

Aqua Screen® *FastExtract*

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	3
3.1 Gewinnung des Probenmaterial	3
3.2 Filtration der Wasserprobe	3
3.3 Lyse	3
3.4 DNA-Elution	4
4. Konzentrationsberechnung	4
5. Sicherheitsinformationen	4
Anhang: Prozessschema	6

Contents

1. Reagents and Materials	6
1.1 Test Kit Components	6
1.2 Stability and Storage	6
1.3 Supplemental Requirements	6
2. Application and Test Principle	7
3. Test Protocol	7
3.1 Preparation of Sample Material	7
3.2 Filtration of the Water Sample	7
3.3 Lysis	7
3.4 DNA Elution	6
4. Calculations	7
5. Safety Information	7
Appendix: Schematics of Process	11

1. Reagenzien und Materialien

1.1 Inhalt der Packung

Arbeitsanleitung

	für 3 Extraktionen (Trial Kit)	für 10 Extraktionen	für 50 Extraktionen
<i>Membrane Filter</i> (Membranfilter)	3	10	50
Porenweite 0,45 µm, steril, einzeln verpackt			
<i>Incubation Dishes</i> (Inkubationsschalen)	3	10	50
<i>Incubation Tubes</i> (Inkubationsgefäße)	3	10	50
<i>Spin Columns</i> (Spin Columns)	3	10	50
<i>Collection Tubes</i> (Auffanggefäße)	9	30	150
<i>Sample Storage Tubes</i> (Probengefäße)	15	15	60
<i>Lysis Buffer</i> (Lysepuffer)	12,5 ml	25 ml	125 ml
<i>Wash Buffer 1*</i> (Waschpuffer 1)	3 ml nach Zugabe von 1,65 ml Ethanol	6 ml nach Zugabe von 3,3 ml Ethanol	30 ml nach Zugabe von 16,5 ml Ethanol
<i>Wash Buffer 2[†]</i> (Waschpuffer 2)	3 ml nach Zugabe von 2,15 ml Ethanol	6 ml nach Zugabe von 4,3 ml Ethanol	30 ml nach Zugabe von 21,5 ml Ethanol
<i>Elution Buffer</i> (Elutionspuffer)	0,5 ml	1 ml	5 ml

(*) Enthält chaotrophes Salz. Reizend! Sicherheitsmaßnahmen beachten! Keine Bleichmittel zur Desinfektion verwenden.

([†]) Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel. Bitte verwenden Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzbrille und Einmalhandschuhe.

1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien und Materialien werden bei Raumtemperatur gelagert. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung sind die ungeöffneten Reagenzien bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Nach erstmaligem Gebrauch müssen die geöffneten Reagenzien innerhalb von 2 Monaten verwendet werden. Vor der ersten Benutzung muss zu den Waschpuffern 1 und 2 Ethanol (96-100 %) in den oben angegebenen Volumina hinzu gegeben werden. Eventuelle Präzipitate im Lysepuffer müssen vor Verwendung durch kurzzeitige Erwärmung gelöst werden. Dazu kann der Puffer ohne Qualitätseinbußen bis zu 70 °C erwärmt werden.

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

Vakuumpumpe

Absaugbank, Absaugfritten mit 47 oder 50 mm Durchmesser

Mikrozentrifuge

Mikroliterpipetten und Filterspitzen

Ethanol (96-100%)

Temperiereinrichtungen (37 °C für Petrischalen, 56 °C für Reaktionsgefäße)

2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Aqua Screen® ist ein *in vitro*-Testsystem zum qualitativen oder quantitativen Nachweis von Wasserkeimen. Als Untersuchungsmaterialien können Trinkwasser, Badebeckenwasser und von Schwebstoffen befreites Schmutzwasser verwendet werden. Aqua Screen® *FastExtract* nutzt klassische Filtrationseinrichtungen und ISO-konforme Membranfilter mit einer Porenweite von 0,45 µm. Die filtrierten Mikroorganismen werden direkt auf der Membran lysiert, die DNA extrahiert, gereinigt und in einem kleinstmöglichen Volumina unter Bedingungen eluiert, die für die anschließende PCR-Analytik mit dem Aqua Screen® *Detection Kit* optimal sind.

