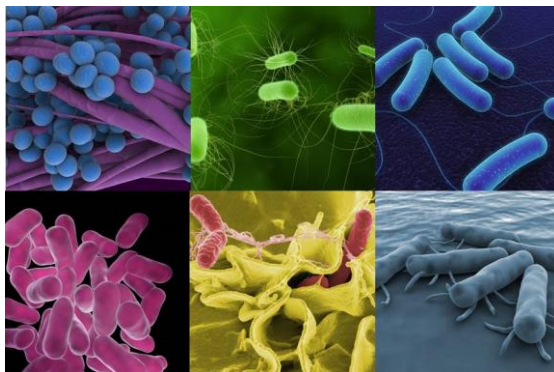


SureFast® Parodontitis AFP 4plex RUO

Art. No. C5610RUO
100 rxn

User Manual



January 2024

 **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	Geräteeinstellungen	4
1.7	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	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse	7
3	Weitere Informationen	9
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	9
3.2	Technischer Support	9



Content

1	General Information	10
1.1	Description	10
1.2	Limit of Detection	10
1.3	DNA preparation	11
1.4	Kit-components and storage	11
1.5	Additional required equipment and materials.....	11
1.6	Setup.....	11
1.7	Detection channel Set-up	12
2	Qualitative Analysis	13
2.1	Protocol	13
2.1.1	Preparation of the master-mix	13
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	14
2.2	Interpretation of results	14
3	Further Information	16
3.1	Product Information.....	16
3.2	Technical Support	16

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® Parodontitis AFP 4plex RUO ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Grenzwertbestimmung der Parodontitis-Erreger *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* und *Prevotella intermedia*.

Der Test enthält eine Internal Control DNA (ICD) die entweder nur als interne Amplifikationskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX, ROX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Agilent AriaDx.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Parodontitis AFP 4plex RUO real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 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 DNA/RNA Virus (Art. Nr. F1051) empfohlen.

Der Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäurereaktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die ICD nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden.

Wird die ICD als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICD während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD soll dem Proben-Lysisbuffer Mix und nicht direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der ICD zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

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
D	Internal Control DNA	2 x 1700 µl	Orange
N	PCR Water	450 µl	Weiß
A	Standard DNA A (1x10 ² Kopien/µl)	100 µl	Dunkelblau
B	Standard DNA B (1x10 ⁴ Kopien/µl)	100 µl	Dunkelblau
C	Standard DNA C (1x10 ⁶ Kopien/µl)	100 µl	Dunkelblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°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 DNA/RNA Virus Art Nr. F1051)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler	LightCycler® 480 II RIDA®CYCLER
RT Reaction	10 min, 58°C	10 min, 58°C
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

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Aria Dx	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>F. nucleatum</i>	ROX	+	
	<i>P. intermedia</i>	Cy5	+	
BioRad CFX96/Dx	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>F. nucleatum</i>	ROX	+	
	<i>P. intermedia</i>	Cy5	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	IAC	yellow	+	
	<i>F. nucleatum</i>	orange	+	
	<i>P. intermedia</i>	red	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	green	+	
	IAC	yellow	+	
	<i>F. nucleatum</i>	orange	+	
	<i>P. intermedia</i>	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit IV (Art. Nr. F4012) wird benötigt.
	IAC	533-580	+	
	<i>F. nucleatum</i>	533-610	+	
	<i>P. intermedia</i>	618-660	+	

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 Positivkontrollen (Standard DNA A, B, und C) empfohlen. Dieser Test enthält eine externe Internal Control DNA (ICD), die als Inhibitions – bzw. als Extraktionskontrolle eingesetzt werden kann.

