



PCRFast[®]
Legionella pneumophila

Realtime (SYBR[®] Green) und / oder Gel
Realtime (SYBR[®] Green) and / or Gel

IF / MG1021

Deutsch Seite 2
English Page 16

Kurzinformation

Einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von Legionella pneumophila in Realtime (SYBR[®] Green) und / oder mit Geldetektion in der Wasseranalytik (Nachweis des 16S rRNA Gens mit 160 bp). Mit dem Test können 96 Reaktionen durchgeführt werden. Alle Reaktionsgefäße enthalten ein spezifisches Primerpaar.

48 Reaktionsgefäße (rote Markierung) enthalten zusätzlich Legionella pneumophila - DNA zur Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte (ITC) und für die Schmelzkurvenanalyse.

Zeitbedarf:	Filtration / DNA - Extraktion.....	45 min
(10 Proben)	PCR-Ansatz.....	15 min
	PCR.....	2,0 h
	Gelelektrophorese.....	15 - 30 min

PCRFast[®]

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH. ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

PCRFast[®]

is a registered trademark of the ifp Institut für Produktqualität GmbH
ifp also offers contract analysis.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

1. Testprinzip

PCRFast[®] Legionella pneumophila ist ein einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von Legionella pneumophila in der Wasseranalytik (Nachweis des 16S rRNA Gens mit 160 bp). Der Vorschlag zur Durchführung entspricht den internationalen Standards (ISO) für die PCR Analytik.

Alle Reaktionsgefäße enthalten die für die PCR - Reaktion notwendigen spezifischen Primer in optimaler Menge.

Die **nicht markierten Reaktionsgefäße (farblos)** werden für den Nachweis von **Legionella pneumophila - DNA in der extrahierten Probe** verwendet sowie für die **Negativkontrollen NTC** (Überprüfung des MasterMixes auf Kontamination).

Die **markierten Reaktionsgefäße (rot)** enthalten neben den Primern zusätzlich Legionella pneumophila - DNA. Diese werden für die **Inhibitionskontrollen ITC** (Überprüfung der extrahierten Proben - DNA auf Inhibitoren) sowie für die Schmelzkurvenanalyse verwendet. Zusätzlich ermöglichen die markierten Reaktionsgefäße die Mitführung von **Positivkontrollen PTC** (Überprüfung der Funktionalität des MasterMixes).

In das Reaktionsgefäß wird **12,5 µl zweifach konzentrierter MasterMix** vorgelegt und anschließend **12,5 µl des DNA - Extraktes** zugegeben. Der MasterMix enthält bereits Polymerase, Nukleotide und Magnesiumchlorid in optimaler Konzentration. Bei Durchführung in Realtime enthält der MasterMix zusätzlich SYBR[®]Green. Die Zielsequenz wird dann in einem PCR - Thermocycler amplifiziert und dabei das gebildete Amplifikat in Realtime (SYBR[®]Green) und / oder mittels Agarose - Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Bei Realtime (SYBR[®]Green) müssen positive Reaktionen über Schmelzkurvenanalyse verifiziert werden. Dazu werden die **Maxima der Schmelzkurven von Probe** und **Inhibitionskontrolle (ITC)** miteinander verglichen. Mit Hilfe der Agarose - Gelelektrophorese kann das Amplifikat zusätzlich über die Basenlänge verifiziert werden.

2. Packungsinhalt

Der Testkit enthält:

- 6 x **Streifen (farblos)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (48 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern (für die Probenbestimmungen, Negativkontrollen NTC und Extraktionskontrolle ETC)
- 6 x **Streifen (rot)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (48 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern und Legionella pneumophila - DNA (für die Inhibitionskontrollen ITC und Positivkontrollen PTC)

3. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

Geräte und Labormaterialien

- Filtrationsanlage
- Messzylinder, steril
- Petrischalen Ø 60 mm, steril
- Brutschrank 37 °C und 70 °C
- Vortexer
- Biozentrifuge, mind. 14.000 x g (für 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße)
- **PCR - Thermocycler:**
 - Gel z. B. Eppendorf MasterCycler mit Heizblock für 0,2 ml Reaktionsgefäße
 - Realtime z.B. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P jeweils mit Software für die Schmelzkurvenanalyse
- Gelkammer mit Netzteil und Gel - Dokumentationssystem
- Mikroliterpipetten 2 - 20 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl, z. B. Gilson Pipetman P, jeweils mit Filterspitzen
- 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße

Reagenzien

Filtration

- 0,45 µm Nitrocellulose Filter Ø 50 mm (oder adäquates Material), z.B. Sartorius Celulose Nitrate Filter Bestell – Nr.: 11306 50 N

DNA-Extraktion

- Ethanol >95 % (vergällt)
- 0,1 x TE - Puffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0,1 mmol / l)
- Wasser deionisiert, DNA – frei
- DNA-Extraktionskit, z.B. PCRFast® Microbe Extraction

PCR

nur für die Geldetektion

zweifach konzentrierter MasterMix (Hotstart empfohlen)

z. B. AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix, Applied Biosystems Nr. 4318739;
Qiagen HotStarTaq MasterMix Kit Qiagen Nr. 203443; Brilliant II QPCR
MasterMix, Stratagene Nr. 600804

für die Geldetektion und / oder Realtime (SYBR[®]Green)

zweifach konzentrierter MasterMix (Hotstart empfohlen)

z. B. Power SYBR[®] Green PCR MasterMix, Applied Biosystems Nr.
4367659; QuantiTect SYBR[®]Green PCR Kit Qiagen Nr. 204143;
Brilliant II SYBR[®] Green MasterMix Stratagene Nr. 600548

Detektion

- Agarose
- Ethidiumbromid
- Puffer für die Gelherstellung, Überschichten des Gels und Elektrophorese - Laufpuffer:
1 x TAE - Puffer (Tris 40 mmol / l, Essigsäure 20 mmol / l, EDTA 1 mmol / l)
- Gelladepuffer, z. B. 5fach (Succrose 5 %, Orange G 0,25 %)
- DNA - Längenmarker, Bereich 50 - 1000 bp

4. Vorsichtsmaßnahmen

- alle Arbeiten sollten mit den im Labor üblichen Schutzmassnahmen und alle PCR Arbeiten entsprechend den Empfehlungen nach CEN / ISO durchgeführt werden
- zur Vermeidung von Verschleppungen alle Arbeiten mit Schutzhandschuhen und Filterspitzen durchführen
- räumliche Trennung von Probenaufarbeitung, PCR - Setup und Detektion beachten
- Ethidiumbromid ist DNA schädigend und sollte daher entsprechend den Vorschriften gehandhabt werden
- UV - Licht ist DNA schädigend: Vorsicht beim Umgang mit UV - Transilluminatoren

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Den Testkit bzw. die Reaktionsgefäße bei 2 - 8 °C lagern.