3. Durchführung

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Die Probenahme beeinflusst die Zuverlässigkeit der Testbefunde und muss entsprechend den Anforderungen der Gesundheitsämter bzw. des Arbeitsblattes W552 des DVGW erfolgen. Die Wasserprobe muss ungekühlt innerhalb von 48 h der Untersuchung zugeführt werden. Eine Konservierung mit chemischen Mitteln ist nicht möglich, da für die Filtration intakte Mikroorganismen benötigt werden. Mit Schwebstoffen oder festen Bestandteilen belastete Wasserproben werden notfalls durch Vorfiltration mit einem Papierfaltenfilter geklärt. Die Proben dürfen zur Klärung nicht zentrifugiert werden. Für die Untersuchung werden mindestens 100 ml Wasser benötigt. Ein Testvolumen von 1000 ml wird empfohlen. In der Probe enthaltene freie DNA von abgestorbenen und bereits lysierten Mikroorganismen passiert den Membranfilter und sind im Test nicht nachweisbar. Der Test weist lebende kultivierbare und lebende aber nicht kultivierbare (VBNC, *viable but not culturable*) Legionellen in gleicher Weise nach. Die Keime, die mit dem herkömmlichen Agarplattenverfahren nicht nachgewiesen werden können (VBNC), werden durch das Aqua Screen® System erfasst.

3.2 Filtration der Wasserprobe

1. Der Membranfilter wird vorsichtig aus der Verpackung entnommen und auf die Filterfritte gelegt.
2. Der Trichter wird aufgesetzt, mit dem gewünschten Volumen an Probenwasser befüllt und die Filtration gestartet.

3.3 Lyse



Das Präzipitat des Lysepuffers muss vollständig gelöst sein. Eine Erwärmung bis zu 70 °C beschleunigt den Lösungsvorgang.

1. Der feuchte Membranfilter wird abgenommen und mit der Oberseite nach unten in die Inkubationsschale gelegt.
2. Auf die Membran werden **2 ml Lysepuffer** pipettiert und die Inkubationsschale verschlossen.
3. Die Membran wird durch vorsichtiges Schwenken vollständig benetzt. Anschließend wird die Membran für 30 min bei 37 °C inkubiert.
4. Die Membran wird nochmals durch Schwenken mit dem Lysepuffer umspült.
5. **500 µl des Lysats** werden aus der Inkubationsschale in das 1,5 ml-Inkubationsgefäß überführt und der Ansatz bei 56 °C für 15 min inkubiert.
6. Es werden **250 µl Ethanol** hinzu gegeben und der Ansatz 5 Sekunden gevortext.

3.4 DNA-Elution



Den Elutionspuffer auf 56 °C vorwärmen.

