



## ***Alicyclobacillus* spp.-Screen**

Reagents for the detection of *Alicyclobacillus* spp.  
English: Page 3 - 11

Reagenzien zum Nachweis von *Alicyclobacillus* spp.  
Deutsch: Seite 13 - 23

**REF:**

**MGScACB \***



Storage of reagents: -15 °C to -20°C



**Milenia Biotec GmbH**  
Versailler Straße 1  
D-35394 Gießen, Germany  
Tel.: +49-(0)641-94 88 83 - 0  
Fax: +49-(0)641-94 88 83 - 80  
E-Mail: [info@milenia-biotec.de](mailto:info@milenia-biotec.de)  
Web: [www.milenia-biotec.de](http://www.milenia-biotec.de)



**\* Attention:**

This kit contains only reagents used for amplification.








For the detection of amplicates the following additional kit is required:

**Milenia® GenLine PCR-Universal module MGUP 1 (50 tests)**

## Table of Contents

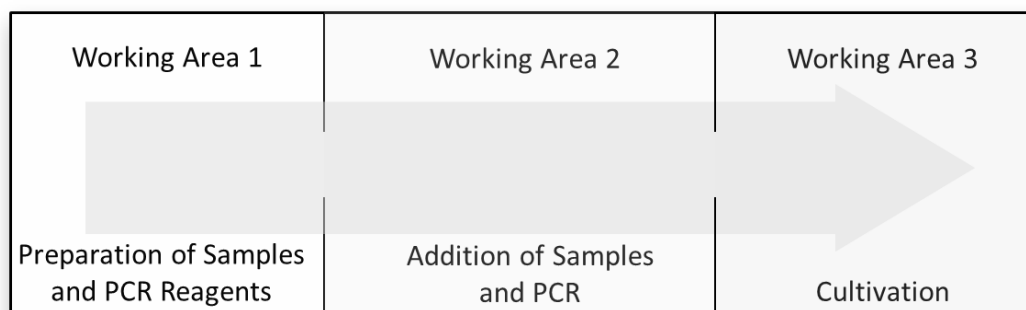
Explanation of Symbols .....	3
Warnings and Precautions .....	3
Materials Supplied, Storage and Stability .....	4
Materials Required (not included) .....	4
Intended Use .....	4
Method and Test Principle .....	4
Procedure of the Test – A short Overview .....	5
Preparation of Samples and PCR Reagents.....	6
Test Procedure.....	8
Interpretation of Results .....	9
Trouble shooting.....	10
Literature .....	10

## Explanation of Symbols

Symbols Symbole	Explanation (GB) Erklärung (DE)	Symbols Symbole	Explanation (GB) Erklärung (DE)
	Use by Verwendbar bis		Sufficient for <n> tests Ausreichend für <n> Prüfungen
	Manufacturer Hersteller		Batch code Chargenbezeichnung
	Catalogue number Katalognummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten
	Consult attended documents Begleitdokumente beachten		

## Warnings and Precautions

- Read this instruction manual carefully before running the test. Follow the sequence of the work steps
- Pay attention to the expiration dates of the individual components of the test.
- Complete thawing of all components prior use is required
- Do not exchange components with different Lot numbers
- Store all reagents at **-15 °C to -20 °C** in the original packaging
- **Immediately after use**, store all components at **-15 °C to -20 °C**
- The disposal of waste materials must be carried out according to current local regulations
- Wear laboratory coat and protective gloves
- In order to avoid contaminations, run the different steps of the test at different locations
- The place where the reaction mixes are prepared must be separated from the place where cultures are handled.
- Decontamination of the work area and the equipment used must be carried out regularly!



## Materials Supplied, Storage and Stability

REF: MGScACB 1						
Component	Part-Nr.	Quantity	Content	Preparation	Storage	Shelf life
PCR-Polymerase Master-Mix (2x)	MGPOL	2	330 µL	Ready to use	-15 °C to -20 °C	until expiry date
PCR- Primermix (2x)	MGPACB	2	280 µL	Ready to use	-15 °C to -20 °C	until expiry date
Positive Kit-Control	MGACBPC	1	50 µL	Ready to use	-15 °C to -20 °C	until expiry date
PCR-Water*	MGH2O	1	1 mL	Ready to use	-15 °C to -20 °C	until expiry date

\*PCR-Water (MGH2O) can be used as diluent or negative control.

Material safety data sheets are available on request or from the company website ([www.milenia-biotec.de](http://www.milenia-biotec.de))

## Materials Required (not included)

### Important:

In addition to the components supplied with the kit, the following reagents and items are required:

- **Milenia® GenLine PCR-Universal module (MGUP 1)**. Contains test strips and chase buffer.
- **Extraction Buffer (MGEXBA)**
- **Thermocycler Labcycler 48s**, Order code: MLCY, available at Milenia Biotec GmbH
- **Deep Freezer: -20 °C**
- Pipets 2- 20 µL, 20- 200 µL, 100- 1,000 µL
- Sterile (DNA-free) pipet tips (with contamination protection for PCR)
- Sterile (DNA-free) reaction tubes 1.5 mL
- Sterile (DNA-free) PCR-tubes 0.2 mL e.g.: Supplier: Sorensen Bioscience Inc.
- 96-well microtiter plate
- (Desktop) centrifuge for reaction- and PCR-tubes
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Tube holder for Reaction- and PCR-tubes, e.g.: isofreeze PCR tube rack

## Intended Use

The Milenia® GenLine *Alicyclobacillus*-Screen is designed for the qualitative detection of *Alicyclobacillus* species (ACB-Screen). Additionally, you can detect *Alicyclobacillus acidoterrestris* and potentially guaiacol producing organisms with the *Alicyclobacillus acidoterrestris*-Guaiacol-Screen (**MGAaG Z, has to be ordered separately**).