6. Probenanreicherung und DNA - Isolierung

6.1. Membranfiltration

100 ml des zu untersuchenden Wassers werden über einen 0,45 µm Nitrocellulose Filter Ø 50 mm filtriert. Bei jeder Analysenserie sollte ein Ansatz ohne Matrixzugabe als Extraktionskontrolle mitgeführt werden. Eine positive Extraktionskontrolle zeigt eine Kontamination der Reagenzien an.

6.2. DNA - Isolierung

Die Empfehlung für die DNA – Extraktion erfolgt in Anlehnung an den PCRFast® Microbe Extraction Kit, bei der Verwendung anderer handelsüblicher Testkits muss das Extraktionsprotokoll eventuell an diesen angepasst werden.

Für die DNA - Extraktion den Filter mit 1225 µl Lysepuffer (z.B. PCRFast® Microbe Extraction je 600 µl M1 und M2) sowie 25 µl Proteinase K in eine Petrischale Ø 60 mm geben. Die Petrischale 15 Minuten unter Schütteln bei 70 °C inkubieren. Das entstandene Lysat möglichst vollständig (ca. 600 – 800 µl) in ein Reaktionsgefäß überführen und in einem Verhältnis von 2 : 1 mit Ethanol versetzen (z.B. 800 µl Lysat + 400 µl Ethanol). Die gesamte Lösung über die Säule geben, für 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugieren und den Überstand verwerfen. Sollte das Lysat nicht komplett auf die Säule passen, kann dieser Schritt wiederholt werden. Weitere Durchführung gemäß dem Extraktionsprotokoll des Kitherstellers für Gram negative Mikroorganismen (z.B. PCRFast® Microbe Extraction). Nach der DNA - Extraktion wird das Eluat 1 : 10 mit 0,1 x TE - Puffer verdünnt.

6.3. Bestätigung verdächtiger Kolonien

Zur Bestätigung verdächtiger Kolonien auf festen Nährmedien ist es ausreichend, wenn eine Öse dieser Kolonie in 0,2 ml Wasser deionisiert aufgeschlämmt und 10 min bei 95 °C erhitzt wird. Anschließend wird die Probe abgekühlt und 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand kann dann direkt für PCRFast® verwendet werden.

7. PCR - Ansatz

7.1. Vorbereitungen

- Streifen aus der Folie entnehmen und benötigte Anzahl Reaktionsgefäße abtrennen
- die restlichen Streifen / Reaktionsgefäße zusammen mit dem Trockenbeutel in die Folie zurücklegen, Folie gut verschließen und bei 2 - 8 °C lagern
- die benötigte Menge MasterMix bereitstellen (pro Reaktion 12,5 µl)

7.2. Ansatz

- folgende Volumina in die Reaktionsgefäße pipettieren:

Pro Probe	Reaktionsgefäß	Master-Mix	Probe
	farblos	12,5 µl	12,5 µl
Inhibitions-kontrolle ITC	rot	12,5 µl	12,5 µl
Pro Ansatz	Reaktionsgefäß	Master-Mix	0,1 x TE - Puffer
Negativ-kontrolle NTC	farblos	12,5 µl	12,5 µl
Positiv-kontrolle PTC	rot	12,5 µl	12,5 µl

Tab. 1: Pipettieransatz PCRFast® Legionella pneumophila

- die Reaktionsgefäße verschließen (abzentrifugieren empfohlen) und in den PCR - Thermocycler stellen. Die Amplifikation nach folgendem Temperatur - / Cyclerprofil durchführen:

– Cyclerprofil

10 min	95 °C	
15 sec	95 °C	
60 sec	72 °C	45 Zyklen

Anmerkung:

Die Validierung wurde mit Brilliant® II QPCR MasterMix (für die Geldetektion) und Brilliant® II SYBR® Green MasterMix (für die Geldetektion und / oder Realtime) von Applied Biosystems und den unter Punkt 3 genannten Thermocyclern durchgeführt. Eventuell muss das vorgegebene Cyclerprofil an das jeweilige Gerät und den MasterMix angepasst werden.

7.3. Detektion

7.3.1. Geldetektion

- empfohlen wird eine Elektrophorese in 2,0 - 2,5 % Agarose und Anfärbung des Amplifikates mit Ethidiumbromid
- die Gelelektrophorese nach den Angaben des Herstellers durchführen

Beispiel:

- Agarosegel 2,0 - 2,5 % herstellen (1,0 - 1,25 g Agarose und 2 - 4 µl Ethidiumbromid 10 mg / ml in 50 ml 1 x TAE - Puffer durch Erhitzen auflösen und das Gel gießen)
- Agarosegel mit 1 x TAE - Puffer überschichten
- PCR - Amplifikat mit Gelladepuffer auf das Agarosegel auftragen, z. B. 6 µl des 5 x Ladepuffers zum PCR - Ansatz (25 µl) zugeben, mischen und 10 µl auftragen
- Längenmarker auftragen
- Elektrophorese für 15 min bis 30 min bei 3 - 6 V / cm (abhängig vom Elektrophorese System) durchführen
- auf einem Transilluminator die DNA visualisieren und dokumentieren

7.3.2. Realtime (SYBR® Green)

- die Auswertung der Amplifikation in Realtime (SYBR® Green) erfolgt über den Amplificationplot und Schmelzkurvenanalyse
- negative Proben können aussortiert werden
- ist ein Fluoreszenzanstieg im Amplificationplot sichtbar, muss die Probe über die Schmelzkurvenanalyse verifiziert werden
- dabei wird die Schmelzkurve der Probe mit der Schmelzkurve der Inhibitionskontrolle (ITC) verglichen
- bei positiven Proben müssen die Maxima der Schmelzkurven von Probe und Inhibitionskontrolle (ITC) übereinstimmen (Temperaturabweichung $\pm 0,5$ °C)

–um eine positive Probe zusätzlich über die Basenlänge zu verifizieren, empfiehlt sich eine Elektrophorese in 2,0 - 2,5 % Agarose und Anfärbung des Amplifikates mit Ethidiumbromid

8. Auswertung

8.1. Geldetektion

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung zusammengefasst. Bei einer positiven Probe liegt die Bande der Probe und die Bande der Positivkontrolle auf gleicher Höhe.

8.1.1. Auswertematrix Geldetektion

Probe	Inhibitions- kontrolle ITC	Negativ- kontrolle NTC	Positiv- kontrolle PTC	Ergebnis
■	■			Probe positiv
keine Bande	■			Probe negativ
keine Bande	keine Bande			Inhibition*
		keine Bande		MasterMix nicht kontaminiert
			■	MasterMix funktionsfähig

* extrahierte Proben - DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

■ = Bande

Tab. 2: Auswertung PCRFast® Legionella pneumophila Geldetektion

8.1.2. Beispiel für ein typisches Agarosegelbild

– Im Folgenden ist ein Agarosegelbild exemplarisch dargestellt.

