

***Legionella pneumophila* Diagnostic Kit for qPCR - Type 1 -**

Inhaltsverzeichnis

1. Reagenzien und Materialien	2
1.1 Inhalt der Packung	2
1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien	2
1.3 Benötigte Geräte und Materialien	2
2. Anwendungsgebiete und Testprinzip	3
3. Durchführung	4
3.1 Gewinnung des Probenmaterials	4
3.2 Rehydratisierung der Reagenzien	4
3.3 Programmierung und Auswertung	5
3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0	5
3.3.2 Rotogene 6000 (5-plex)	6
3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)	7
3.5 Interpretation der Ergebnisse	7
4. Fehleranalyse	8
5. Gerätekompatibilität	8

Contents

1. Reagents and Materials	9
1.1 Test Kit Components	9
1.2 Stability and Storage	9
1.3 Supplemental Requirements	9
2. Application and Test Principle	10
3. Test Protocol	11
3.1 Preparation of Sample Material	11
3.2 Rehydration of the Reagents	11
3.3 Experimental Protocol	12
3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0	12
3.3.2 Rotogene 6000 (5-plex)	13
3.4 PCR Master mix Setup	14
3.5 Result Interpretation	14
4. Trouble shooting	15
5. Instrument Compatibility	15

1. Reagenzien und Materialien

1.1 Inhalt der Packung

Arbeitsanleitung

Primer/Probe/Nucleotide Mix

Primer, Sonde und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert

roter Verschluss

REAC	B
------	---

Rehydration Buffer

Rehydratisierungspuffer, 1,8 ml

blauer Verschluss

REAC	A
------	---

Positive Control DNA

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

grüner Verschluss

CONTROL	+
---------	---

Internal Control DNA

Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert

gelber Verschluss

CONTROL	i
---------	---

PCR grade Water

2 ml

weißer Verschluss

REAC	H
------	---

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 Resuspension 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 Produktzertifikat finden Sie auf unserer Webseite (www.minerva-biolabs.com).

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

- qPCR-Gerät (Kompatibilität siehe Seite 9)
- geeignete PCR Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen (1 - 1000µl)
- MB *Taq* DNA Polymerase (1 Unit/Test)



Dieser Kit wurde mit unserer MB *Taq* DNA Polymerase validiert und erzielt mit ihr exzellente Ergebnisse (Cat # 53-0050; 53-0100; 53-0200; 53-0250).

Hinweis:

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

2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

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. Als Pontiac-Fieber wird die erstmals in Pontiac (USA) vorkommende Form der Legionellose mit grippalen Symptomen bezeichnet.

Onar[®]Lp ist ein *in vitro*-Testsystem zur qualitativen und quantitativen Diagnostik von *Legionella pneumophila* in klinischen Proben. 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 die Bildung des Produktes anzeigt. Dem Testkit liegt eine Interne Amplifikationskontrolle bei. Bei einer erfolgreich durchgeführten PCR liefert die interne Kontrolle ein Signal bei 600 nm. 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. Dazu muss in vorangegangenen PCR-Ansätzen dTTP gegen dUTP ausgetauscht worden sein und eine Behandlung der neuen Ansätze mit UNG erfolgen. Unerwünschte PCR-Vorlagen werden an den UTPs gespalten und im anschließenden Denaturierungsschritt hydrolysiert. Gleichzeitig wird das Enzym durch die Hitze inaktiviert. Native DNA wird nicht abgebaut, da es kein Uracil enthält. UNG ist nicht Bestandteil dieses Kits.

Der 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[®]Lp, wodurch *Legionella pneumophila* Infektionen frühzeitig erkennbar werden. Das gewählte Template ist innerhalb der Art *Legionella* hoch konserviert. Es werden *L. pneumophila* SG 1-14 und SG 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[®]Lp zuverlässige Ergebnisse ohne eine zeitaufwendige Konditionierung des Probenmaterials möglich. Die Proben sind im Vergleich zum Antigentest deutlich stabiler.

3. Durchführung

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Als Untersuchungsmaterialien können Nasopharyngealabstriche, Nasen- und Rachensekrete, Sputum, provoziertes Sputum, Bronchiallavage, infizierte Zellen (Zellkulturen) und Kulturen verwendet werden. Die Qualität der Probennahme beeinflusst in starkem Maße die Zuverlässigkeit der Testbefunde. Material aus den unteren Atemwegen ist für den Nachweis von *Legionella pneumophila* besonders gut geeignet. Beim Nasopharyngealsekret bietet sich die Verwendung eines dünnen Katheters und eine Vakuumpumpe mit Sekretfalle an. Die Mundhöhle kann vorab gespült und Speichel sowie Spülwasser verworfen werden. Bei einer Entnahme aus der Mundhöhle sollte vorher nicht gegessen oder gegurgelt werden. Der Tupfer wird hinter den Gaumenbögen nach oben gedreht und abgestrichen. Bei einer Entnahme über die Nasenhöhle wird der dünne Tupfer bis in den Nasopharynx geschoben und mehrfach abgestrichen. Dabei ist darauf zu achten, dass ausreichend Material entnommen wird. Anschließend wird der Tupfer in 1 ml Transferpuffer (z.B. 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,1% Natriumazid, 5% Natriumdodecylsulfat) ausgewaschen. Das Probenmaterial ist so für einige Zeit gekühlt stabil und sollte nach Möglichkeit gekühlt transportiert werden.