## Method and Test Principle

Milenia® GenLine-Tests are rapid detection systems that combine PCR (Polymerase-Chain-Reaction) methodology with detection and interpretation of the resulting products by lateral flow tests.

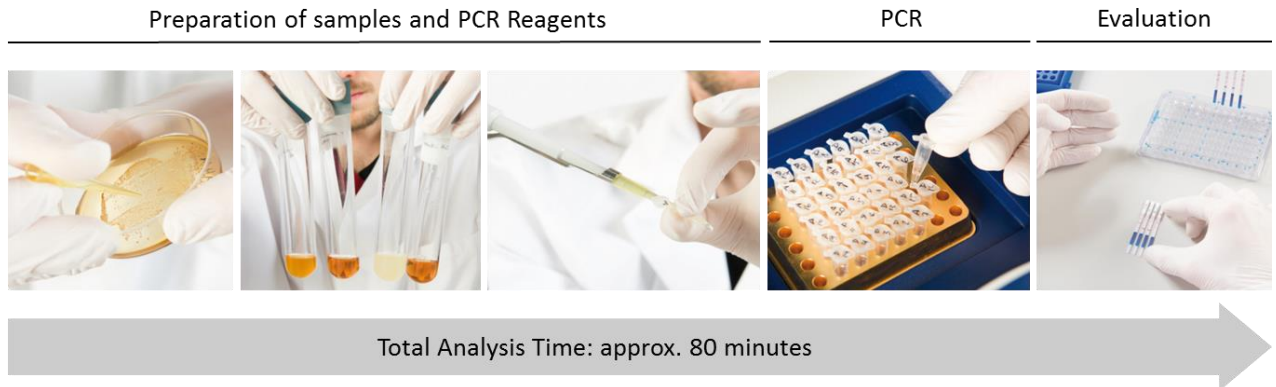
In a first part of the test, labelled specific primers (short, single stranded DNA) are used to amplify specific DNA fragments. Thus the resulting PCR products carry the labels of the incorporated primers. In addition to the target gene, a control gene, which is also present in the PCR mixes, is amplified in order to make sure that the PCR process works properly.

In a second part of the test, the created PCR products are detected by a lateral flow test strip.

## Procedure of the Test – A short Overview

The entire procedure of the test can be divided into 3 different steps.

1. The PCR reagents and the samples are prepared.
2. After the addition of the sample to the PCR reagents, the PCR is started.
3. The resulting PCR products are detected by a simple lateral flow test strip.



## Preparation of Samples and PCR Reagents

The preparation of samples and reagents includes the preparation of the PCR reaction mix and the samples to be analysed.

### A) Sample Preparation

Samples to be analyzed are fruit juice concentrates, which were 1:10 diluted in BAT-B (Döhler GmbH, Darmstadt), heat activated and cultivated over a maximum of 5 days (according to IFU12) to enrich potentially existing *Alicyclobacillus*.

#### Procedure:

- 1) Add 800 µl sterile water and 200 µl of the enriched probe in a 1.5 mL reaction tube, mix well and centrifuge for 3 min at 16 000 xg.
- 2) Homogenise the extraction buffer (MGEXBA) with the magnetic stir bar. Discard the supernatant from step 1) and add 200 µl extraction buffer (MGEXBA) to the pellet. Subsequently, the pellet is completely resuspended by thoroughly vortexing for minimum 15 s.
- 3) Incubate the suspension for 10 min at 95°C and mix thoroughly for 15 s (vortex).
- 4) Centrifuge the suspension for 1 min at 16.000 xg.
- 5) Carefully collect 2 µl of the supernatant and use in PCR. Please avoid the transfer of pieces from the pellet into the PCR reaction tube!

For later analysis the pure supernatant (without pellet) can be transferred into a new reaction tube and stored by -20°C for several months. Storing the DNA containing extract is necessary for potentially following analysis, like the *Alicyclobacillus acidoterrestris*-guaiacol-Screen (**MGAaG Z, has to be ordered separately**).

### Analysis of single colonies from solid media (z.B.: BAT-A, Döhler GmbH):

#### Procedure:

- 1) Touch a colony on the agar plate with a pipet tip. Do not wipe across the colony.
- 2) Resuspend the cells in 100 µL sterile Water.
- 3) Add 2 µL of the cell suspension to the PCR reaction mix.

If too many cells are added to the mix, this may have a negative impact on the test. Therefore, a careful light touch in step 1) is recommended.

## B) Preparation of PCR reaction mix:

Each individual tube of reaction mix has a total volume of 23 µL. In order to prepare the mix, the PCR-Polymerase Master Mix (2x) and the PCR-Primermix (2x) are mixed in a ratio as given in the table below. Finally the mix is filled in 23 µl aliquots into sterile PCR tubes.