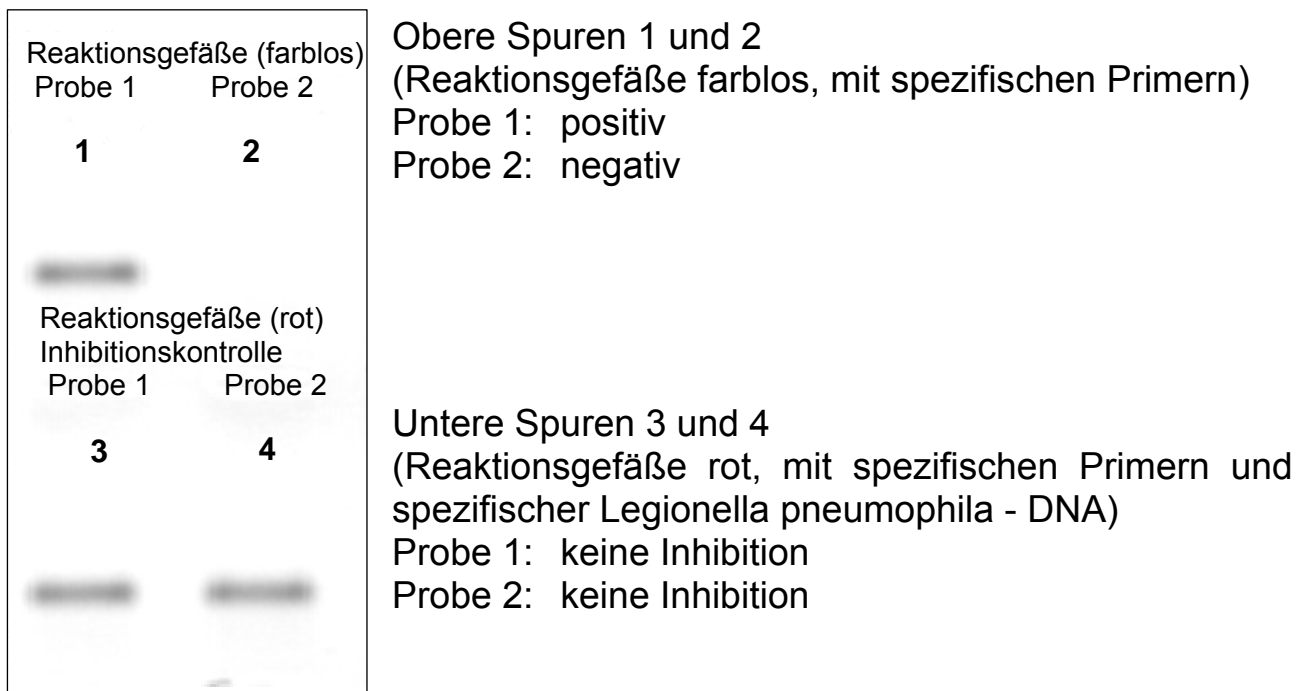


Abb. 1: Beispiel für ein Agarosegelbild PCRFast® Legionella pneumophila

8.2. Realtime (SYBR® Green)

8.2.1. Auswertematrix Realtime (SYBR® Green)

Probe	Inhibitions- kontrolle ITC	Ergebnis
keine Amplifizierung	Amplifizierung + Schmelzkurve	Probe negativ
Amplifizierung + Schmelzkurve, aber Schmelz- temperaturunter- schied zur ITC ($\geq 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$)	Amplifizierung + Schmelzkurve	Probe negativ
Amplifizierung + Schmelzkurve mit gleicher Schmelz- temperatur zur ITC ($\pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$)	Amplifizierung + Schmelzkurve	Probe positiv
keine Amplifizierung	keine Amplifizierung	Inhibition*

Negativ-kontrolle NTC	Positiv-kontrolle PTC	Ergebnis
keine Amplifizierung		MasterMix nicht kontaminiert
	Amplifizierung + Schmelzkurve	MasterMix funktionsfähig

* extrahierte Proben - DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

Tab. 3: Auswertung PCRFast® Legionella pneumophila (Realtime SYBR® Green)

8.2.2. Beispiele für die Auswertung der Amplificationplots

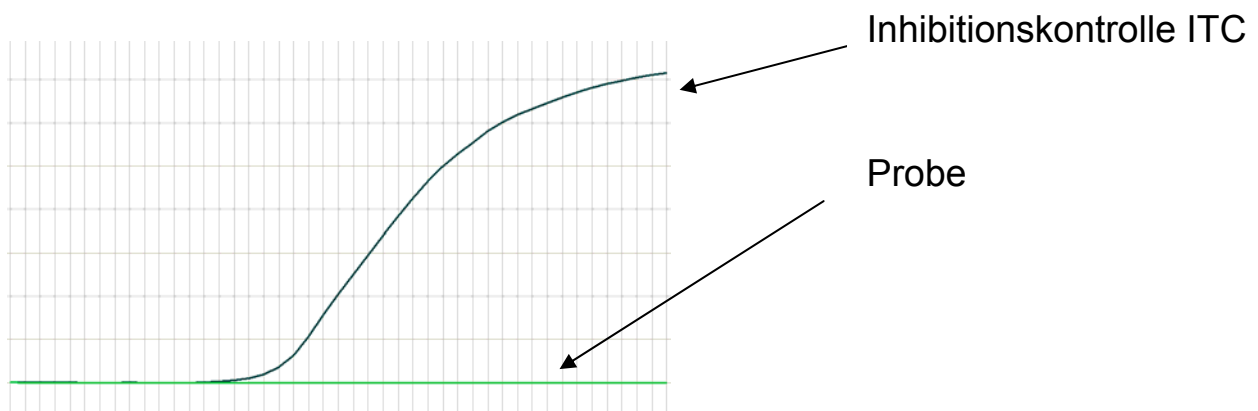


Abb. 2: Probe ist negativ (keine Amplifizierung der Probe)