Zur Probenvorbereitung ist grundsätzlich eine DNA-Extraktion mit einem handelsüblichen DNA-Extraktionskit (z.B. MB DNA Extraction Kit Cat # 56-1100) empfehlenswert, um Inhibitoren der PCR sicher zu entfernen und eine Konzentrierung der Legionellen-DNA bei größeren Probenvolumina zu erreichen. Der erhaltene DNA-Extrakt kann direkt für die Onar[®]Lp-Diagnostik eingesetzt werden. Die Probe sollte eine Gesamt-DNA-Last von maximal 100 µg/ml nicht überschreiten. 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 der Tischzentrifuge zentrifugieren
2. Zugabe von 365 µl Rehydratisierungspuffer zum *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. Zugabe von DNA-freiem Wasser (im Kit enthalten)

<i>Positive Control DANN</i>	300 µl
<i>Internal Control DNA</i>	300 µl
4. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
5. DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren



Nach erfolgter Rehydratisierung müssen die Reagenzien auf Eis gehalten und 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

Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen	1
Analysemodus	None



LightCycler® 2.0:

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

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

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



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.

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

Auswertung der Rohdaten:

- Es erfolgt zunächst die Auswahl der Fluoreszenzkanäle F1 und F2 bzw. Channel 1 und 3.
- 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 (530)	F2 (640)
Kanäle bei LC 2.0	Channel 1 (530)	Channel 3 (610)

3.3.2 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 (*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.

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.

Pipettierschema:

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

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

Für andere Enzymkonzentrationen muss die Verdünnung entsprechend angepasst werden.



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. Diese 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

<i>L. pneumophila</i> PCR	Interne Kontrolle	Interpretation
positiv	irrelevant	<i>L. pneumophila</i> positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negativ	positiv	<i>L. pneumophila</i> negativ

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.

4. Fehleranalyse

Zur Fehleranalyse sollten zuerst das Thermocycler-Programm sowie das Pipettierschema überprüft werden. Anschließend empfiehlt sich die Durchführung von Probeläufen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle. Bei Verwendung anderer DNA-Polymerasen als der empfohlenen sind die unter Punkt 1 aufgeführten Hinweise zu beachten. Die Polymerase-Konzentration kann dabei auf bis zu 2,5 U/Reaktion erhöht werden. Bitte beachten Sie, dass sich das gesamte Pipettierschema verändert.

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

- Aktivität der verwendeten Polymerase nicht ausreichend oder Enzym nicht kompatibel mit Kitpuffer
- Programmierfehler
- Pipettierfehler
- Probenelutionspuffer nicht für die Komplettierung der Negativkontrollen verwendet

5. Gerätekompatibilität

Gerät	Typ 1	Typ 2
LightCycler® 1.2	+v	-
LightCycler® 1.5	+	-
LightCycler® 2.0	+	o
LightCycler® 480	+	o
Rotorgene 3000	+	o
Rotorgene 6000 (5-plex)	+v	o
ABI Prism® 7000	-	+
ABI Prism® 7300	-	+
ABI Prism® 7500	-	+v
ABI Prism® 7700	-	+
ABI Prism® 7900	-	+
iCycler iQ®	o	o
iQ™ 5	+	o
Opticon 2	-	o
Chromo 4	o	o
MX3000P	o	o
MX4000	o	o

+ = empfehlende Kit-Variante

- = Detektion der internen Kontrolle nicht möglich

o = nicht getestet, aber Kompatibilität zu erwarten

v = validiert

1. Reagents and Materials

1.1 Test Kit Components

Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN Mix)

Primer set, probes and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized

red cap	
REAC	B

Rehydration Buffer

1.8 ml

blue cap	
REAC	A

Positive Control DNA

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

green cap	
CONTROL	+

Internal Control DNA

Plasmid DNA, non-infectious, lyophilized

yellow cap	
CONTROL	i

PCR Grade Water

2 ml

white cap	
REAC	H

Please find the guarantee certificate and the conformity declaration on our website.

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)
- polymerase

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

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

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

The Onar[®]Lp test system is an in vitro test for the qualitative and the quantitative diagnosis of *Legionella pneumophila* in clinical samples. The test is based on the polymerase chain reaction. The supplied primer set is specific for a segment of the *mip* region of the *Legionella* genome. The target probe emits fluorescent light at 520 nm.

By using the supplied internal control, false-negative results (e.g. due to inhibition of the reaction by the sample matrix) can be excluded individually for each sample. The internal control is detected by another probe emitting fluorescent light at 610 nm.