Benötigte Reaktionen für den SureFast® Parodontitis AFP 4plex RUO -Nachweis

5 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 3 x Positivkontrollen)

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 bei Verwendung der ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle:

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

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der ICD als interne Inhibitionskontrolle:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
Internal Control DNA	1,0 µl	11,0 µl
Gesamtvolumen	21,0 µl	231 µl

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.
- Für die Negativkontrolle pipettieren von 5 µl des PCR Water in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Je 5 µl Standard DNA (A, B, C) in die vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren. 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.
- Für die Standard DNAs ist die Gesamtkopienanzahl je Reaktion in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen. Es werden 5 µl DNA im Reaktionsansatz verwendet, so dass sich folgende Konzentrationen ergeben:
Standard DNA A 5x10² Kopien/Reaktionsansatz
Standard DNA B 5x10⁴ Kopien/Reaktionsansatz
Standard DNA C 5x10⁶ Kopien/Reaktionsansatz

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 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, im ROX-Kanal der Parameter *Fusobacterium nucleatum* und im Cy5-Kanal der Parameter *Prevotella intermedia* detektiert (Siehe Tabelle). Im VIC/HEX-Kanal wird eine Amplifikationskontrolle/ Extraktionskontrolle (ICD) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Für die Bestimmung eines Grenzwertes von positiven Proben werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert.

Die Steigung (slope) der Standardkurve muss einen Wert zwischen -3,1 bis -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,98$ sein. Bei abweichenden Werten kann die Standardkurve nicht für die Auswertung verwendet werden. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA führen.

Ein Cp-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Standard DNA zu erhalten.

Es wird der DNA-Gehalt der Probe in Kopien/Reaktionsansatz ermittelt. Die Umrechnung in die Konzentrationseinheit Zellen/Probe erfolgt über einen Korrekturfaktor K, welcher die Verdünnungen der DNA-Extraktion (abhängig vom verwendeten Extraktionskit) und des PCR-Ansatzes sowie die Anzahl der Zielsequenz im gesamten Genom berücksichtigt.

Die Umrechnung des Ergebnisses in den Zellgehalt der Probe erfolgt mit folgender Formel:

$$c \text{ [Zellen/Probe]} = c \text{ [Kopien/Reaktionsansatz]} \times K$$

c [Zellen/Probe] - Bakterienkonzentration der Probe in Zellen/Probe
 c [Kopien/Reaktionsansatz] - DNA-Konzentration im PCR-Reaktionsansatz
 (Ergebnis der quantitativen PCR)
 K - Korrekturfaktor

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist.

Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal **keine Amplifikation** oder eine Cp-Abweichung > 2 zur Negativkontrolle 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 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* oder *Prevotella intermedia* mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal <i>A. actinomycetemcomitans</i>	ROX-Kanal <i>F. nucleatum</i>	Cy5-Kanal <i>P. intermedia</i>	VIC/HEX-Kanal IAC	
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>A. actinomycetemcomitans</i> DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>F. nucleatum</i> -DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>P. intermedia</i> -DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	negativ, keine Ziel DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte
(Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Verifizierungsdaten auf Anfrage

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an info@congen.de.

1 General Information

1.1 Description

The SureFast® Parodontitis AFP 4plex RUO is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection and limit value determination of the periodontitis pathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia*.

The test assay contains an Internal Control DNA (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR inhibition.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at the channels FAM, VIC/HEX, ROX and Cy5 at the same time. The technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Agilent AriaDx.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Parodontitis AFP 4plex real-time PCR has a limit of detection of ≤ 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 DNA/RNA Virus (Art. No. F1051) is recommended.

The test assay contains an Internal Control DNA (ICD) that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirm that nucleic acid extraction was sufficient. The Internal Control DNA (ICD) can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the ICD is used only as a PCR inhibition control, 1 µl per reaction of the ICD should be added to the master-mix (see point 2.1.1).

If the ICD is used as an extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, 20 µl of the ICD should be added during extraction procedure. The ICD should always be pipetted to the sample with added Lysis Buffer and must not be added directly to the raw sample. We also recommend to add 1 µl of the ICD to the negative control and positive control PCR Mix.