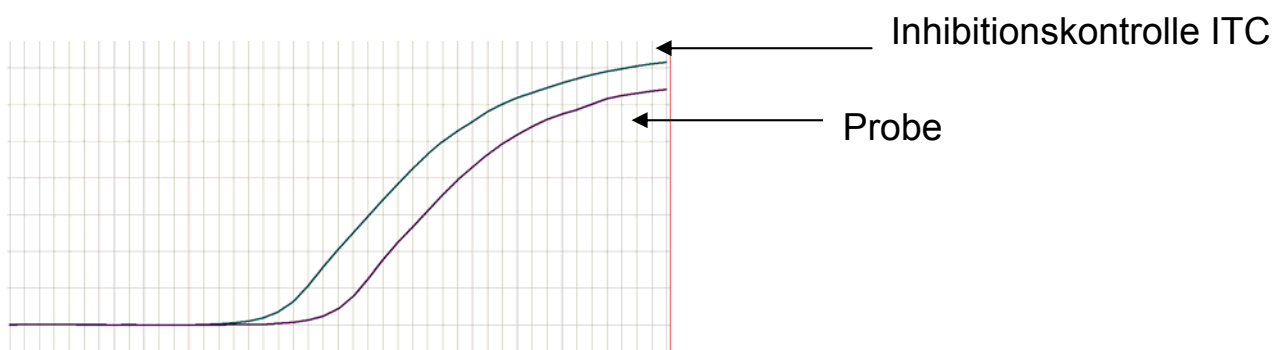


Abb. 3: Probe ist positiv, aber Ergebnisverifizierung über Schmelzkurvenanalyse (Vergleich mit der Inhibitionskontrolle ITC)

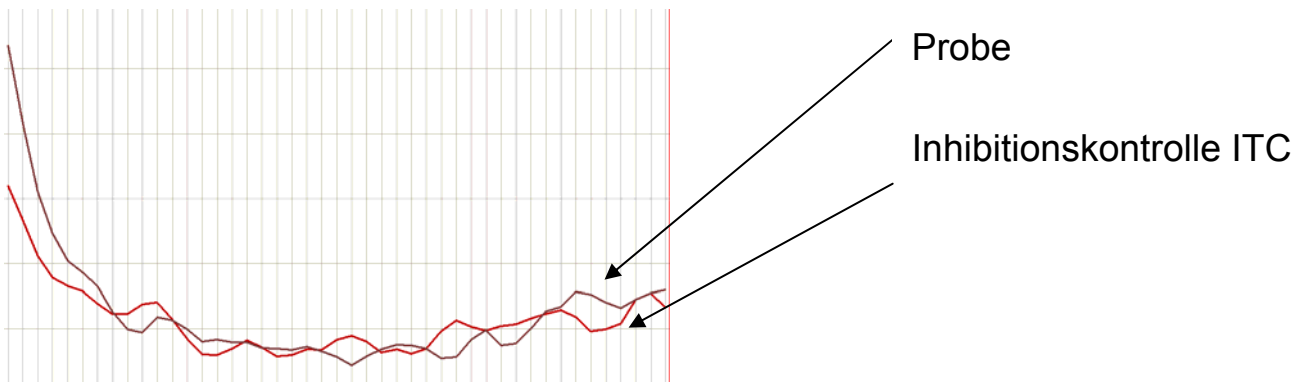


Abb. 4: Inhibition der Reaktion, isolierte DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

8.2.3. Beispiele für die Auswertung der Schmelzkurven

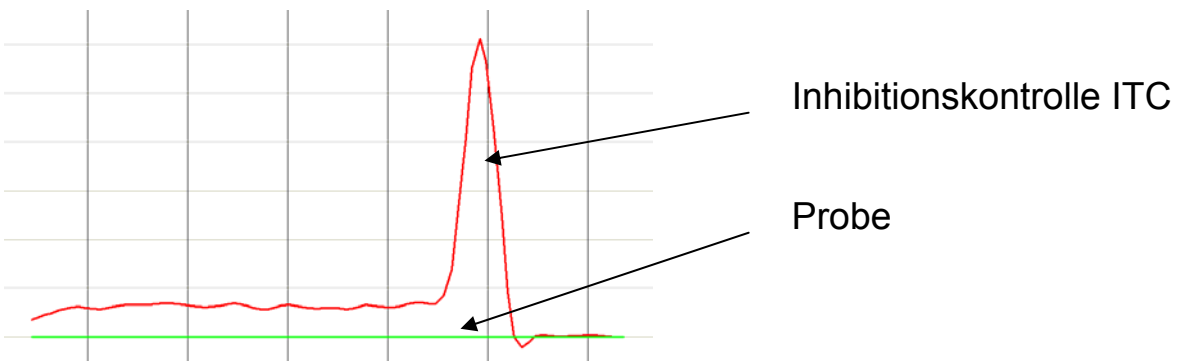


Abb. 5: Probe ist negativ (keine Schmelzkurve der Probe)

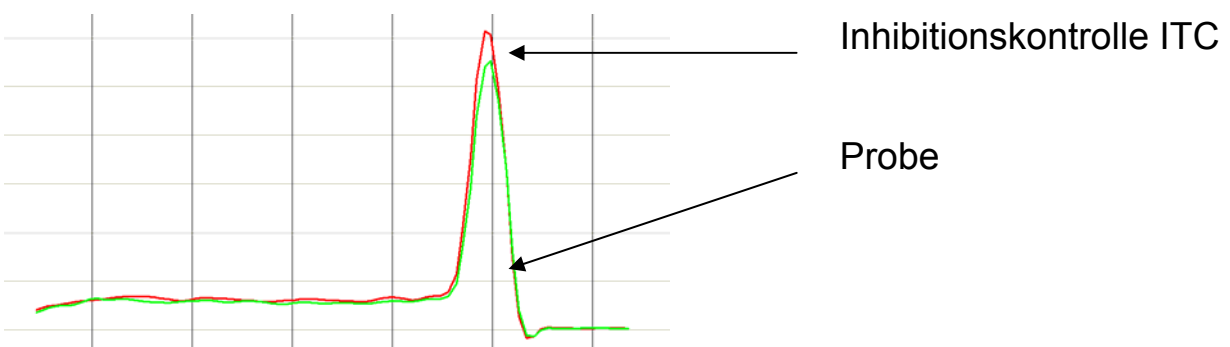


Abb. 6: Probe ist positiv; Probe und Inhibitionskontrolle ITC zeigen dieselbe Schmelzkurve

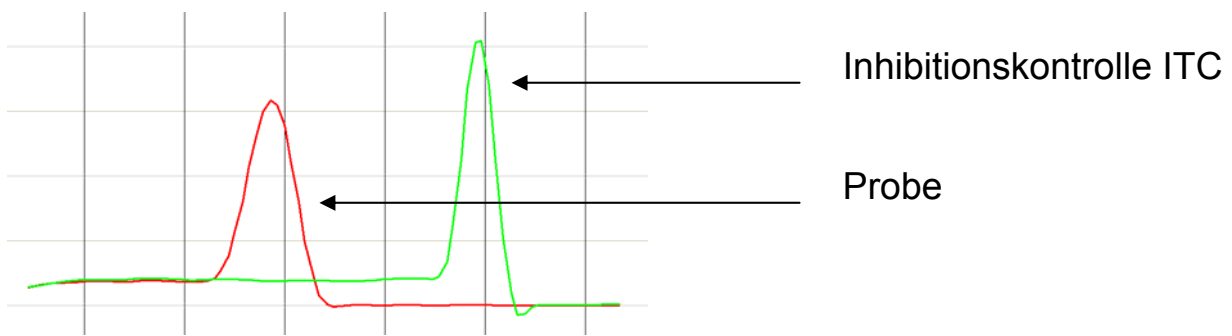


Abb. 7: Probe ist negativ (Probe zeigt im Vergleich zur Inhibitionskontrolle ITC eine unterschiedliche Schmelzkurve)

9. Sensitivität

Nachweisgrenze: 1 *Legionella pneumophila* pro ml Wasserprobe bei 100 ml Probenvolumen.