1. Das Spincolumn wird aus der Verpackung genommen und in das Auffanggefäß gesteckt. Die Probenkennung wird auf dem Deckel notiert und mit **700 µl des Lysats** befüllt. Das restliche Lysat wird verworfen.
2. Das Spincolumn wird mit dem Auffanggefäß für 1 min bei 8.000 rpm (bzw. 6.000 rcf) zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben.
3. In das Spincolumn werden **500 µl Waschpuffer 1** hineingegeben, das Set für 1 min bei 8.000 rpm (bzw. 6.000 rcf) zentrifugiert, das Auffanggefäß verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gesteckt.
4. In das Spincolumn werden **500 µl Waschpuffer 2** hineingegeben und das Set für 1 min bei 8.000 rpm (bzw. 6.000 rcf) zentrifugiert, um den Waschpuffer 2 abzutrennen.
5. Das Spincolumn wird aus dem Auffanggefäß genommen und das Eluat (Waschpuffer 2) verworfen. Das Spincolumn wird mit dem gleichem Auffanggefäß noch einmal bei 13.200 rpm (bzw. 16.100 rcf) zur vollständigen Trocknung zentrifugiert.
6. Das Spincolumn wird in das mitgelieferte 1,5 ml Probengefäß gegeben und der Waschpuffer 2 samt Auffangröhrchen verworfen. Es werden **60 µl Elutionspuffer** (vortemperiert auf 56 °C) in das Spincolumn pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
7. Nach der Inkubation wird das System für 1 min bei 8.000 rpm (bzw. 6.000 rcf) sowie 20 sec bei 13.200 rpm (bzw. 16.100 rcf) zentrifugiert, das Spincolumn entfernt und das Probengefäß verschlossen. Der Extrakt ist bei +2 °C bis +8 °C für ca. 1 Woche stabil und kann bei mindestens -18 °C gelagert werden.

4. Konzentrationsberechnung

Die in der Probe enthaltene Konzentration an Legionellengenome (nicht zu vergleichen mit koloniebildenden Einheiten, KBE) kann bei einer anschließenden quantitativen real-time PCR-Analyse von 10 µl des Extraktes und einer Standardkurve (Artikel Nr. 52-0101) folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{Genome/PCR} \times 25,71 \times \frac{1000}{\text{Probenvolumen in [ml]}} = \text{Legionellenpartikel pro Liter}$$

Beispiel: 500 ml Probenwasser werden für die Untersuchung verwendet. Die real-time PCR ergibt eine Konzentration von 30 DNA-Kopien pro Testvolumen (10 µl).

$$30 \text{ Kopien/PCR} \times 25,71 \times 2 = 1542 \text{ Legionellenpartikel pro Liter}$$

Also befanden sich in den 500 ml Probenwasser 771 intakte Legionellenpartikel (lebende kultivierbare, lebende jedoch nicht kultivierbare und tote jedoch intakte Legionellen).

5. Sicherheitsinformationen

Immer Einmalhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Bestandteile des Lysepuffers und des Waschpuffers 1 können mit Bleichmitteln oder säurehaltigen Lösungen hochreaktive Verbindungen bilden. **Mischen Sie keine säurehaltigen oder bleichenden Mittel mit dem Flüssigabfall.** Ausgelaufene oder verschüttete Reste können mit Wasser und Spülmittel entfernt werden.

Risikosätze für den Lysepuffer:

R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

R 36/38 Reizt die Augen und die Haut.

R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

Risikosätze für den Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2:

R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

R 36/38 Reizt die Augen und die Haut.

Sicherheitssätze:

S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.

S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

1. Reagents and Materials

1.1 Test Kit Components

	for 3 units (Trial Kit)	for 10 units	for 50 units
<i>Membrane Filter</i> pore size 0,45 µm, sterile, single use	3	10	50
<i>Incubation Dishes</i>	3	10	50
<i>Incubation Tubes</i>	3	10	50
<i>Spin Columns</i>	3	10	50
<i>Collection Tubes</i>	9	30	150
<i>Sample Storage Tubes</i>	5	15	60
<i>Lysis Buffer</i>	12,5 ml	25 ml	125 ml
<i>Wash Buffer 1*</i>	3 ml add 1,65 ml ethanol	6 ml add 3,3 ml ethanol	30 ml add 16,5 ml ethanol
<i>Wash Buffer 2†</i>	3 ml add 2,15 ml ethanol	6 ml add 4,3 ml ethanol	30 ml add 21,5 ml ethanol
<i>Elution Buffer</i>	0,5 ml	1 ml	5 ml

(*) Contains chaotropic salt, which is an irritant. Take appropriate laboratory safety measures and wear gloves when handling. Not compatible with disinfecting agents containing bleach.

