

***Legionella species* Diagnostic Kit for qPCR**

Version 2.0

-Instructions for Use of Type 1 and Type 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 Gewinnung des Probenmaterials	3
3.2 Rehydratisierung der Reagenzien	4
3.3 Programmierung und Auswertung	4
3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0 (für Typ1)	4
3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex) (für Typ 1)	5
3.3.3 ABI 7500 (für Typ 2)	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	10
3.1 Preparation of Sample Material	10
3.2 Rehydration of the Reagents	11
3.3 Experimental Protocol and Result Reading	11
3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0 (for type 1)	11
3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex) (for type 1)	12
3.3.3 ABI 7500 (for type 2)	13
3.4 PCR Master Mix Setup	14
3.5 Result Interpretation	15
4. Trouble Shooting	15
5. Instrument Compatibility	15

1. Produkthinweise

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

1.1 Enthaltene Reagenzien

Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN-Mix), nur Typ 1

Primer, Sonden und Desoxynukleotidtriphosphate

dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert

roter Verschluss

REAC	B
------	---

Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN-Mix), nur Typ 2

Primer, Sonden und Desoxynukleotidtriphosphate

dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert.

oranger Verschluss

REAC	B
------	---

Rehydration Buffer

1,8 ml

blauer Verschluss

REAC	A
------	---

Positive Control DNA

DNA-Fragmente des Genoms von *Legionella pneumophila*,

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 auf Coolpacks versendet und müssen bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* ist lichtgeschützt aufzubewahren. Nach Rehydratisierung der lyophilisierten Komponenten sollte häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen und der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Produktzertifikat (das Produktzertifikat finden Sie auf unserer Webseite) angegebenen Datum haltbar.

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

- qPCR-Gerät (Kompatibilität siehe Seite 8)
- geeignete PCR-Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen (1 - 1000 µl)
- Polymerase



Dieser Kit erzielt exzellente Ergebnisse mit unserer MB Taq DNA-Polymerase (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. Es kann bei der Verwendung anderer Polymerasen notwendig sein, den mit der Polymerase mitgelieferten Reaktionspuffer zu verwenden.

2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Legionella spp. kommen ubiquitär in Oberflächenwasser und feuchtem Boden vor und sind 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[®]Ls ist ein *in vitro*-Testsystem zur qualitativen und quantitativen Diagnostik von *Legionella* spp. in klinischen Proben. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die mitgelieferten Primer sind für einen Abschnitt der 16S rRNA-kodierenden Region des Legionellengenoms spezifisch. Das gewählte Template ist innerhalb der Art *Legionella* hoch konserviert. Es werden unter anderem die klinisch relevanten Spezies *L. pneumophila* SG 1-14 und 16, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii*, *L. anisa* und *L. gormanii* 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 10 µl Probenvolumen.

Innerhalb des amplifizierten Produktes bindet eine spezifische Sonde, deren Fluoreszenzsignal bei ~ 520 nm (Typ 1 und Typ 2) 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) bzw. bei ~ 560 nm (Typ 2) 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.

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 Probenahme beeinflusst im starken Maße die Zuverlässigkeit der Testbefunde. Material aus den unteren Atemwegen ist für den Nachweis von *Legionella* spp. 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 Entnahmen 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, 0,5% Natriumdodecylsulfat) ausgewaschen. Das Probenmaterial ist so für einige Zeit gekühlt stabil sollte nach Möglichkeit gekühlt transportiert werden.

Zur Probenvorbereitung ist grundsätzlich eine DNA-Extraktion mit einem handelsüblichen DNA-Extraktionskit, wie dem Minerva Biolabs DNA Extraction Kit (Cat # 56-1100) angeraten. Dabei werden Inhibitoren der PCR sicher entfernt und zudem wird eine Konzentrierung der Legionellen-DNA erreicht. Der enthaltene DNA-Extrakt kann direkt für den Onar[®]Ls eingesetzt werden.

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 *Rehydration Buffer*:
Primer/Probe/Nucleotide Mix 365 µl
3. Zugabe von DNA-freiem Wasser:
Internal Control DNA 300 µl
Positive Control DNA 300 µl
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 real-time PCR-Geräte werden auf unserer Homepage angeboten.

Bei Multicolor-Analysen können Interferenzen zwischen den einzelnen Kanälen des Fluorimeters auftreten. Diese können meist mit Hilfe der Systemsoftware, z. B. beim *LightCycler®* (Roche Diagnostics) mit einem *Color Compensation Kit* aufgehoben werden. Es kann ausschließlich ein Überstrahlen vom Targetkanal bei erfolgter Amplifikation der Target-DNA in den Kanal für die Interne Kontrolle beobachtet werden. Das Testergebnis ist auch in diesen Fällen zuverlässig auswertbar.

3.3.1 *LightCycler®* 1.2, 1.5 und 2.0 (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.



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

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

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	L. species	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) (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. spp.): 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:

- Öffnen des Fensters *Analysis* und Auswahl des Reiters *Quantitation*
- Auswahl des jeweiligen Kanals (Green oder Orange)
- Starten der Analyse durch doppeltes Anklicken.
- Es öffnen sich folgende Fenster:

Target	L. species	Interne Kontrolle
Kanal	Green	Orange

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.

3.3.3 ABI 7500 (Typ 2)

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. spp.): FAM
Interne Kontrolle: VIC
Quencher: none

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

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

Target	L. species	Interne Kontrolle
Kanal	FAM	VIC

Der Threshold sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.

- 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.

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 in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und vorsichtig gemischt.

