1)	5
3.3.3 ABI 7500 (für Kits vom Typ 2)	6
3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)	7
3.5 Interpretation der Ergebnisse	7

Contents

1. General Advice	8
1.1 Test Kit Components	8
1.2 Stability and Storage	8
1.3 Supplemental Requirements	8
2. Application and Test Principle	9
3. Test Protocol	9
3.1 Specimen Collection and Sample Storage	9
3.2 Rehydration of the Reagents	9
3.3 Experimental Protocol and Result Reading	10
3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0 (for type 1 kits)	10
3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex) (for type 1 kits)	11
3.3.3 ABI 7500 (for type 2 kits)	12
3.4 PCR Master Mix Setup	13
3.5 Result Interpretation	13
Appendix	14

1. Produkthinweise

Bitte verwenden Sie das Produkt und Einzelkomponenten nicht mehr nach Ablauf der Haltbarkeit. Verwerfen Sie bitte überschüssige Einzelkomponenten.

1.1 Enthaltene Reagenzien

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN-Mix)</i> Primer, Sonden und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert	roter Verschluss
<i>Rehydration Buffer</i> 1,8 ml	blauer Verschluss
<i>Positive Control DNA</i> DNA-Fragmente des Genoms von <i>Legionella pneumophila</i> , mittels PCR hergestellt, nicht infektiös, lyophilisiert	grüner Verschluss
<i>Internal Control DNA</i> Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert	gelber Verschluss
<i>PCR grade Water</i> 2 ml, Wasser zur Rehydratisierung der Komponenten und zur Herstellung des Mastermixes	weißer Verschluss

1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

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

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

- qPCR-Gerät (Kompatibilität siehe Seite 7)
- geeignete PCR Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen (1 - 1000µl)
- *Taq* DNA Polymerase (1 Unit/Test, 5 units/µl)

Dieser Kit wurde mit unserer MB *Taq* DNA Polymerase validiert (Cat # 53-0050; 53-0100; 53-0200; 53-0250). Bei der Verwendung anderer Polymerasen mit unserem Kit können wir weder hohe Sensitivität noch Kompatibilität garantieren. Sollten Sie unsere MB *Taq* DNA-Polymerase im Vergleich mit Ihrer eigenen Polymerase testen wollen, fordern Sie bitte ein kostenfreies MB *Taq* Testmuster (10 Units) an. Bei der Verwendung anderer Polymerasen muss eventuell, der Polymerase spezifische Reaktionspuffer verwendet.

2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Diese Aqua Screen® PCR Einheit ist ein Testsystem zur quantitativen Detektion von *Legionella pneumophila* in Wasserproben. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die mitgelieferten Primer sind für einen Abschnitt der *mip*-kodierenden Region des *Legionella pneumophila* Genoms spezifisch. Innerhalb des amplifizierten Produktes bindet eine spezifische Sonde, deren Fluoreszenzsignal bei ~520 nm (Typ 1 und Typ 2, FAM-Filter) die Bildung des Produktes anzeigt. Das Testsystem beinhaltet außerdem eine Interne Kontrolle, die im PCR-Ansatz mitgeführt werden kann. Die interne Kontrolle liefert bei einer erfolgreichen PCR ein Produkt, das mit einer weiteren sequenzspezifischen Sonde bei ~610 nm (Typ 1, ROX-Filter) und bei ~560 nm (Typ 2, JOE/HEX/TexasRed-Filter) detektiert wird. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse, z.B. durch Inhibition ausgeschlossen werden. Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* enthält serienmäßig dUTP statt dTTP. Durch die Verwendung des hitzelabilen Enzyms Uracil-DNA Glycosylase (UNG) im PCR-Ansatz kann ein Verschleppen früherer PCR-Produkte in den neuen Reaktionsansatz vermieden werden. UNG ist nicht Bestandteil des Kits.



Dieser Kit darf nicht für die klinische Diagnostik eingesetzt werden.

3. Durchführung

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

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

3.2 Rehydratisierung der Reagenzien

1. Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung in der Tischzentrifuge zentrifugieren
2. Zugabe von 365 µl *Rehydration Buffer* zum *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. Zugabe von 300 µl *PCR grade Water* zur *Internal Control DNA* und zur *Positive Control DNA*
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. Anschließend kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren



Nach erfolgter Rehydratisierung müssen die Reagenzien bei mindestens -18 °C gelagert werden.

3.3 Programmierung und Auswertung

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

3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0 für Kits vom Typ 1

Programmschritt 1: Vorinkubation

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



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	Quantifikation

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



Segment 3 darf nicht weggelassen werden!

Programmschritt 3: Kühlung

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



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

Auswertung der Rohdaten:

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

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

3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex) für Kits vom Typ 1

Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min



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

Target (*L. pneumophila*): Green (470-510 nm)

Interne Kontrolle: Orange (585-610 nm)

Programmschritt 2: Amplifikation

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

Auswertung der Rohdaten:

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 platzieren. Die Thresholdlinie sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Im Fenster *Quant. Results* können die *ct*-Werte abgelesen werden.
- Proben, die keine *ct*-Werte zeigen sind als negativ zu werten.

3.3.3 ABI 7500 für Kits vom Typ 2

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



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

Target (Chl. tr.): FAM

Interne Kontrolle: VIC

Quencher: none

Die ROX-Referenz-Funktion muss ausgeschaltet sein. Beide Detektoren müssen für jedes verwendete Reaktionsgefäß aktiviert werden. Fluoreszenzmessung während der Extension.

