

Art. Nr. / Order No. 34-2025/-2100/-2250

AquaScreen® *Legionella pneumophila*

PCR Detection 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

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

Der AquaScreen® *Legionella pneumophila* PCR Detection Kit dient dem quantitativen Nachweis von *Legionella pneumophila* in Trinkwasserproben, die mit dem AquaScreen® FastExtract Kit vorbereitet worden sind.

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 durch Tröpfcheninfektion beim Duschen oder Inhalation von vernebelten Wässern, wie z.B. bei Klimaanlage und Kühltürmen. Typische Symptome der Legionellose sind hohes Fieber, Husten, Thoraxschmerzen, Diarrhoe, Verwirrtheit, mit zum Teil schweren Verlaufsformen. Infektiös sind vermutlich die in Wasser lebenden Amöben als natürlicher Wirt von Legionellen.

AquaScreen® *Legionella pneumophila* PCR Detection Kit ist ein *in vitro* Testsystem zum quantitativen Nachweis von *Legionella pneumophila* in DNA-extrahierten Proben. Im Vergleich zur klassischen Kulturmethode kann der Nachweis innerhalb von 6 Stunden mit kürzere Analysedauer und ohne störende Begleitflora spezifisch ausgewertet werden.

Das Design des Kits entspricht den Vorgaben der AFNOR T90-471.

TESTPRINZIP

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 (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 (ROX-Filter) detektiert wird. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse, z.B. durch Inhibition ausgeschlossen werden. 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 im Kit enthalten.

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).

Reagenz Bezeichnung	Anzahl			Deckelfarbe
	25 Reaktionen Art. Nr. 34-2025	100 Reaktionen Art. Nr. 34-2100	250 Reaktionen Art. Nr. 34-2250	
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 Kit enthält Reagenzien für die Durchführung der Analyse. 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

Die Gewinnung des Probenmaterials ist im Handbuch des AquaScreen® *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.

VORSICHTSMAßNAHMEN

Zur in vitro Anwendung.

Dieses Kit sollte nur von geschulten Personen verwendet werden.

Alle Proben 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 Proben 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 Kits 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 LOD₉₅) Niveau herzustellen bzw. kommerzielle Kontrollen, z.B. Minerva Biolabs *Quantification Standard Legionella pneumophila* (Art. Nr. 52-0101), zu verwenden. Eine Teilnahme an externen Qualitätskontrollprogrammen wird empfohlen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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.

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

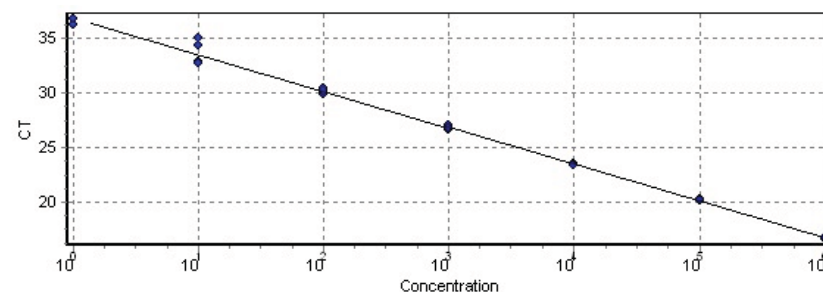
LEISTUNGSDATEN

Die Präzision des Kits wurde unter Verwendung genomischer DNA Präparationen (*Legionella pneumophila*) bei verschiedenen Konzentrationen auf einem RotorGene® 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 den Kit ist unten dargestellt. Die Linearregression wurde aus 4 Replikaten je Verdünnungsstufe (von 1 bis 10⁶ GE/PCR) mit dem RotorGene® 6000 ermittelt.