The precise and contamination free preparation of the mix is the prerequisite of a proper function of the test. It is recommended to label all reaction tubes prior pipetting the samples. The final and aliquoted reaction mix must be used directly and placed cool (e.g. on ice) during the addition of samples. In case a positive (MGACBPC) and a negative (MGH2O) Control is included in the run, add 2 additional tubes to the number of samples introduced in the test run.

Number of PCR reaction tubes	PCR-Polymerase Master Mix (2x) (Volume to be pipetted)	PCR-Primermix (2x) (Volume to be pipetted)
1	13 µL	11 µL
5	65 µL	55 µL
10	130 µL	110 µL
20	260 µL	220 µL

### Procedure:

- 1) According to the number of samples (plus a positive and negative control) PCR-Polymerase Master Mix (2x) is pipetted into a sterile 1.5 mL reaction tube (volume is given in the table).
- 2) PCR-Primermix (2x) is added to the tube (see table).
- 3) The mix of both components is mixed well (pipet, Vortex).
- 4) Take an appropriate number of sterile 0.2 mL PCR-reaction tubes.
- 5) Pipet 23 µL of mix into each PCR reaction tube.
- 6) Close the PCR-reaction tubes immediately and add the sample at a different location.

## Test Procedure

The test procedure describes the start and termination of the PCR reaction as well as the subsequent lateral flow based detection of PCR products by a universal test strip (Milenia<sup>®</sup> GenLine Universal Module MGUP1).

### C) PCR

#### Procedure:

- 1) After addition of the sample to the PCR tube containing the reaction mix, close the tube and mix well.
- 2) Place all PCR tubes into a minicentrifuge and centrifuge the samples briefly.
- 3) All liquid should be free of air bubbles and located on the bottom of the PCR tubes.
- 4) Place the PCR tubes into a thermocycler.
- 5) Close the lid of the thermocycler.
- 6) Start the specific ACB/AaG program.
- 7) After completion of the program, stop the program and remove the PCR tubes from the thermocycler.
- 8) After completion of the program the thermocycler holds a temperature of 8°C. PCR products must be stored in a refrigerator (app. 4°C) and should be analysed subsequently (max. 24 h later).

### D) Detection of PCR products

For the detection of PCR products the Milenia<sup>®</sup> GenLine PCR-Universal Module MGUP 1 is required.

It is strongly recommended to use pipet tips with filter and separate pipets for the addition of the sample to be analyzed and the evaluation of PCR products to minimize the risk of DNA contamination. Regular decontamination of the pipets and a separation of the different working steps at different locations are recommended.

#### Procedure:

- 1) According to the number of tests, pipet 80 µL Chase buffer (MGCBA) each into clean wells of a 96 well microtiter plate.
- 2) Label each test strip (MGDS2A) needed for the analysis and take it aside.
- 3) Pipet 2 µL of each PCR product onto the sample application pad of a test strip.



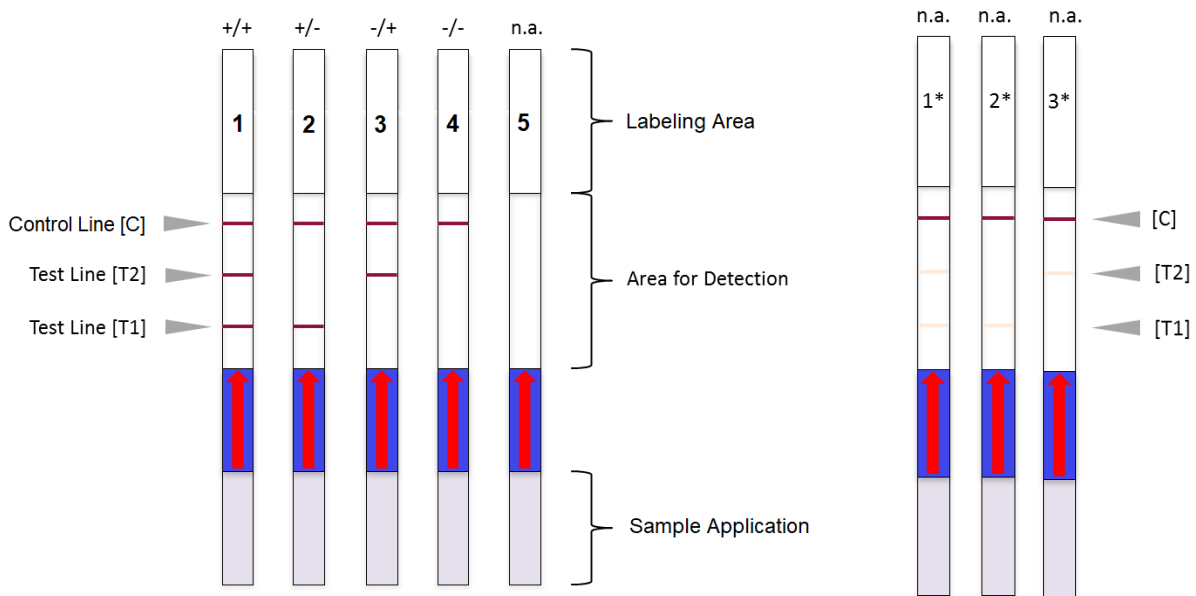
- 4) Place the test strip with the sample application pad down into the Chase buffer of the wells of the microtiter plate and incubate for 5 min at room temperature. Read the results visually after exactly **5 min**.
- 5) For the documentation of the results, strips can be fixed onto a data sheet (MGDBES). An additional documentation by taking an image of the strips with a camera is recommended.