Auswertung der Rohdaten:

- Die Grundeinstellungen erfolgen in der rechten Funktionsleiste:
 - Data: Delta RN vs. Cycle
 - Detector: FAM und VIC
 - Line Color: Well Color
- 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

3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

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

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen*
<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	14,0 µl	350,0 µl
<i>Internal Control DNA</i>	1,0 µl	25,0 µl
<i>Polymerase (5 U/µl)</i>	0,2 µl	5,0 µl
gesamt	15,2 µl	
+ Template DNA / NK oder PK	10,0 µl	

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



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

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

3.5 Interpretation des Ergebnisses

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

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

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

<i>L. pneumophila</i> PCR	Internal Control	Interpretation
positiv	irrelevant	<i>L. pneumophila</i> positiv
negativ	negativ	PCR Inhibition
negativ	positiv	<i>L. pneumophila</i> negativ

1. Reagents and Materials

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

1.1 Test Kit Components

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN Mix)</i> Primer set, probes and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized	red cap
<i>Rehydration Buffer</i> 1.8 ml	blue cap
<i>Positive Control DNA</i> Fragment of <i>Legionella pneumophila</i> DNA prepared by PCR, non-infectious, lyophilized	green cap
<i>Internal Control DNA</i> Plasmid DNA, non-infectious, lyophilized	yellow cap
<i>PCR Grade Water</i> 2 ml	white cap

Please find the Certificate of Analysis (CoA) on our website at www.minerva-biolabs.com.

1.2 Stability and Storage

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

1.3 Supplemental Requirements

- qPCR machine
- corresponding PCR reaction tubes
- microcentrifuge, micropipettes and filtered tips (1 - 1000 µl)
- *Taq* DNA Polymerase (1 Unit/Test, 5 units/µl)

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

2. Application and Test Principle

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

The target probe emits fluorescent light at ~520 nm (type 1 and type 2). The kit also provides internal control DNA, which can be added to the reaction. When running the PCR with the internal control DNA, a successful performed reaction with a negative result is indicated by a distinct fluorescent signal. The internal control is detected by another probe, which emits light at ~610 nm (Type 1, ROX filter) and ~560 nm (Type 2, JOE/HEX/TexasRed filter).

The kit 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 the kit.



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

3. Test Protocol

3.1 Preparation of Sample Material

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

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

3.2 Rehydration of the Reagents

1. centrifuge tubes with lyophilized components (5 sec at maximum speed)
2. add 365 µl *Rehydration Buffer* to the *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
4. add 300 µl of *PCR grade Water* to the *Internal Control DNA* and *Positive Control DNA*
3. incubate for 5 minutes at room temperature
4. vortex and centrifuge again



Store reagents below -18°C after rehydration.

3.3 Experimental Protocols and Result Reading

3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0 with type 1 kits

Program 1: Pre-incubation

Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperature Targets [°C]	Segment 1
Target Temperature [°C]	95
Incubation time [min]	2:00
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0
Step Size [°C]	0.0
Step Delay [Cycles]	0
Acquisition Mode	None



LightCycler® 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

Temperature Targets [°C]	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4
Target Temperature [°C]	95	55	60	72
Incubation time [s]	0	5	7	5
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0	20.0	20.0	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0	0	0	0
Step Size [°C]	0.0	0.0	0.0	0.0
Step Delay [Cycles]	0	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Single	None



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

Program 3: Cooling

Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperature Targets [°C]	Segment 1
Target Temperature [°C]	40
Incubation time [s]	30
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0
Step Size [°C]	0.0
Step Delay [Cycles]	0
Acquisition Mode	None



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

Result Reading:

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

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

3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)

Program Step 1: Pre-incubation

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



Please check the correct settings for the filter combination:

green filter (470-510): *L. pneumophila*
filter orange (585-610): internal control

Program Step 2: Amplification

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

Result Reading:

- Open the menu *Analysis*
- Select *Quantitation*
- Check the required filter set (green or orange) according to the following table and start data analysis by double click.
- The following windows will appear:
 - Quantitation Analysis - Cycling A (green or orange)*
 - Quant. Results - Cycling A (green or orange)*
 - Standard Curve - Cycling A (green or orange)*
- In window *Quantitation Analysis*, select first *linear scale* and then *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.

Program Step 1: Pre-incubation

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



Please check the correct settings of the detectors!

target probe: FAM

internal control: VIC

quencher: none

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

Program Step 2: Amplification

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

Result Reading:

- Enter the following basic setting at the right task bar:
 Data: Delta RN vs. Cycle
 Detector: FAM and VIC
 Line Color: Well Color
- Open a new window with for the *Graph settings* by clicking the right mouse button

target	Legionella	Internal control
channel	FAM	VIC

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.

3.4 PCR Master Mix Setup

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

	for 1 reaction	for 25 reactions-
primer/probe/nucleotide mix*	14.0 μl	350.0 μl
Internal Control DNA (yellow cap)	1.0 μl	25.0 μl
polymerase (5 U/ μl)	0.2 μl	5.0 μl
total	15.2 μl	
+ template DNA, NC or PC	10.0 μl	

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



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

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

3.5 Result Interpretation

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

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

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

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

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

Appendix

Limited Product Warranty

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

Notice to Purchaser

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

Limited License

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

Trademarks

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

Related Products

MB Taq DNA Polymerase

53-0050/-0100/-0200/-0250 MB Taq DNA Polymerase 50/100/200/250 units

Quantification Standards, 100 µl each, 1x10⁶ genomes/µl

52-0101 *Legionella pneumophila* DNA Standard

DNA Remover™

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

Aqua Screen Fast Extract Kit

32-1010/1050/1200 Extraction Kit 10/50/250 extractions

Diagnostic Kits for Conventional PCR

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

Diagnostic Kits for Real-Time PCR

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