10. Spezifität

PCRFast[®] *Legionella pneumophila* ist 100 % spezifisch auf *Legionella pneumophila*. Folgende Spezies wurden mit mind 2500 Kopien auf Kreuzreaktivität getestet:

Spezies		Spezies		Spezies	
<i>Legionella pneumophila</i>	+	<i>Legionella erythra</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Salmonella thyphimurium</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-		

Tab. 4: Spezifität PCRFast[®] *Legionella pneumophila*

- + Bande mit 160 bp
- keine Bande mit 160 bp

Sollten Fragen zur Durchführung des Testes, zur Probenaufarbeitung oder zur PCR - Analytik im Allgemeinen bestehen, dann wenden Sie sich bitte an das Kompetenzzentrum für DNA - Analytik des ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com

Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0

Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50

Weitere Informationen zur Durchführung von PCRFast[®] finden Sie auch unter www.produktqualitaet.com.



Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. ifp übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

11. Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 22174)

L 00.00 - 45 „Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln“

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20837)

L 00.00 - 109 „Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase - Kettenreaktion (PCR)“

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20838)

L 00.00 - 110 „Anforderung an die Amplifikation und den Nachweis bei qualitativen Verfahren zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase – Kettenreaktion (PCR)“

PCRFast[®] Legionella pneumophila Realtime (SYBR[®] Green) and / or Gel

Brief information

Simple, molecular biological test (PCR) for detecting Legionella pneumophila in water in realtime (SYBR[®] Green) and / or gel detection (detection of the 16S rRNA gene with 160 bp). The test kit has 96 reaction vials, each reaction vial contains a specific primer pair.

48 reaction vials (red marking) contain additionally Legionella pneumophila DNA for investigating possible inhibiting effects (ITC) and for melting curve analysis.

Time required:	Filtration / DNA extraction.....	45 min
(10 samples)	PCR setup.....	15 min
	PCR.....	2.0 h
	gelelectrophoresis.....	15 - 30 min

PCRFast[®]
ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

PCRFast[®]
is a registered trademark of ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp also offers contract analyses.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

1. Principle of the test

PCRFast[®] Legionella pneumophila is a simple, molecular biological test (PCR) for detecting Legionella pneumophila in water. (detection of the 16S rRNA gene with 160 bp). The analytical procedure described here complies with the international standards (ISO) for PCR analysis.

All the reaction vials contain the optimum amount of the specific primer required for the PCR reaction.

The **reaction vials that are not marked (colourless)** are used for detecting **Legionella pneumophila DNA in the extracted sample** and for the **negative controls NTC** (checking the MasterMix for contamination).

The **marked reaction vials (red)** contain Legionella pneumophila DNA as well as the primers. These are used for the **inhibition controls ITC** (checking the extracted sample DNA for inhibitors) and for the melting curve analysis. The marked reaction vials are also used for the **positive controls PTC** (checking the functionality of MasterMix).

Place **12.5 µl of double concentrated MasterMix** into the reaction vial and add **12.5 µl of the DNA sample extract**. The MasterMix already contains polymerase, nucleotides and magnesium chloride in optimum concentrations. In realtime the MasterMix contains additionally SYBR[®]Green. The target sequence is then amplified in a PCR thermocycler and the resulting amplificate made visible in realtime (SYBR[®]Green) and / or agarose gel electrophoresis using ethidium bromide. With realtime (SYBR[®] Green), positive reactions need to be verified via melting curve analysis. To do so, the melting curve peaks of the sample are compared to those of the **inhibition control ITC**. The amplificate can additionally be verified by means of agarose gel electrophoresis via the base length.

2. Package contents

The test kit contains:

- 6 x **strips (colourless)** with eight 0.2 ml reaction vials each (48 reaction vials), coated with specific primers (for sample determinations, for negative controls NTC and extraction controls ETC)
- 6 x **strips (red)** with eight 0.2 ml reaction vials each (48 reaction vials), coated with specific primers and additionally *Legionella pneumophila* DNA (for the inhibition controls ITC and positive controls PTC)

3. Additionally required instruments and reagents

Lab material and instruments

- filtration equipment
- measuring cylinder, sterile
- Petri dishes Ø 60mm, sterile
- 37 °C (98.6 °F) and 70°C (158 °F) incubator
- vortexer
- biocentrifuge, min. 14,000 x g (for 1.5 ml and 2.0 ml reaction vials)
- PCR thermocycler:**
 - gel, e.g. Eppendorf MasterCycler with heating block for 0.2 ml reaction vials
 - Realtime, e.g. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P with software for the melting curve analysis each
- gel chamber with power pack and gel documentation system
- microliter pipettes 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl, e.g. Gilson Pipetman P with filter tips
- 1.5 ml or 2.0 ml reaction vials

Reagents

Filtration

- 0.45 µm nitrocellulose filter Ø 50mm (or appropriate material), e.g. Sartorius Celulose Nitrate Filter Order no.: 11306 50 N

DNA extraction

- ethanol >95 % (denatured)
- 0.1 x TE - buffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0.1 mmol / l)
- water deionised, DNA free
- DNA-extraction kit, e.g. PCRFast[®] Microbe Extraction

PCR

only for gel detection

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended)

e.g. AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix, Applied Biosystems No. 4318739;
Qiagen HotStarTaq MasterMix Kit Qiagen No. 203443; Brilliant II QPCR
MasterMix, Stratagene No. 600804

for gel detection and / or Realtime (SYBR[®]Green)

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended)

e.g. Power SYBR[®] Green PCR MasterMix, Applied Biosystems No.
4367659; QuantiTect SYBR[®]Green PCR Kit Qiagen No. 204143;
Brilliant II SYBR[®] Green MasterMix Stratagene No. 600548

Detection

- agarose
- ethidium bromide
- buffer for gel fabrication, gel overlaying, and electrophoresis running
buffer:
 - 1 x TAE - buffer (Tris 40 mmol / l, acetic acid 20 mmol / l,
EDTA 1 mmol / l)
- gel loading buffer, e.g. 5 - fold (sucrose 5 %, Orange G 0.25 %)
- DNA length marker, range 50 - 1000 bp

4. Precautions

- all tasks should be performed taking all precautions common in labs, and
all PCR tasks should be performed in accordance with the CEN / ISO
recommendations
- to avoid carryovers, perform all work wearing protective gloves and use
filter tips
- perform sample preparation, PCR setup and detection in separate rooms
- ethidium bromide is damaging to DNA and should therefore be handled
in compliance with the regulations
- UV light is damaging to DNA, so take care when using the UV
transilluminators

5. Storage instructions

Store the test kit and the reaction vials at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F).