Results must be read exactly after 5 minutes! After prolonged time unspecific, weak signals may occur on the test strip which are not associated with positive results.



## Interpretation of Results

Tests are interpreted visually. Potential test results are shown in the figure below.



The control line [C] confirms the proper function of the test strip. The test line 1 [T1] is associated with the proper function of the PCR. The test line 2 [T2] is linked with the presence or absence of the *Alicyclobacillus* gene.

### A) Positive Result (test strip 1, 2)

The prerequisite for a valid positive result is the appearance of a distinct test line [T1] (test strip **1 and 2**).

In case very high levels of the target gene are introduced into the test, this leads to a diminished amplification of the amplification control. As a consequence no line may be visible at test line [T2]. Such results should be read positive (test strip **2**).

In case of diminished signals (test strip **1\* and 2\***) it is recommended to rerun the samples after predilution.

### B) Negative Result (test strip 3)

A valid negative result requires a distinct visible T2 line. This confirms that the PCR has worked properly. The test line 1 [T1] is not visible (test strip **3**).

If the line of the PCR control [T2] is weakly visible, an inhibition of the PCR is very likely (test strip **3\***). In this case it is recommended to rerun the samples after predilution.

### C) No analysis possible (test strip 4, 5)

If neither the test line [T1] nor the PCR control [T2] is visible, no result can be reported (test strip **4**). In case only the line at the location of the control line [C] is visible, either the PCR product has not been transferred successfully to the test strip or the amplification control has not performed properly.

If **no line** is visible on the test strip (test strip **5**), please contact the customer service at Milenia Biotec GmbH.

## Trouble shooting

### The negative control gives a positive result

Possible cause: DNA-Contaminations

Contaminations are a high risk when working with nucleic acids. Therefore the following preventive actions are strongly recommended:

- Check that the chosen PCR protocol of the thermocycler was correct.
- Decontaminate the workspace where the preparation of the reaction mix is done.
- Decontaminate the pipets.
- Use unopened, sterile plastic materials (Pipet tips/ 1.5 mL reaction vials/PCR vials)

After decontamination, a test run should be performed in order to check the effectiveness of the preventive actions.

It is recommended to run a positive and a negative control. The negative control **must** show a negative result.

If the negative control shows a positive result, this may be due to a contamination of the reagents. In this case new reagents (PCR-Water, PCR-Polymerase Master Mix (2x) and PCR-Primer Mix (2x)) must be used. In the subsequent control run, the negative control (PCR-Water, MGH<sub>2</sub>O) must be negative.

If the negative result shows a positive result again, please contact the customer service at Milenia Biotec GmbH.

## Literature

A. Yokota, T. Fujii, K. Goto, Alicyclobacillus – Thermophilic Acidophilic Bacilli (2006)

Rau A. et al., Nachweis acidophiler Getränkeschädlinge, DLR, 388-292 (2016)

IFU: Method on the detection of taint producing Alicyclobacillus in fruit juices. IFU Handbook Microbiological Methods 3 (2004)

## Additional Products available

Product Name	Order No.	Content	Description
Milenia® <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> -Guaiacol-Ident Kit	MGAaG Z*	48 tests	Reagents for the detection of <i>A. acidoterrestris</i> and potentially guaiacol producing Alicyclobacillus spp.

For any questions and suggestions, please contact us:

**Telefon:** 0 641 – 94 88 83 – 0  
**Fax:** 0 641 – 94 88 83 – 80  
**E-mail:** [info@milenia-biotec.de](mailto:info@milenia-biotec.de)  
**Web:** [www.milenia-biotec.de](http://www.milenia-biotec.de)



## ***Alicyclobacillus* spp.-Screen**

Reagents for the detection of *Alicyclobacillus* species  
English: Page 3 - 11

Reagenzien zum Nachweis von *Alicyclobacillus* Arten  
Deutsch: Seite 13 - 23

**REF:**

**MGScACB \***



Lagerung der Reagenzien: -15 °C bis -20°C



**Milenia Biotec GmbH**

Versailler Straße 1

D-35394 Gießen, Germany

Tel.: +49-(0)641-94 88 83 - 0

Fax: +49-(0)641-94 88 83 - 80

E-Mail: [info@milenia-biotec.de](mailto:info@milenia-biotec.de)

Web: [www.milenia-biotec.de](http://www.milenia-biotec.de)



**\*Bitte beachten:**








Dieser Kit enthält nur die Reagenzien für die Amplifikation.  
Zum Nachweis des Amplifikates benötigen Sie zusätzlich:  
**Milenia® GenLine PCR-Universalmodul MGUP 1** (50 Bestimmungen)

