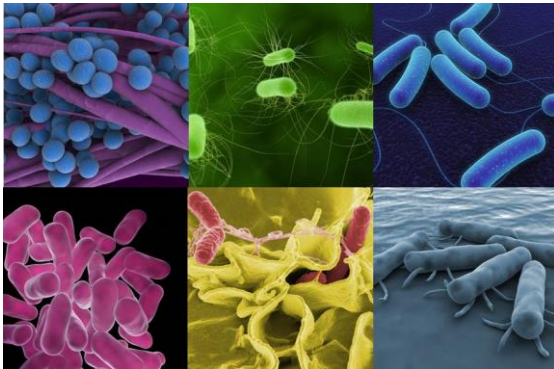


**CONGEN**

**SureFast<sup>®</sup>**  
**Legionella pneumophila PLUS**

Art. No. F5501  
100 rxn

**User Manual**



**March 2025**

 **Inhalt**

1	Allgemeines .....	3
1.1	Beschreibung .....	3
1.2	Nachweisgrenze .....	3
1.3	DNA-Präparation .....	4
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung .....	4
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien .....	4
1.6	Vorsichtsmaßnahmen .....	4
1.7	Geräteeinstellungen .....	5
1.8	Detektionskanaleinstellungen .....	5
2	Qualitative Analyse .....	6
2.1	Protokoll .....	6
2.1.1	Herstellen des Master-Mix .....	6
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix .....	6
2.2	Interpretation der Ergebnisse .....	7
3	Grenzen der Methode .....	7
4	Weitere Informationen .....	7
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	7
4.2	Technischer Support .....	7



## **Content**

1	General Information .....	8
1.1	Description .....	8
1.2	Limit of Detection .....	8
1.3	DNA-preparation .....	9
1.4	Kit components and storage .....	9
1.5	Additionally required equipment and materials .....	9
1.6	Precautions for users .....	9
1.7	Setup.....	10
1.8	Detection channel Set-up .....	10
2	Qualitative Analysis .....	11
2.1	Protocol .....	11
2.1.1	Preparation of the master-mix .....	11
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix .....	11
2.2	Interpretation of results .....	12
3	Limitations of the method .....	12
4	Further Information .....	12
4.1	Product Information .....	12
4.2	Technical Support .....	12

## 1 Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

SureFast® Legionella pneumophila PLUS ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz von *Legionella pneumophila* in Wasser.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) ausgestattet. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der DNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid).

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Agilent Mx3005P.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Legionella pneumophila PLUS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Die SureFast® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-DNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-DNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-DNA erhalten.

### 1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFast® PREP Aqua (Art. Nr. F1023) empfohlen.

### 1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

**Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.**

**Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.**

### 1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP Aqua Art. Nr. F1023)
- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

### 1.6 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

**1.7 Geräteeinstellungen**

	<b>Blockcycler &amp; R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<b>Rotorcycler &amp; LightCycler® 480 II</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	1 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

**1.8 Detektionskanaleinstellungen**

<b>Real-time PCR Gerät</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Detektions- kanal</b>	<b>Quencher</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx /Mx</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96/Dx/Opus</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	green	+	<b>Ignore cycles before</b> , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungsanleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse
	IAC	yellow	+	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	green	+	<b>Achtung:</b> Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	IAC	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

## **2 Qualitative Analyse**

### **2.1 Protokoll**

#### **2.1.1 Herstellen des Master-Mix**

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen.

Folgende Kontrollen werden empfohlen: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und Positive Control.

Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

#### **Benötigte Reaktionen für den qualitativen *Legionella pneumophila*-Nachweis:**

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

#### **Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:**

<b>Komponenten des Master-Mix</b>	<b>Menge pro Reaktion</b>	<b>10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)</b>
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.**

#### **2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix**

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle (Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix).
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße.
- Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße.
- Verschließen der Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

## 2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter *Legionella pneumophila* detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter *Legionella pneumophila* bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der IAC führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positive Control zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter *Legionella pneumophila* bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) positiv ist.

Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal keine Amplifikation oder keinen charakteristischen Kurvenverlauf zeigen, sind in der Proben-DNA Inhibitoren enthalten, die die PCR unterdrücken. Ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals kann ebenfalls eine Inhibition anzeigen. In diesen Fällen muss die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Alternativ kann die DNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem für *Legionella pneumophila* mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

## 3 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Es deutet darauf hin, dass die Ziel DNA (*Legionella pneumophila* DNA) vorhanden ist.

## 4 Weitere Informationen

### 4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: [www.congen.de/download](http://www.congen.de/download))
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: [www.congen.de/eifu/](http://www.congen.de/eifu/))
- Validierungsreport auf Anfrage

### 4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).



## 1 General Information

### 1.1 Description

The SureFast® Legionella pneumophila PLUS is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific DNA sequence of *Legionella pneumophila* in water.

Each reaction contains an internal amplification control (IAC). If the DNA contains PCR inhibiting substances, the signal of the amplification control will be affected or the amplification will be suppressed. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride).

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The internal technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Agilent Mx3005P.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFast® Legionella pneumophila PLUS real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

The SureFast® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target DNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total DNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target DNA.

### 1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Aqua (Art. No. F1023) is recommended.

### 1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

**Store all reagents at -28 to -16°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.**

**Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.**

### 1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP Aqua Art. No. F1023)
- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

### 1.6 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled and disposed according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

## 1.7 Setup

	<b>Blockcyler &amp; R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<b>Rotorcyler &amp; LightCycler® 480 II</b>
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

## 1.8 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
<b>Agilent Mx3005P</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx /Mx</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96/Dx/Opus</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	green	+	<b>Ignore cycles before</b> , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	IAC	yellow	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	green	+	<b>Note:</b> Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	IAC	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

## 2 Qualitative Analysis

### 2.1 Protocol

#### 2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control and Positive Control.

The reaction mix contains an internal amplification control (inhibition control) per reaction.

#### Reactions needed for the qualitative *Legionella pneumophila* detection:

3 reactions for controls (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10% additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

#### Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.**

#### 2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

## 2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions have to show the correct results.

*Legionella pneumophila* DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the internal amplification control (IAC) is detected.

A sample is stated **positive** for *Legionella pneumophila*, if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the IAC.

A Cp value for the IAC is not needed to obtain a positive result of the Positive Control.

A sample is stated **negative** for *Legionella pneumophila*, if the sample DNA shows no amplification in the FAM-channel and if the internal control (VIC/HEX-channel) of the sample is positive.

If the sample DNA in the VIC/HEX-Channel shows no amplification or an irregular amplification curve, it contains PCR inhibiting substances. A significant decrease in the fluorescence signal can also show the presence of PCR inhibiting substances. Under these circumstances DNA isolation and purification of the sample need to be improved. Alternatively the DNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific *Legionella pneumophila* PCR assay.

## 3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of a viable organism. It is indicative for the presence of the target DNA (*Legionella pneumophila* DNA).

## 4 Further Information

### 4.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: [www.congen.de/en/downloads](http://www.congen.de/en/downloads))
- Product-related documents (Download: [www.congen.de/en/eifu/](http://www.congen.de/en/eifu/))
- Validation Report upon request

### 4.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de).