6. Sample enrichment and DNA isolation

6.1. Filtration

100 ml of the water sample will be filtrated through a 0.45 µm nitrocellulose filter Ø 50 mm with a filtration equipment.

With each analyzing series one sample without matrix should be done as an extraction control. A positive extraction control indicates a contamination in the reagents.

6.2. DNA isolation

The recommendation for DNA – Extraction is depended on the PCRFast[®] Microbe extraction Kit. For the DNA-extraction place the filter with 1225 µl of lysis puffer (e.g. PCRFast[®] Microbe Extraction 600 µl M1 and M2 each and 25 µl Proteinase K) in one Petridish Ø 60mm. Incubate the dish for 15 minutes at 70 °C (158°F) with shaking. Transfer the lysate completely (approx. 600 µl – 800 µl) in a reaction tube and mix it with Ethanol in a ratio of 2 : 1 (e.g. 800 µl lysat + 400 µl Ethanol). Apply entire solution to the column, centrifuge at 11,000 x g for 1 min; discard flow-through. If it is not possible to load the complete solution to the column repeat this step. Continue the extraction procedure according to the manual of the extraction kit manufacturer (e.g. PCRFast[®] Microbe Extraction). After the extraction the eluate has to be diluted with a ratio of 1 : 10 with 0.1 x TE buffer.

6.3. Confirming suspect colonies

To confirm suspect colonies on solid culture medium, it suffices to slurry one loop of this colony in 0.2 ml of deionized water and heat it at 95 °C (203 °F) for 10 min. The sample is then cooled and centrifuged at 14,000 x g for 5 min. The supernatant can be used directly for PCRFast[®].

7. PCR setup

7.1. Preparations

- remove strip from the plastic bag and separate required number of reaction vials
- place the remaining strips / reaction vials and the desiccant back into the bag, seal bag and store at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F)
- have the required amount of MasterMix at hand (12.5 µl per reaction)

7.2. Procedure

–pipette the following volumes into the reaction vials:

per sample	reaction vial	MasterMix	DNA from sample
	colourless	12.5 µl	12.5 µl
inhibition control ITC	red	12.5 µl	12.5 µl
per analysis run	reaction vial	Master-Mix	0.1 x TE buffer
negative control NTC	colourless	12,5 µl	12.5 µl
positive control PTC	red	12.5 µl	12.5 µl

Tab. 1: PCRFast® Legionella pneumophila pipetting steps

–close the reaction vials (centrifuging recommended) and place them into the PCR thermocycler. Perform amplification according to the following temperature / cycler profile:

Cycler profile

10 min 95 °C (203 °F)

15 sec 95 °C (203 °F)

60 sec 72 °C (161.6 °F) **45 cycles**

Note:

Validation was performed using Brilliant® II QPCR MasterMix (for the gel detection) and Brilliant® II SYBR® Green MasterMix (for realtime and / or gel detection) by Applied Biosystems and the thermocyclers specified in section 3. The specified cycler profile may need to be adjusted to the respective instrument and the MasterMix.

7.3. Detection

7.3.1. Gel detection

- we recommend electrophoresis in 2.0 - 2.5 % agarose and staining the amplificate with ethidium bromide
- perform gel electrophoresis according to the manufacturer's instructions

Example:

- fabricate agarose gel 2.0 % - 2.5 % (dissolve 1.0 - 1.25 g agarose and 2 - 4 µl ethidium bromide 10 mg / ml in 50 ml of 1 x TAE buffer by heating and pour gel)
- overlay agarose gel with 1 x TAE buffer
- apply PCR amplificate with gel loading buffer to the agarose gel, e.g. add 6 µl of the 5 x loading buffer to the PCR amplificate (25 µl), mix and apply 10 µl
- apply length markers
- perform electrophoresis at 3 - 6 V / cm (depending on electrophoresis system) for 15 - 30 min
- visualize DNA on a transilluminator and document results

7.3.2. Realtime (SYBR[®]Green)

- assessment of the amplification in realtime (SYBR[®] Green) is done via the amplification plot and the melting curve analysis
- negative samples can be sorted out
- if the amplification plot shows an increase in fluorescence, the sample must be verified via the melting curve analysis
- to do so, compare the sample melting curve with the melting curve resulting from the inhibition control ITC
- with positive samples, the sample's melting curve peak must agree with the melting curve peak of the inhibition control ITC (temperature deviance not more than ± 0.5 °C (32.5 °F))
- in order to additionally verify a positive sample via the base length, we recommend performing an electrophoresis in 2.0 % - 2.5 % agarose gel and staining the amplification product with ethidium bromide

8. Evaluation

8.1. Gel detection

The following table summarizes the evaluation. With a positive sample, the sample band and the band of the positive control are at the same level.

8.1.1. Evaluation matrix for gel detection

Sample	Inhibition control ITC	negative control NTC	positive control PTC	Result
██████	██████			sample positive
no band	██████			sample negative
no band	no band			inhibition*
		no band		MasterMix not contaminateded
			██████	MasterMix functional

* dilute extracted sample DNA once more and amplify again

██████ = band

Tab. 2: Evaluation of PCRFast® Legionella pneumophila gel detection

8.1.2. Example of a typical agarose gel image

– The following figure shows an exemplary agarose gel image.