MGScACB 1 / B / 2019-06-17

## Inhaltsverzeichnis

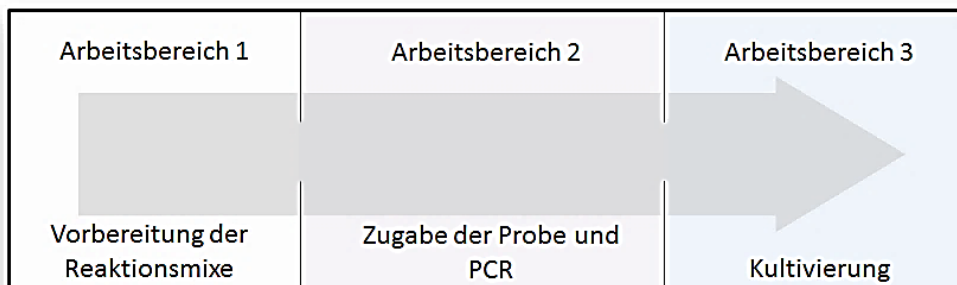
Erklärung der Symbole .....	13
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen .....	13
Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität .....	14
Erforderliches Material (nicht enthalten) .....	14
Verwendungszweck .....	14
Methodik und Testprinzip .....	15
Durchführung des Nachweises - ein kurzer Überblick.....	15
Vorbereitung der Proben und PCR-Reagenzien .....	16
Testdurchführung .....	18
Auswertung der Ergebnisse .....	19
Problemlösung .....	20
Literatur .....	20

## Erklärung der Symbole

Symbols Symbole	Explanation (GB) Erklärung (DE)	Symbols Symbole	Explanation (GB) Erklärung (DE)
	Use by Verwendbar bis		Sufficient for <n> tests Ausreichend für <n> Prüfungen
	Manufacturer Hersteller		Batch code Chargenbezeichnung
	Catalogue number Katalognummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten
	Consult attended documents Begleitdokumente beachten		

## Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Diese Gebrauchsanweisung vor der Testdurchführung aufmerksam lesen. Arbeitsschritte beachten.
- Die angegebenen Verfallsdaten aller Komponenten sind zu beachten.
- Vollständiges Auftauen der Komponenten vor der Benutzung ist erforderlich.
- Keine Kit-Komponenten verschiedener Chargen mischen.
- Die Reagenzien sind bei **-15 °C bis -20 °C** in den Originalverpackungen zu lagern.
- Die Komponenten **nach Gebrauch** möglichst **schnell wieder bei -15 °C bis -20 °C** lagern.
- Die Abfallentsorgung muss gemäß den örtlichen Bestimmungen durchgeführt werden
- Schutzkleidung wie Laborkittel und Einmalhandschuhe tragen.
- Eine räumliche Trennung zur Abarbeitung der verschiedenen Arbeitsschritte muss eingehalten werden, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Der Arbeitsplatz, an dem die Reaktionsmische hergestellt werden sollte möglichst weit von der Kultivierung entfernt liegen.
- Regelmäßige Dekontamination von Arbeitsplatz und Geräten muss durchgeführt werden!



## Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

REF: MGScACB 1						
Komponente	Art-Nr.	Anzahl	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit
PCR-Polymerase Master-Mix (2x)	MGPOL	2	330 µL	gebrauchsfertig	-15 °C bis -20 °C	Bis zum Verfallsdatum
PCR- Primermix (2x)	MGPACB	2	280 µL	gebrauchsfertig	-15 °C bis -20 °C	Bis zum Verfallsdatum
Positive Kit-Kontrolle	MGACBPC	1	50 µL	gebrauchsfertig	-15 °C bis -20 °C	Bis zum Verfallsdatum
PCR-Wasser*	MGH2O	1	1 mL	gebrauchsfertig	-15 °C bis -20 °C	Bis zum Verfallsdatum

\*Das PCR-Wasser (MGH2O) wird als Diluent und negativ Kontrolle verwendet.

Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich (siehe auch [www.milenia-biotec.de](http://www.milenia-biotec.de)).

## Erforderliches Material (nicht enthalten)

### Wichtig:

Zusätzlich zu den Reagenzien dieses Kits werden folgende Reagenzien und Hilfsmittel benötigt:

- Milenia® GenLine PCR-Universalmodul (MGUP 1), enthält Teststreifen und Laufpuffer
- Extraktionspuffer (MGEXBA)
- Thermocycler Labcycler 48s, Best. Nr.: MLCY, zu beziehen über Milenia Biotec GmbH
- Gefrierschrank: -20 °C
- Pipetten 2- 20 µl, 20- 200 µl, 100- 1000 µl
- Sterile (DNA-freie) Pipettenspitzen (mit Kontaminationsschutz für PCR)
- Sterile (DNA-freie) Reaktionsgefäße 1,5 ml
- Sterile (DNA-freie) PCR-Gefäße 0,2 ml z.B.: Reaktionsgefäße der Fa. Sorensen Bioscience Inc.
- 96-well Mikrotiterplatte
- (Tisch-) Zentrifuge für Reaktionsgefäße
- Vortexer
- Magnetrührer
- Ständer für Reaktionsgefäße z.B.: IsoFreeze PCR-Racks

## Verwendungszweck

Der Milenia® GenLine *Alicyclobacillus*-Screen (ACB-Screen) wurde zum qualitativen Nachweis von *Alicyclobacillus*-Arten entwickelt. Mit dem *Alicyclobacillus acidoterrestris*-Guaiacol-Screen (MGAaG Z, muss separat bestellt werden) können Sie zusätzlich *Alicyclobacillus acidoterrestris* und potentielle Guaiacolbildner nachweisen.

## Methodik und Testprinzip

Bei den Milenia® GenLine-Tests handelt es sich um Schnellnachweissysteme, die die Methodik der PCR (Polymerasekettenreaktion) und die Auswertung über ein Lateral-Flow-Format vereinen.