(†) Contains sodium azide as a preservative. When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

1.2 Stability and Storage

Kit components are stored at room temperature. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date. Following the initial use, the reagents are to be used within 2 months. Prior to first use, add the above mentioned volumes of ethanol (96-100%) to Wash Buffer 1 and 2. Bring the reagents to room temperature (+18°C to +25°C) prior to use. Resuspend possible precipitate in the Lysis Buffer by heating. Buffer may be heated up to 70°C without loss of quality.

1.3 Supplemental Requirements

vacuum pump

micro centrifuge

filtration system, 47 or 50 mm frit

micropipettes and filtered tips

ethanol (96-100%)

Incubator (37 °C for petri dishes, 56 °C for reaction tubes)

2. Application and Test Principle

Aqua Screen® is an *in vitro* test system for the qualitative or quantitative detection of water pathogens. The flexibility of the test system allows for a variety of water sources to be tested. Aqua Screen® utilizes the standard 0.45 µm membranes used routinely with filtration systems, the lysis of the precipitated microorganisms directly on the filtration membrane, the DNA extraction as well as the purification and elution of the DNA in minimal volumes under conditions which are optimal for the subsequent PCR analysis.

3. Test Protocol

3.1 Preparation of Sample Material

Drinking water, bathing or pool water and waste water released from suspended particles can be used as sample materials. The sample conditioning affects the reliability of the test findings and must be in accordance with the guidelines of the ISO Norm 11731. For additional guidelines pertaining to the water sampling procedure, please refer to ISO Norm 5667-1 to 5667-10 or contact your national environmental agency. The water samples should be kept at room temperature, and tested within two days of collection. Preservation with chemical means is not possible as intact microorganisms are needed for the filtration procedure. Water samples contaminated with suspended particles or fixed volatile contents have to be purified by filtration with a folded paper filter. The samples may not be centrifuged for purification. For the testing procedure, at least 100 ml is minimally required, however a sample volume of 1000 ml is recommended. Free DNA of already lysed microorganisms in the sample passes through the membrane filter and is not detectable in the test system. The test does not differentiate between "viable and culturable" and "viable but not culturable" (VBNC) legionella.

3.2 Filtration of the Water Sample

1. After carefully removing a membrane filter from the packaging moisten the filter for a few seconds using the sample material.
2. Insert the membrane filter into the filtration system and filtrate the amount of water required.

3.3 Lysis



Resuspend possible precipitate in the Lysis Buffer, by heating it up to 70 °C if necessary.

1. Transfer the membrane upside down into the incubation disks.
2. Pipette **2 ml** of prewarmed **Lysis Buffer**.
3. Submerge the membrane in the Lysis Buffer by carefully rocking the dish and incubate at 37°C for 30 min.
4. Rinse the membrane and homogenize the lysis buffer by rocking the dish for 10 seconds.
5. Pipette 500 µl of the lysate into the 1.5 ml-incubation tube and incubate for 15 min at 56 °C.
6. Add **250 µl of ethanol** and vortex 5 sec.

3.4 DNA Elution

Aqua
FX



Temperate the Elution Buffer to 56°C.

1. Take one spin column per sample from the kit and stick it into a collection tube. Mark the sample identification on the lit of the spin column and fill **700 µl of the sample lysate** into the spin column.
2. Centrifuge the system for 1 min at 8,000 rpm (6,000 rcf).
3. Place the spin column into a new collection tube, and discard the collection tube containing the lysate.
4. Put the spin column into a new collection tube and add **500 µl of Wash Buffer 1**.
5. Centrifuge the system for 1 min at 8,000 rpm (6,000 rcf) in order to remove the remaining Wash Buffer 1.
6. Place the spin column into a new collection tube and fill the spin column with **500 µl Wash Buffer 2**.
7. Centrifuge the system for 1 min at 8,000 rpm (6,000 rcf) in order to remove Wash Buffer 2.
8. Take the spin column out of the collection tube and dump the containing Wash Buffer 2.
9. Place the spin column again into the used collection tube.