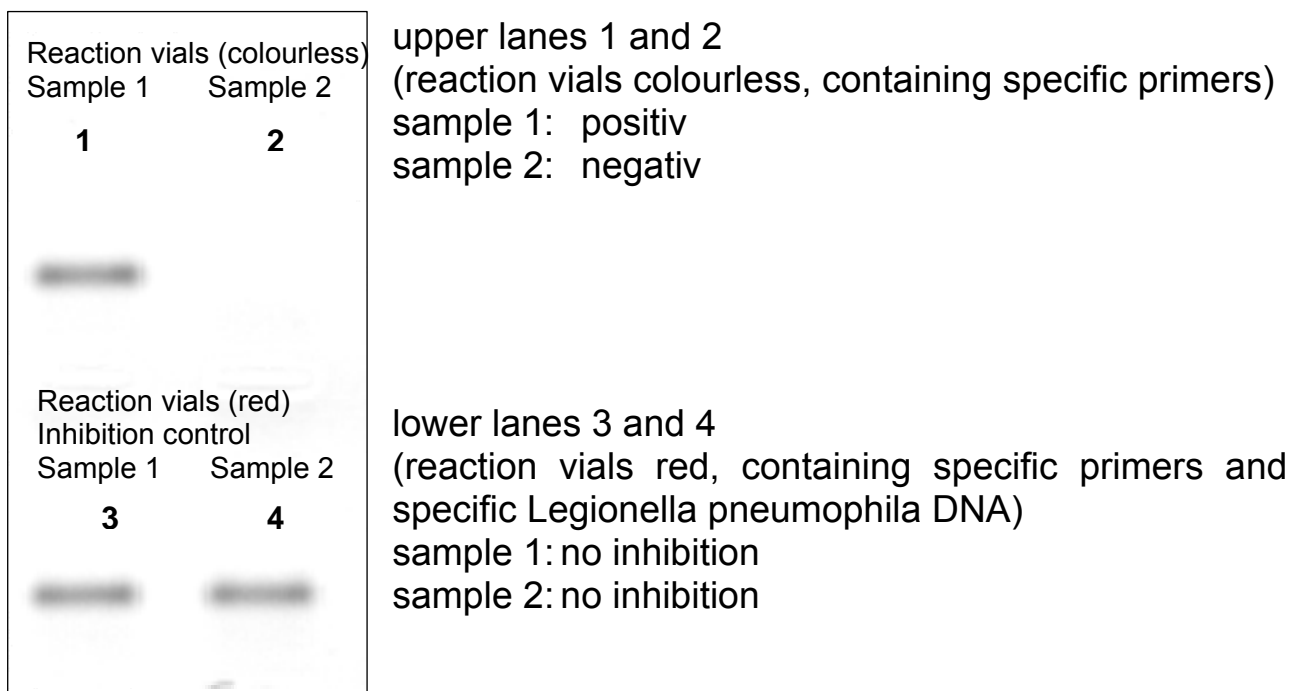


Fig. 1: Example of a PCRFast® Legionella pneumophila agarose gel image

8.2. Realtime (SYBR[®] Green)

8.2.1. Realtime (SYBR[®] Green) evaluation matrix

Sample	Inhibition control (ITC)	Result
no amplification	amplification + melting curve	sample negative
amplification + melting curve, but different melting temperature than inhibition control ITC (≥ 0.5 °C)	amplification + melting curve	sample negative
amplification + melting curve with same melting temperature as inhibition control ITC (± 0.5 °C)	amplification + melting curve	sample positive

Negative control NTC	Positive control PTC	Result
no amplification	no amplification	inhibition*
no amplification		MasterMix not contaminated
	amplification + melting curve	MasterMix functional

* dilute extracted sample DNA once more and amplify again

Tab. 3: Evaluation of PCRFast[®] Legionella pneumophila (Realtime SYBR[®] Green)