Im ersten Teil des Nachweises werden mit Hilfe definierter, speziell markierter Primer (kurze, einzelsträngige DNA-Stücke) DNA-Fragmente amplifiziert (vermehrt). Diese Markierungen werden in die entstehenden PCR-Produkte eingebaut. Amplifiziert werden können bakterienspezifische DNA, sofern diese vorhanden ist, und Kontroll-DNA. Das interne Kontroll-Fragment gibt Aufschluss über den Erfolg der Amplifikationsreaktion.

Die entstandenen PCR-Fragmente können im zweiten Teil des Nachweises durch einen Teststreifen sichtbar gemacht werden.

## Durchführung des Nachweises - ein kurzer Überblick

Die komplette Durchführung des Tests gliedert sich in 3 Teilabschnitte.

1. Die PCR-Reagenzien und das zu untersuchende Probenmaterial werden vorbereitet.
2. Nach Zugabe der zu analysierenden Probe wird die PCR gestartet.
3. Die in der Amplifikation entstandenen DNA-Fragmente über das Lateral Flow System analysiert.



## Vorbereitung der Proben und PCR-Reagenzien

Die Vorbereitung der Proben und Reagenzien umfasst die Herstellung eines PCR- Reaktionsmix, sowie erforderliche Vorbereitungen der zu analysierenden Probenmatrix.

### A) Probenvorbereitung und Probenzugabe

Ausgangspunkt sind Fruchtsaftkonzentrate, die 1:10 in BAT-B (Döhler GmbH, Darmstadt) verdünnt, Hitze-aktiviert (10 min bei 80°C) und über einen Zeitraum von max. 5 Tagen kultiviert wurden (nach IFU12), um potentiell vorhandene Alicyclobacillen anzureichern.

#### Durchführung:

- 1) In ein 1,5 mL Reaktionsgefäß werden 800 µl steriles H<sub>2</sub>O vorgelegt, 200 µl der angereicherten Fruchtsaftprobe dazugegeben, gut gemischt und für 3 min bei 16.000 xg zentrifugiert.
- 2) Der Überstand wird verworfen und dem Pellet 200 µl Extraktionspuffer (**MGEXBA**), der zuvor gut homogenisiert wurde (Rührfisch enthalten, Magnetrührer verwenden!), zugeführt. Das Pellet wird anschließend vollständig resuspendiert (mind. 15 s vortexen).
- 3) Die Suspension wird für 10 min bei 95°C inkubiert und im Anschluss wieder kräftig durchmischt (15 s vortexen).
- 4) Danach erfolgt eine Zentrifugation für 1 min bei 16.000 xg.
- 5) 2 µl des Überstandes werden abgenommen und in der PCR eingesetzt. Darauf achten, dass **keine Pellet-Bestandteile** mitgeführt werden!

Der **reine** Überstand (ohne Pellet-Bestandteile!) kann für eine spätere Analyse, z.B. mit dem Alicyclobacillus acidoterrestris - Guaiacol-Screen (MGAAg Z, muss separat bestellt werden), in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

### Analyse von Einzelkolonien aus einem Festmedium (z.B.: BAT-A, Döhler GmbH):

#### Durchführung:

- 1) Die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig berühren (nicht wischen).
- 2) Anschließend wird das Zellmaterial in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert.
- 3) Aus dieser Zellsuspension werden dann 2 µl in die Amplifikationsreaktion gegeben.

Zu viel Zellmaterial kann die Reaktion negativ beeinflussen. Vorsichtiges Berühren der Kolonie in Schritt 1) ist ausreichend.



## B) Vorbereitung der Reaktionsmixe:

Jeder einzelne Reaktionsmix besitzt ein Gesamtvolumen von 23 µL. Hierbei wird der PCR-Polymerase Master Mix (2x) mit dem PCR-Primermix (2x) in einem bestimmten Verhältnis gemischt und anschließend auf sterile PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Das Verhältnis der Mischung ist der Tabelle zu entnehmen. Falls eine positive (MGACBPC) und eine negative (MGH2O) Kontrolle mitgeführt werden, müssen zwei Reaktionen zusätzlich berechnet werden.

Das exakte und kontaminationsfreie Vorbereiten dieser Mixe ist entscheidend für die Funktionalität der Nachweise. Das sofortige Beschriften der Reaktionsgefäße wird empfohlen. Der fertig aliquotierte Reaktionsmix sollte unmittelbar verwendet und während der Probenzugabe kühl (z.B. auf Eis) gelagert werden.

Anzahl der Reaktionen	PCR-Polymerase Master Mix (2x) (zu pipettierendes Volumen)	PCR-Primermix (2x) (zu pipettierendes Volumen)
1	13 µl	11 µl
5	65 µl	55 µl
10	130 µl	110 µl
20	260 µl	220 µl

### Durchführung:

- 1) Entsprechend der geplanten Tests (sowie einer positiven und einer negativen Kontrolle) wird PCR-Polymerase Master Mix (2x) in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt (Volumenangabe der Tabelle entnehmen).
- 2) Ein entsprechendes Volumen an PCR-Primermix (2x) wird dem Mix zugegeben (siehe Tabelle).
- 3) Der Mix aus beiden Lösungen wird gut gemischt (Pipette, Vortex).
- 4) Je nach Anzahl geplanter Reaktionen werden sterile 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäße vorbereitet.
- 5) In jedes PCR-Gefäß werden aus dem hergestellten Mix 23 µL Reaktionsmix pipettiert.
- 6) Die PCR-Reaktionsgefäße werden rasch verschlossen. An einem separierten Arbeitsplatz erfolgt die Zugabe der Probe.