10. Centrifuge for 30 sec at 13,200 rpm (16,100 rcf) in order to remove the remaining Wash Buffer 2.
11. Place the spin column into a sample storage tube, and discard the collection tube containing the Wash Buffer 2.
12. Pipette **60 µl of pre-warmed elution buffer** (56 °C) into the spin column. Secure the sample storage tube and incubate for 5 min at room temperature.
13. Following the incubation, centrifuge the system for 1 min at 8,000 rpm (6,000 rcf) followed by 20 sec. at 13,200rpm (16,100 rcf).
14. Remove the spin column and use the eluate directly for the PCR procedure. The extract is stable for approximately 1 week at +2 °C to +8 °C and can be kept at -18 °C for long term storage.

4. Calculations

With the use of quantitative real-time PCR and a standard curve generated with the titrated DNA standard (Cat. No. 52-0101), the quantity of legionella particles in the extract and subsequently in the sample volume can be determined. If a 10 µl test volume is used, then the total quantity of genomic equivalents present in the water sample can be calculated:

$$\text{genomes/PCR} \times 25,71 \times \frac{1000}{\text{sample volume in [ml]}} = \text{legionella particles per liter}$$

Example: A 500 ml water sample is used for the analysis and extracted in 60 µl. On the basis of the real-time PCR, a result of 30 DNA copies is determined using a test volume of 10 µl.

$$30 \text{ genomes/PCR} \times 25,71 \times 2 = 1542 \text{ legionella particles per liter}$$

In the 500 ml sample water, there were 771 intact legionella particles (viable culturable, viable but not culturable (VBNC), and dead yet still intact legionella). That results in 154 legionella particles per 100 ml of water.

5. Safety Information

Always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. The sample-preparation waste contains lysis buffer and wash buffer 1, which can form highly reactive compounds when combined with bleach. **DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.** If liquid containing these buffers is spilt, clean with suitable laboratory detergent and water.

The risk phrases applying to lysis buffer are:

- R 22 Harmful if swallowed.
- R 36/38 Irritating to eyes and skin.
- R 52/53 Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

The risk phrases applying to wash buffer 1 are:

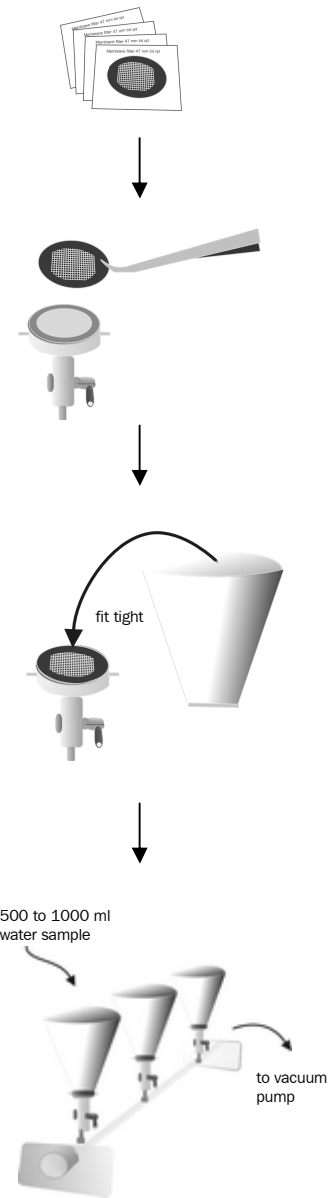
- R 22 Harmful if swallowed.
- R 36/38 Irritating to eyes and skin.