- Analytische Sensitivität: 2 GE/µl
- Analytische Spezifität: 100% für *Legionella pneumophila* SG 1-14 und SG 16
Keine Kreuzreaktivität mit anderen *Legionella*-Spezies, relevanten Begleitkeimen oder DNA humanem Ursprungs
- Linearität: 50 bis 10⁶ GE-PCR
- Pipettierzeiten < 60 Minuten ohne Einfluss
- Lagerung der Komponenten nach Rehydratisierung bei 2 bis 8 °C ≤ 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
Temperaturprofil	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	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
Temperaturprofil	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

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:

Target	<i>L. pneumophila</i>	Interne Kontrolle
Kanal	Green	Orange
Wellenlänge	470-510 nm	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:

- 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	<i>L. pneumophila</i>	Interne Kontrolle
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

AquaScreen® *Legionella pneumophila* PCR Detection Kit for the quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples, prepared with the AquaScreen® FastExtract kit.

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. Most infections occur through inhalation of aerosols bearing amoeba, the natural habitat of legionella.

AquaScreen® *Legionella pneumophila* is an in vitro assay for the quantitative detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. Compared to culture methods that can detect legionella first after a few days, the PCR-based detection of this pathogen is completed within 6 hours. PCR also allows for a higher specificity without annoying background growth simplifying result reading drastically. The quantitative result of PCR is linear up to 10⁶ particles/sample with no need for preparing dilutions of the sample material.

The design of the kit complies with the requirements of AFNOR T90-471.

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 other water born microorganisms of 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.

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 included.

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).

Kit Component Label Information	Quantity			Cap Color
	25 reactions Order No. 34-2025	100 reactions Order No. 34-2100	250 reactions Order No. 34-2250	
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 kit contains all reagents for analysis. 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™ and ROX™
- 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

The preparation of the sample material is explained in the AquaScreen® 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.

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 the kit. 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 LOD₉₅) level or establish commercial controls, for example, Minerva Biolabs Quantification Standard *Legionella pneumophila* (Order No. 52-0101). Participation in external quality control programs is recommended.

INTERPRETATION OF RESULTS

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.

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.

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

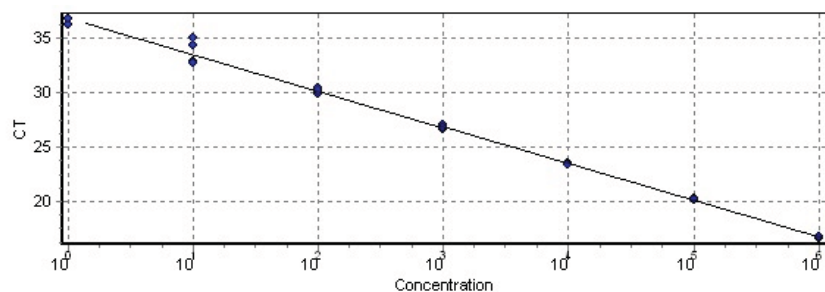
ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE TEST

The precision of the kit was determined using genomic DNA preparations (*Legionella pneumophila*) at different concentrations generated on a RotorGene® 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 is shown below. The linear regression was determined from four replicates per dilution level (1 to 10⁶ GU/PCR) with the RotorGene® 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 10⁶ 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® 1.2, 1.5, 2.0 and 480

Program 1: Pre-incubation

Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperature Targets	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	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

Program 3: Cooling

Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperature Targets	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

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

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

Please check the correct settings for the filter combination:

Target	<i>L. pneumophila</i>	Internal Control
Channel	Green	Orange
Wave length	470-510 nm	585-610 nm

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. AquaScreen is a registered trademark of Minerva Biolabs GmbH.

Related Products

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 qPCR

33-2025/-2100/-2250 AquaScreen® *Legionella specc.* 25/100/250 reactions
34-6025/-6100/-6250 AquaScreen® *TotalBacteria* 25/100/250 reactions

Manufacturer

Minerva Biolabs GmbH
Koepenicker 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

Letzte fachliche Überarbeitung: November 2011
Last technical revision: November 2011

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™