## Testdurchführung

Die Testdurchführung beschreibt das Starten und Beenden der Amplifikationsreaktion, sowie den anschließenden Lateral Flow-basierten Nachweis der PCR-Produkte über den universellen Teststreifen (Milenia® GenLine Universalmodul MGUP1).

### C) Amplifikationsreaktion

#### Durchführung:

- 1) Nach Zugabe der zu analysierenden Probe, die beschrifteten PCR-Gefäße mit den Reaktionsansätzen fest verschließen und gut mischen.
- 2) Die PCR-Gefäße in die Tischzentrifuge stellen und kurz anzentrifugieren.
- 3) Die Flüssigkeit sollte luftblasenfrei am Boden der Gefäße zu finden sein.
- 4) Die Reaktionsansätze in den Thermocycler stellen.
- 5) Den Deckel des Thermocyclers verschließen.
- 6) Das spezifische ACB/AaG Programm starten.
- 7) Nach Ablauf des Temperaturprotokolls muss das Programm gestoppt werden und die Reaktionsgefäße aus dem Thermocycler entnommen werden.
- 8) Nach Ablauf der Zyklen pausiert der Thermocycler bei 8°C. Die PCR-Produkte sind im Kühlschrank (ca. 4°C) zu lagern und schnellstmöglich (max. 24 h nach PCR) zu analysieren.

### D) Nachweis der PCR-Produkte

Zum Nachweis des Amplifikates wird das Milenia® GenLine PCR-Universalmodul MGUP 1 benötigt.

Es wird die Verwendung von Pipettenspitzen mit Filter bzw. eine separate Pipette für die Zugabe der zu analysierenden Probe und die Auswertung der PCR-Produkte empfohlen, um das DNA-Kontaminationsrisiko zu minimieren. Außerdem sind eine regelmäßige Dekontamination der Pipetten und eine räumliche Trennung von Probenzugabe und Auswertung der PCR ratsam.

#### Durchführung:

- 1) Legen Sie entsprechend der Anzahl an durchzuführenden Analysen, je 80 µl Laufpuffer (MGCBBA) in ein sauberes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte vor.
- 2) Beschriften Sie für jede Analyse einen Teststreifen (MGDS2A) und legen Sie ihn bereit.
- 3) Pipettieren Sie 2 µl des Amplifikats aus dem jeweiligen 0,2 mL PCR-Gefäß auf die Auftragsfläche eines Teststreifens, das Berühren der Auftragsfläche ist möglich.

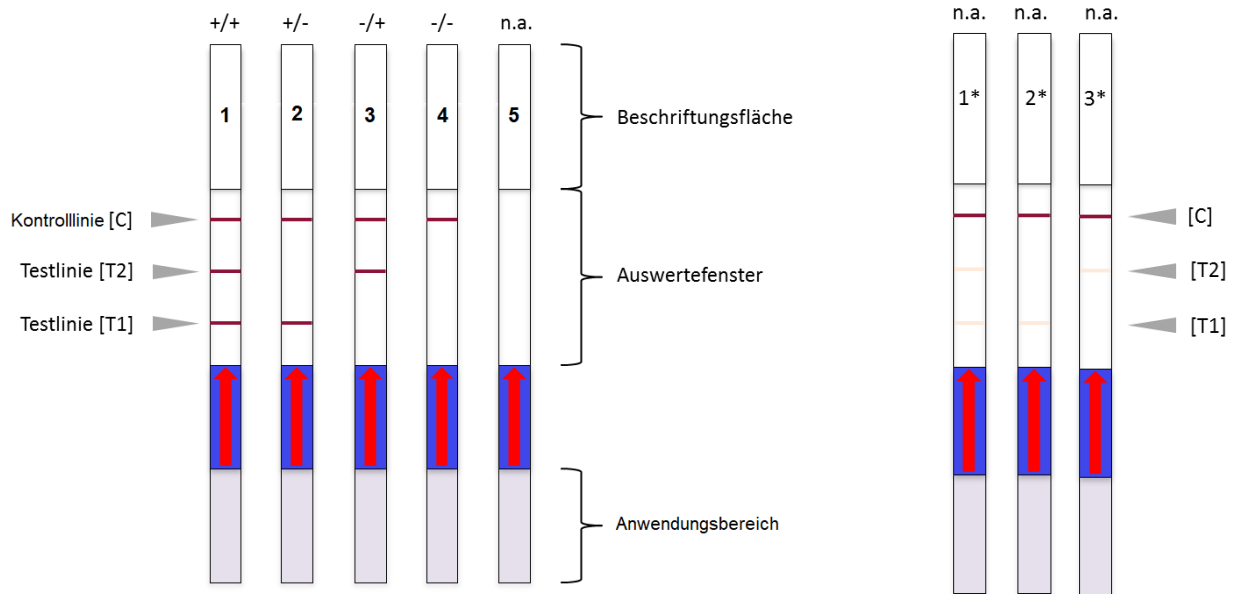


- 4) Stellen Sie den Streifen senkrecht in den vorgelegten Laufpuffer. Inkubation: 5 min bei Raumtemperatur. Lesen Sie das Ergebnis nach genau **5 min** Laufzeit visuell ab.
- 5) Zur Dokumentation können Sie das Auswerte-Datenblatt (MGDBES) verwenden. Eine zusätzliche Fotodokumentation wird empfohlen.