Pipettierschema:

	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
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



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 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 der Ergebnisse

Eine Legionelleninfektion wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Targetkanal 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 Legionellen in der Probe nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch die Amplifikation im Target-Kanal erkennbar.

Legionellen-PCR	Interne Kontrolle	Interpretation
positiv	irrelevant	<i>Legionellen</i> positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negativ	positiv	<i>Legionellen</i> negativ

4. Fehleranalyse

Zur Fehleranalyse sollten zuerst das Thermocycler-Programm sowie eventuelle Pipettierfehler überprüft werden. Anschließend empfiehlt sich die Durchführung von Probeläufen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle.

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

- Pipettierfehler (siehe Kapitel 3.5 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes)
- Programmierfehler, z.B. aufgrund falscher Einstellung der Fluoreszenzkanäle
- 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
iQ™ 5	+v	o
Opticon 2	-	o
Chromo 4	o	o
MX3000P	o	o
MX4000	o	o

+ = empfohlene Kit-Variante

- = Detektion der internen Kontrolle nicht möglich

o = nicht getestet, aber Kompatibilität zu erwarten

v = validiert

1. Reagents and Materials

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

1.1 Test Kit Components

Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN Mix), type 1 only

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

red cap

REAC	B
------	---

Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN Mix), type 2 only

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

orange cap

REAC	B
------	---

Rehydration Buffer

1.8 ml

blue cap

REAC	A
------	---

Positive Control DNA

Fragment of *Legionella pneumophila* DNA, 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
------	---

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*, the *Internal Control Probe*, the *Positive Control* and the *Internal Control*, store below -18 °C and avoid repeated freezing and thawing. Protect the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* and *Internal Control Probe* from light. For repeated testing of low sample numbers, *Primer/Probe/Nucleotide Mix*, *Internal Control Probe* and controls should be aliquoted after rehydration. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the Guarantee Certificate (please find the Certificate on our web-site).

1.3 Supplemental Requirements

- real-time PCR thermal cycler (check list on page 15 for compatibility)
- vials required for the particular thermal cycler used
- micro centrifuge, micropipettes and filtered tips
- polymerase



The test provides excellent results with MB Taq DNA-Polymerase (Cat # 53-0050; 53-0100; 53-0200; 53-0250). 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). If you want to use your own polymerase, it may be necessary to use the specific buffer provided with this polymerase.

2. Application and Test Principle

Legionella spp. ubiquitously colonize 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[®]Ls test system is an in vitro test for the qualitative and the quantitative diagnosis of *Legionella* spp. in clinical samples. The test is based on the polymerase chain reaction. The supplied primer set is specific for a segment of the 16S rRNA region of the *Legionella* genome. The selected template is highly preserved within the *Legionella* species. Clinically relevant species being detected are e.g. *L. pneumophila* SG 1-14 and 16, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii* and *L. gormanii*. Cross activity with pharyngeal commensals or other pathogens in the respiratory tract, like *Bordetella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Mycobacteria*, *Pseudomonas* and *Streptococci* is not known. The detection limit is 10 genome equivalents per 10 µl sample volume.

The target probe emits fluorescent light at 520 nm. 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) and ~560 nm (type 2).

The Onar[®]Ls PCR 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 Onar[®]Ls.

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. 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, 0,5% sodium dodecylsulfate). The sample material is stable for a few days and should be transported cooled.

DNA extraction with a suitable DNA extraction kit (e.g. Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit) 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[®]Ls 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 Rehydration Buffer

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	365 μ l
------------------------------------	-------------
4. add appropriate amount of deionized, DNA-free water

<i>Internal Control DNA</i>	300 μ l
<i>Positive Control DNA</i>	300 μ l
3. incubate for 5 minutes at room temperature
4. vortex and centrifuge again
5. Store reagents below -18 °C after rehydration.

3.3 Experimental Protocols and Result Reading

Protocols for other qPCR machines are available from our web page.

This detection kit is designed as a dual color detection experiment. Due to the spectral overlap of the emission spectra of the two dyes, with some qPCR machines (e.g. LightCycler from Roche Diagnostics) a residual cross talk of the target channel into the internal control channel can be observed. To correct for this cross talk, color compensation files have to be generated in a separate run using a Color Compensation Kit offered by the company providing the real-time PCR instrument. In this case the test results are still interpretable as an amplification of the target DNA took necessarily place.

3.3.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0 (type 1)

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

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	L. species	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) (type 1)

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. species
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.

target	L. species	Internal control
channel	green	orange

3.3.3 ABI 7500 (type 2)

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



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.

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

target	L. species	Internal control
channel	FAM	VIC

- 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.

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). Pipette master mix on ice into a 1.5 ml reaction tube and mix gently.

Pipetting scheme:

	for 1 reaction	for 25 reactions*
<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	14.0 μl	350.0 μl
<i>Internal Control DNA</i>	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



The total duration from master mix preparation to PCR cycling must not exceed 45 minutes to avoid a decrease in the fluorescent signal.

Aliquot 15 μl of master mix into each PCR reaction tube. The excess of master mix (1 μl) is rejected. 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. Seal 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* DNA in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the target 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* 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* DNA loads in the sample.

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

4. Trouble shooting

Before repeating a negative and a positive control run please check the cycler protocol and pipetting scheme. Insufficient (inhibition) or no amplification of the internal control may be due to the following reasons:

- 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®	+v	o
iQ™5	o	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 mycoplasma 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. Venor and Onar are registered trademarks of Minerva Biolabs GmbH.

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

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

Quantification Standards, 100 µl each, 1x10⁶ 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

Extraktion Kit

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