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
D	Internal Control DNA	2 x 1700 µl	Orange
N	PCR Water	450 µl	White
A	Standard DNA A (1x10 ² copies/µl)	100 µl	Dark blue
B	Standard DNA B (1x10 ⁴ copies/µl)	100 µl	Dark blue
C	Standard DNA C (1x10 ⁶ copies/µl)	100 µl	Dark blue

Store all reagents at –20°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 Additional required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP DNA/RNA Virus Art. No. F1051)
- real-time PCR instrument with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Setup

	Blockcyler	LightCycler® 480 II / RIDA®CYCLER
RT-Reaction	10 min, 58°C	10 min, 58°C
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

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Aria Dx	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>F. nucleatum</i>	ROX	+	
	<i>P. intermedia</i>	Cy5	+	
BioRad CFX96/Dx	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>F. nucleatum</i>	ROX	+	
	<i>P. intermedia</i>	Cy5	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	IAC	yellow	+	
	<i>F. nucleatum</i>	orange	+	
	<i>P. intermedia</i>	red	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	green	+	
	IAC	yellow	+	
	<i>F. nucleatum</i>	orange	+	
	<i>P. intermedia</i>	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	<i>A. actino-mycetemcomitans</i>	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit IV (Art. No. F4012) is required.
	IAC	540-580	+	
	<i>F. nucleatum</i>	540-610	+	
	<i>P. intermedia</i>	610-670	+	

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, negative extraction control, positive control (Standard DNA A, B and C). The test contains an Internal Control DNA (ICD), which can either be used as PCR inhibition control or as positive extraction control.

Reactions needed for the qualitative SureFast® Parodontitis AFP 4plex RUO-assay:

5 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 3x positive controls)

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 using ICD as positive extraction control and PCR inhibition control.

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
Total volume	20 µl	220 µl

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

Example for the calculation and preparation of 10 reactions for ICD only as PCR inhibition control:

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
Internal Control DNA	1.0 µl	11.0 µl
Total volume	21 µl	231 µl

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.
- For the negative control pipette 5 µl of PCR Water into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Standard DNA (A, B, C) 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.
- For the Standard DNAs type in the total copy number per reaction in the Setup File of the software program of the real-time PCR device. 5 µl DNA are used per reaction, resulting in following concentrations:

Standard DNA A	5x10 ² copies/reaction
Standard DNA B	5x10 ⁴ copies/reaction
Standard DNA C	5x10 ⁶ copies/reaction

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.

In the FAM-channel *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DNA is detected, *Fusobacterium nucleatum* DNA is detected in the ROX-channel and *Prevotella intermedia* DNA is detected in the Cy5-channel (see table). In the VIC/HEX-channel the amplification or extraction control (ICD) is detected.

A sample is stated positive for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. For the determination of the limit value in positive samples, the reactions of the standards, the controls and the samples are marked and analysed according to the evaluation instructions of the device manufacturer.

The slope of the standard curve has to be between -3.1 and -3.6 and the correlation coefficient has to be $R^2 > 0.98$. If the values deviate, the standard curve cannot be used for the evaluation. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal control DNA (ICD).

A Cp-value for the ICD is not necessary to get a positive result for the standard DNA.

The DNA content of the sample in copy numbers/reaction is determined. The conversion to the concentration unit cells/sample is carried out using a correction factor K, which takes into account the dilutions of the DNA extraction (depending on the used extraction kit) and the PCR assay as well as the number of target sequences in the entire genome.

The conversion of the result to the amount of cells in the sample is carried out using the following formula :

c [cells/sample] = c [copies/reaction] x K

- c [cells/sample] - concentration of bacteria of the sample in cells/sample
- c [copies/reaction] - DNA-concentration in the PCR-reaction
 (result of the quantitative PCR)
- K - correction factor

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and if the amplification or positive extraction control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** with a shift in Cp-value ≤ 2 compared to the negative control.

If the sample DNA in the VIC/HEX-Channel shows **no amplification** or a shift in Cp-value > 2 compared to the negative control, 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 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* or *Prevotella intermedia* PCR assay.

Result in the respective channel				Interpretation
FAM-channel <i>A. actinomycetemcomitans</i>	ROX-channel <i>F. nucleatum</i>	Cy5-channel <i>P. intermedia</i>	VIC/HEX-channel ICD	
positive	negative	negative	positive/negative	<i>A. actinomycetemcomitans</i> DNA detected
negative	positive	negative	positive/negative	<i>F. nucleatum</i> -DNA detected
negative	negative	positive	positive/negative	<i>P. intermedia</i> -DNA detected
negative	negative	negative	positive	negative, no target DNA detected
negative	negative	negative	negative	invalid

3 Further Information

3.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Validation Report upon request

3.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to info@congen.de.