Detailed studies confirm the high specificity and sensitivity of the Onar[®]Lp test system. The selected template is highly preserved within *Legionella pneumophila*. Cross activity with other *Legionella* species or species typical for water contamination is not known.

The heat-labile Uracil-DNA Glycosylase (UNG) is suitable for preventing carry-over contamination between PCRs. This technique relies on the incorporation of deoxyuridine triphosphate (dUTP) during all amplification reactions and the pretreatment of all successive PCR mixtures with the heat-labile UNG. The UNG cleaves DNA at any site where a deoxyuridylate residue has been incorporated. Subsequently, the resulting abasic sites are hydrolyzed due to the high temperature during the initial denaturation step, and cannot serve as PCR templates any longer. The heat-labile UNG is inactivated at the same time. Native DNA (e.g., the template DNA) does not contain Uracil and is therefore not degraded by this procedure. UNG is not provided with this kit.

The detection limit of Onar[®]Lp-QP is 10 GC/PCR for *L. pneumophila*. Due to the broad linear detection range, reliable results can be obtained with Onar[®]Lp without time-consuming conditioning of the sample material. The samples are markedly more stable compared to the antigen test.

3. Test Protocol

3.1 Preparation of Sample Material

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

DNA extraction with a commercially available DNA extraction kit (e.g. MB DNA Extraction Kit Cat # 56 -1100) is always advisable when preparing the samples in order to remove inhibitors of the PCR safely and to concentrate the *Legionella* DNA at greater sample volumes. The obtained DNA extract can be used directly for the Onar[®]Lp test. The extracts can be stored at a temperature of at least -18°C for a period of one year. Repeated freezing and defrosting, or storage in the refrigerator for more than 12 hours should be avoided. The sample should not contain more than 100 µg/ml DNA.

3.2 Rehydration of the Reagents

1. centrifuge tubes with lyophilized components (5 sec at maximum speed)
2. add 365 µl of *Rehydration Buffer* to *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. add *appropriate amount of deionized, DNA-free water*

<i>Positive Control DNA</i>	300 µl
<i>Internal Control DNA</i>	300 µl
4. incubate for 10 minutes at room temperature
5. vortex and centrifuge again



Keep reagents on ice and store below -18°C after rehydration.

3.3 Experimental Protocols and Result Reading

3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0

Program 1: Pre-incubation

Cycles	1
Analysis Mode	None



LightCycler® 2.0:

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

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

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

Result Reading:

- Select the fluorescence channels F1 and F2 or Channel 1 and Channel 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	channel 1 (530)	channel 3 (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 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.

3.4 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.

Pipetting scheme:

	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

+ template DNA, NC or PC 10.0 μl

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

For other polymerase concentrations the amount of enzyme and the amount of water added to the mix need to be adjusted.



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. Pipette 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.

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

4. Trouble shooting

Before repeating a negative and a positive control run please check the cycler protocol and pipetting scheme. When using polymerases other than the MB TAQ DNA Polymerase, please note the comments made under chapter 1. The concentration can then be raised up to 2.5 U/reaction. Please note the complete change of the pipetting scheme.

Insufficient (inhibition) or no amplification of the internal control may be due to the following reasons:

- activity of *Taq* polymerase is insufficient or enzyme not compatible with the kit buffer
- programming mistake
- pipetting mistake
- sample elution buffer and sample used to complete the negative control are different

5. Instrument Compatibility

Instrument	type 1	type 2
LightCycler® 1.2	+ ^v	-
LightCycler® 1.5	+	-
LightCycler® 2.0	+	o
LightCycler® 480	+	o
Rotorgene 3000	+	o
Rotorgene 6000 (5-plex)	+ ^v	o
ABI Prism® 7000	-	+
ABI Prism® 7300	-	+
ABI Prism® 7500	-	+ ^v
ABI Prism® 7700	-	+
ABI Prism® 7900	-	+
iCycler iQ®	o	o
iQ™5	+	o
Opticon 2	-	o
Chromo 4	o	o
MX3000P	o	o
MX4000	o	o

+ = recommended Kit version

- = the internal control is not detectable

o = untested but presumed to be compatible

v = validated

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 infections 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.

Related Products

MB Taq DNA Polymerase

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

Clinical Diagnostic Kits for qPCR

21-2025/-2100/-2250	Onar [®] LS-QP <i>Legionella</i> species	25/100/250 tests
21-3025/-3100/-3250	Onar [®] Lp-QP <i>Legionella pneumophila</i>	25/100/250 tests
20-2025/-2100/-2250	Venor [®] Mp-QP <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25/100/250 tests
24-2025/-2100/-2250	Onar [®] Ct <i>Chlamydia trachomatis</i>	25/100/250 tests
23-2025/-2100	Onar [®] Tp <i>Treponema pallidum</i>	25/100 tests
25-2025/-2100/-2250	Onar [®] Pertussis <i>Bordetella pertussis/parapertussis</i>	25/100/250 tests

Quantification Standards, 100 µl each, 1x10⁸ genomes/µl

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

Genomic DNA Extracts, 100 µl each, +/- 10 ng / 100 µl

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