The risk and safety phrases applying are:

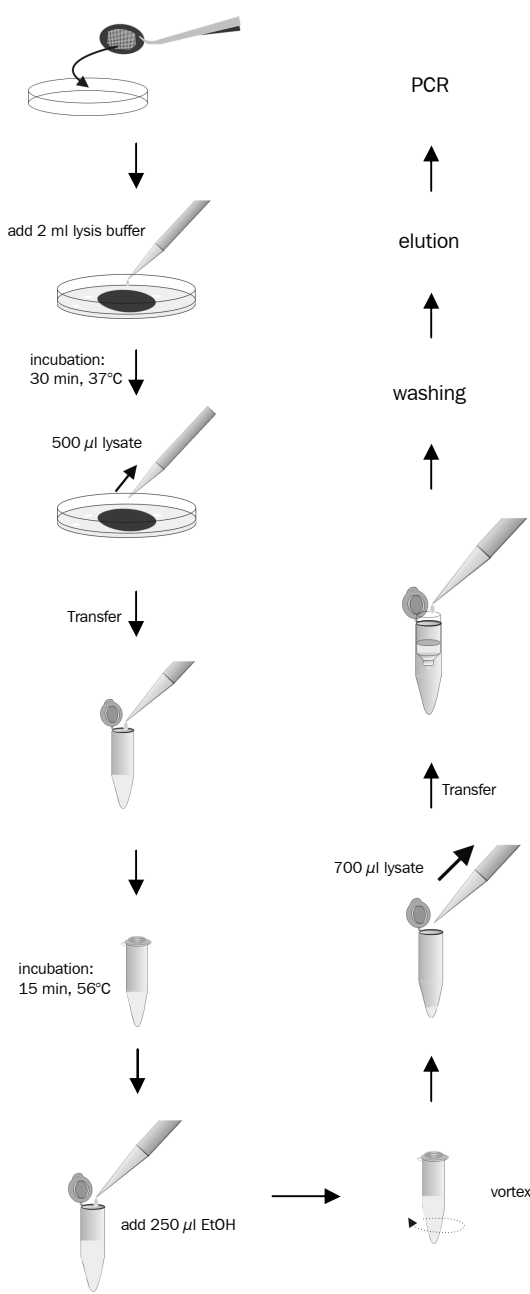
- S 13 Keep away from food, drink and animal feed.
- S 26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
- S 36 Wear suitable protective clothing.
- S 46 If swallowed, seek medical advice immediately and show container or label.

Process:

1. Filtration:



2. Lysis



Related Products

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

Quantification Standards, 100 µl each, 1x10⁶ genomes/µl
52-0101 *Legionella pneumophila* DNA Standard

DNA Remover™
15-2025 DNA Decontamination Reagent, spray bottle 250 ml
15-2200 DNA Decontamination Reagent, refill bottles 4 x 500 ml

Aqua Screen Fast Extract Kit
32-1010/1050/1200 Extraction Kit 10/50/250 extractions

Diagnostic Kits for Conventional PCR

33-1025	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for conv. PCR	25 tests
33-1100	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for conv. PCR	100 tests
33-1250	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit for conv. PCR	250 tests
34-1025	<i>Legionella pneumophila</i> Detection Kit for conv. PCR	25 tests
34-1100	<i>Legionella pneumophila</i> Detection Kit for conv. PCR	100 tests
34-1250	<i>Legionella pneumophila</i> Detection Kit for conv. PCR	250 tests

Diagnostic Kits for Real-Time PCR

33-2025	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit type 1	25 tests
33-2100	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit type 1	100 tests
33-2250	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit type 1	250 tests
33-4025	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit type 2	25 tests
33-4100	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit type 2	100 tests
33-4250	<i>Legionella</i> spp. Detection Kit type 2	250 tests
34-2025	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit type 1	25 tests
34-2100	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit type 1	100 tests
34-2250	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit type 1	250 tests
34-4025	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit type 2	25 tests
34-4100	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit type 2	100 tests
34-4250	<i>L. pneumophila</i> Detection Kit type 2	250 tests

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.

Trademarks

Aqua Screen is a registered trademark of Minerva Biolabs.