Unspezifische Signale in Form von schwachen Signalen, können nach mehr als 5 Minuten Inkubationszeit auftreten.

## Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Teststreifen erfolgt visuell. Alle möglichen Ergebnis-Varianten sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



Die Funktionskontrolle [C-Linie] bestätigt die Funktionalität des Teststreifens. Die Amplifikationskontrolle [T2-Linie] gibt Aufschluss über die Funktionalität der PCR. Die Testlinie [T1-Linie] zeigt an, ob eine *Alicyclobacillus*-Kontamination vorliegt.

### A) Positiver Befund (Teststreifen 1 und 2)

Voraussetzung für einen validen positiven Befund ist das Erscheinen einer deutlich erkennbaren Testlinie [T1] (Teststreifen **1 und 2**). Wird zu viel Zellmaterial eingesetzt, kann die PCR-Kontrolle [T2] ausbleiben. Erscheint dennoch eine deutlich erkennbare Testlinie [T1], ist der Test sehr wahrscheinlich positiv (Teststreifen **2**).

Bei sehr schwachen Signalen (Teststreifen 1\* und 2\*) sollte ein Wiederholungslauf mit verdünntem Probenmaterial durchgeführt werden.

### B) Negativer Befund (Teststreifen 3)

Ein valider negativer Befund erfordert eine deutlich erkennbare PCR-Kontrolle [T2]. Die Testlinie [T1] ist nicht erkennbar (Teststreifen **3**). Bei einer sehr schwach positiven PCR-Kontrolle [T2] ist eine Inhibition der PCR sehr wahrscheinlich (Teststreifen **3\***). In diesem Fall sollte ein Wiederholungslauf mit verdünntem Probenmaterial durchgeführt werden.

### C) Nicht auswertbar (Teststreifen 4 und 5)

Sind weder Testlinie [T1] noch PCR-Kontrolle [T2] erkennbar, ist der Nachweis nicht auswertbar (Teststreifen **4**). Erscheint nur die Kontrolllinie [C], wurde die PCR-Probe nicht korrekt aufgetragen oder die Amplifikationsreaktion hat nicht funktioniert.

Blieben alle Linien auf dem Teststreifen aus (Teststreifen **5**), kontaktieren Sie bitte den Kundenservice der Milenia Biotec GmbH.

## Problemlösung

### Die negative Kontrolle liefert einen positiven Befund

Mögliche Ursache: DNA-Kontaminationen

Kontaminationen sind eine große Gefahr bei der Arbeit mit Nukleinsäuren. Folgende Schutzmaßnahmen werden empfohlen:

- Überprüfen des verwendeten PCR-Protokolls im Thermocycler auf Richtigkeit
- Dekontaminieren des Arbeitsbereiches, an dem der Reaktionsmix hergestellt wird
- Gründliches Dekontaminieren der Pipetten
- Verwendung von ungeöffneten, sterilen Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, 1,5 mL Reaktionsgefäße, PCR-Gefäße)

Um die Effektivität der eingeleiteten Maßnahmen zu überprüfen, sollte nach der Dekontamination ein Kontroll-Lauf durchgeführt werden.

Hierfür empfiehlt es sich, eine Positiv- und eine Negativkontrolle zu verwenden. Die Negativkontrolle **muss** negativ sein.

Liefert die Negativkontrolle ein positives Signal, sind die Reagenzien möglicherweise kontaminiert. Es müssen neue Nachweis-Reagenzien (PCR-Wasser, PCR-Polymerase Master Mix (2x) und PCR-Primer Mix (2x) verwendet werden). Im anschließenden Kontroll-Lauf muss die negative Kontrolle (PCR – Wasser, MGH<sub>2</sub>O) negativ sein.

Ist die negative Kontrolle erneut positiv, kontaktieren Sie den Kundenservice der Milenia Biotec GmbH.

## Literatur

A. Yokota, T. Fujii, K. Goto, Alicyclobacillus – Thermophilic Acidophilic Bacilli (2006)

Rau A. et al., Nachweis acidophiler Getränkeschädlinge, DLR, 388-292 (2016)

IFU: Method on the detection of taint producing Alicyclobacillus in fruit juices. IFU Handbook Microbiological Methods 3 (2004)

## Zusätzlich verfügbare Produkte

Produktname	Bestellnr.	Inhalt	Beschreibung
Milenia® Alicyclobacillus acidoterrestris-Guaiacol-Ident Kit	MGAaG Z*	48 Tests	Reagenzien zum Nachweis von A. acidoterrestris und potentiell Guaiacol-produzierenden Organismen

Für Fragen und Anregungen erreichen Sie uns unter:

**Telefon:** 0 641 – 94 88 83 – 0  
**Fax:** 0 641 – 94 88 83 – 80  
**E-mail:** [info@milenia-biotec.de](mailto:info@milenia-biotec.de)  
**Web:** [www.milenia-biotec.de](http://www.milenia-biotec.de)

<b>Date/ Datum</b>	<b>Revision</b>	<b>Cause of Revision/ Änderungsgrund</b>
17.06.2019	MGSACB1/B/2019-06-17	Adjustment of the MGUP 1 quantity Anpassung der Menge MGUP 1