8.2.2. Examples of amplification plot evaluation

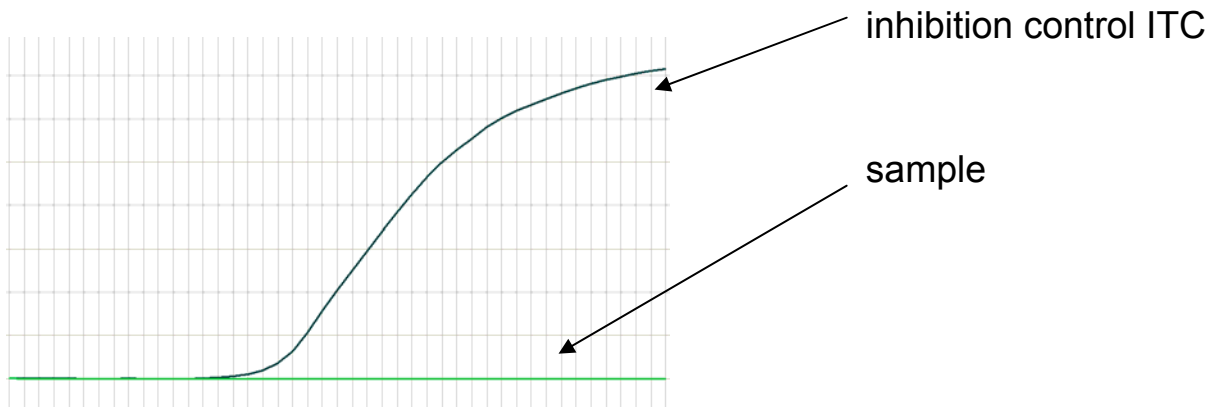


Fig. 2: sample negative; sample without amplification plot

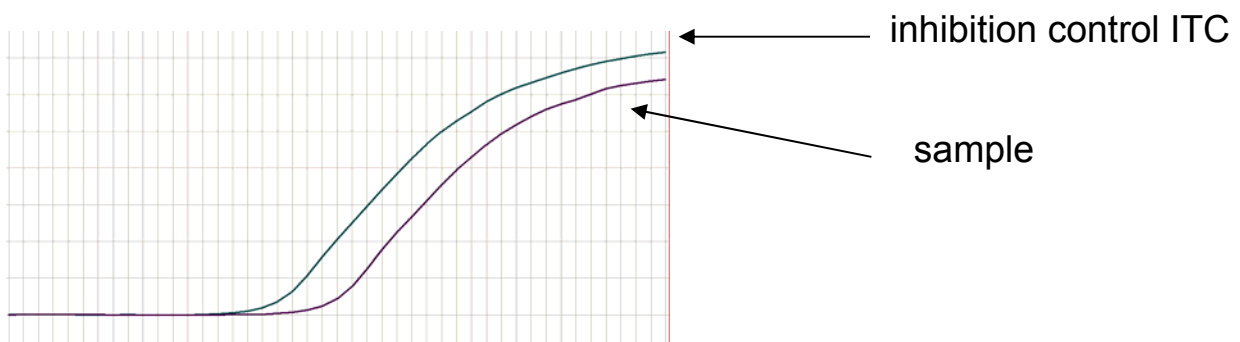


Fig. 3: sample positive, but result verification via melting curve analysis

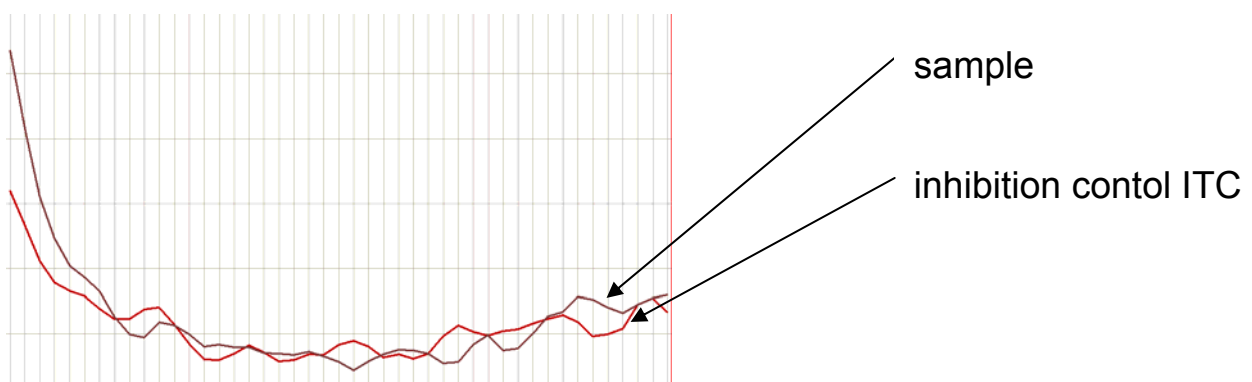


Fig. 4: reaction inhibition, dilute extracted sample DNA once more and amplify again

8.2.3. Examples of melting curve evaluation

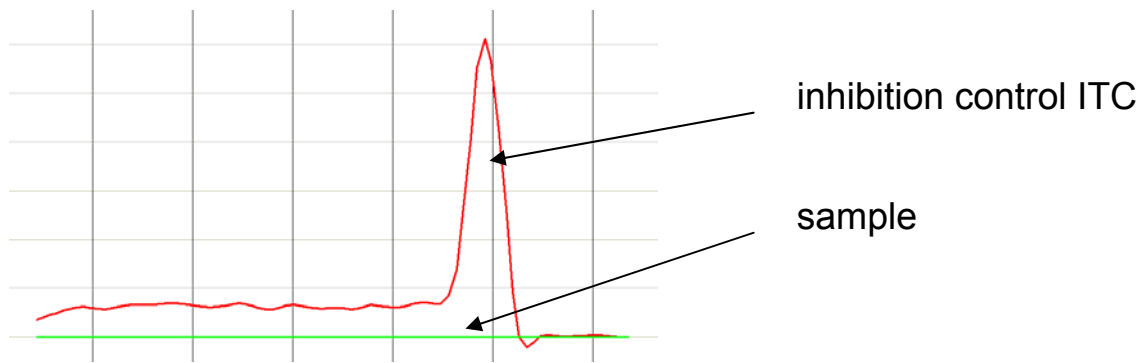


Fig. 5: sample negative; sample without melting curve

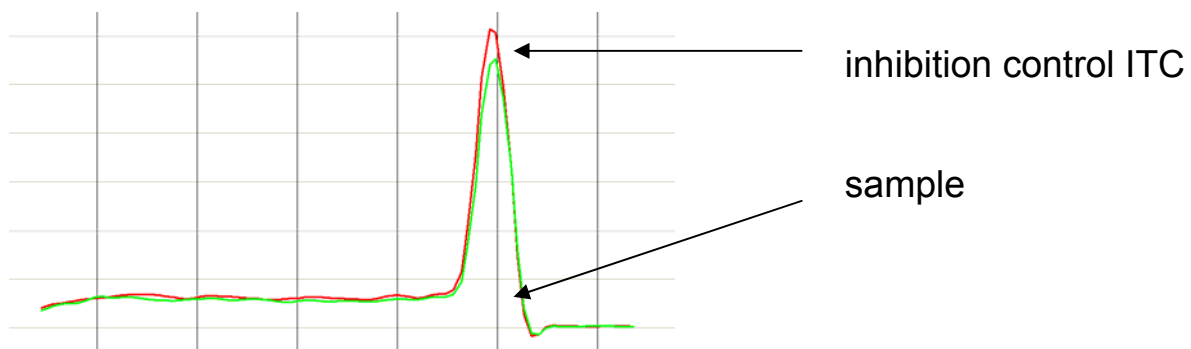


Fig. 6: sample positive; sample and inhibition control ITC with same melting curve

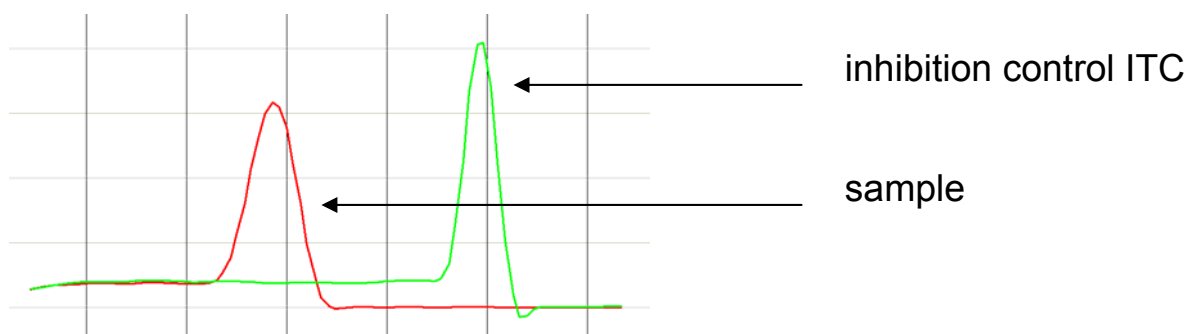


Fig. 7: sample negative; sample and inhibition control ITC with different melting curves

9. Sensitivity

Limit of detection: 1 *Legionella pneumophila* in 1ml water sample
filtrating 100 ml.

10. Specificity

PCRFast[®] *Legionella pneumophila* is 100% specific for *Legionella pneumophila*. The following species have each been tested for cross-reactivity with at least 2500 copies:

Species		Species		Species	
<i>Legionella pneumophila</i>	+	<i>Legionella erythra</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Salmonella thyphimurium</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-		

Tab. 4: Specificity of PCRFast[®] *Legionella pneumophila*

+ band with 160 bp

+ no band with 160 bp

Should you have any questions on how to conduct this test, on sample preparations or on PCR analysis in general, please contact the Competence Centre for DNA Analysis of ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com

Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0

Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50

You will also find more information on conducting PCRFast[®] at www.produktqualitaet.com.



These specifications are based on our current state of knowledge and are designed to provide information about our products and their potential applications. They are not intended to guarantee certain product properties or suitability for a specific application. ifp does not accept any liability except for the standard quality of the reagents. Replacement will be provided for any defective products. ifp are not liable for any other claims concerning direct or indirect damage or costs arising from the use of the products.

11. References

ISO 22174

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - General requirements and definitions

ISO 20837

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for sample preparation and qualitative detection

ISO 20838

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods