

**Beschreibung**

Mit diesem Test wird Katzen-DNA (*Felis catus*) und Hunde-DNA (*Canis lupus familiaris*) getrennt nachgewiesen. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für tierische DNA (IAAC) ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens drei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm und 670 nm detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 sowie am Agilent Mx3005P.

**Nachweisgrenze**

Die SureFood® ANIMAL ID Cat & Dog IAAC real-time PCR ist so ausgelegt, dass Katzen- sowie Hunde-DNA in einem DNA-Gemisch ab einem relativen Anteil von 0,5 % nachweisbar ist. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

**DNA-Präparation**

Für die DNA-Präparation von Rohmaterialien wird das SureFood® PREP Basic Kit und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced Kit empfohlen.

**Kit-Inhalt und Lagerung**

2x	Reaktion Mix (1100 µl)	<b>(Code 1)</b>
1x	Taq Polymerase (11 µl)	<b>(Code 2)</b>
1x	Positive Control (200 µl)	<b>(Code 3)</b>

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°C zu lagern.

**Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien**

- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (FAM, VIC/HEX und Cy5 Kanal)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

**Protokoll****1. Herstellen des Master-Mix**

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle und eine Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält eine interne Kontrolle für den Nachweis von allgemeiner tierischer DNA und eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion. Beide Kontrollreaktionen werden im gleichen Kanal gemessen.

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

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,0 µl</b>	<b>220,0 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

	<b>Blockcycler</b>	<b>Rotor-Gene Q</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 35	1 min, 95°C 35
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	
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase  <u>Nachweissystem Katze:</u> Diverse Geräte FAM-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LC480 I 483 nm, 533 nm LC480 II 465 nm, 510 nm  <u>allgemeiner Nachweis tierischer DNA und interne Amplifikationskontrolle:</u> Diverse Geräte VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LC480 I 523 nm, 568 nm LC480 II 533 nm, 580 nm  <u>Nachweissystem Hund:</u> Diverse Geräte Cy5-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Red LC480 I 615 nm, 670 nm LC480 II 618 nm, 660 nm	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

3. Herstellen des PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten).
- 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 Reaktionsgefäße. Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

### Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analysen-Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Katze detektiert. Im Cy5-Kanal wird der Parameter Hund detektiert. Im VIC-Kanal wird ein möglicher tierischer DNA-Anteil in der Probe nachgewiesen. Ist keine tierische DNA in der Probe vorhanden, wird eine interne Amplifikationskontrolle detektiert.

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

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter Hund bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Cy5-Kanal zeigt. Eine Probe wird **negativ** für den Parameter Hund bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Cy5-Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC-Kanal) **positiv** ist.

Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im VIC-Kanal deutlich vor dem Signal der internen Amplifikationskontrolle (erkennbar in der Negativkontrolle ohne DNA-Zugabe) wird das generelle Vorhandensein von tierischer DNA in der Probe nachgewiesen.

Zeigt das interne Signal (VIC) einen CP-Wert im Bereich der Negativkontrolle (ohne DNA Zugabe), dann wird die PCR zwar nicht inhibiert, jedoch liegt entweder gar keine oder sehr wenig tierische DNA vor.

Sollte die Probe im FAM- und Cy5-Nachweissystem **negativ** sein und auch das Signal in der internen VIC-Kontrolle **negativ** sein, sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

**Hinweis:** Bei Anwesenheit von DNA aus mehr als einer Tierart kann das Mischungsverhältnis der DNAs einen kompetitiven Einfluss auf die Intensität der absoluten Fluoreszenz haben. Je geringer der relative Gehalt der zu bestimmenden DNA in einem Gemisch tierischer DNAs ist, desto geringer ist das Fluoreszenzniveau der Amplifikationskurve.

### Weitere Informationen

- Validierungsdaten

### Technischer Support

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

### Vertrieb und Bestellung

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstrasse 17,  
64297 Darmstadt, Germany  
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20  
E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



**Description**

The test detects cat (*Felis catus*) DNA and dog (*Canis lupus familiaris*) DNA separately. Each reaction contains an internal amplification control and an internal detection assay for animal DNA (IAAC). The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of three fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm and 670 nm at the same time. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments. The technical validation of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 and Agilent Mx3005P.

**Limit of Detection**

The SureFood® ANIMAL ID Cat & Dog IAAC real-time PCR is developed for the detection of cat and dog DNA in a DNA mixture at a relative amount of 0.5 %. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

**DNA-preparation**

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced is recommended.

**Kit components and storage**

2x	Reaktion Mix (1100 µl)	<b>(Code 1)</b>
1x	Taq Polymerase (11 µl)	<b>(Code 2)</b>
1x	Positive Control (200 µl)	<b>(Code 3)</b>

Store all reagents at –20°C and protected from light.

**Additionally required equipment and materials**

- Real-time PCR instrument, equipped with three detection channels (FAM, VIC/HEX and Cy5 channel)
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- Pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

**Protocol****1. Preparation of the master-mix**

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control and extraction control. The master-mix includes an internal control for universal animal DNA and an internal amplification control (inhibition control) for each reaction.

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 by vortexing and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

<b>Components for master-mix</b>	<b>Amount per reaction</b>	<b>10 reactions (with 10% excess)</b>
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>20.0 µl</b>	<b>220.0 µl</b>

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

2. Setup

	<b>Blockcycler</b>	<b>Rotor-Gene Q</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 35 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 35 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase  <u>Detection system cat:</u> Diverse devices FAM channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LC480 I 483 nm, 533 nm LC480 II 465 nm, 510 nm  <u>universal animal detection and internal amplification control:</u> Diverse devices VIC/HEX channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LC480 I 523 nm, 568 nm LC480 II 533 nm, 580 nm  <u>Detection system dog:</u> Diverse devices Cy5 channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Red LC480 I 615 nm, 670 nm LC480 II 618 nm, 660 nm	
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: <a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>		

3. Preparation of the PCR-mix

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

**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 need to give the correct results.

Cat DNA is detected in the FAM-channel and dog DNA is detected in the Cy5-channel. In the VIC-channel it is possible to detect animal DNA in the sample as well as the amplification control in a sample with no animal DNA inside.

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

A sample is stated **positive** for dog, if the sample DNA shows amplification in the Cy5-channel. A sample is stated **negative** for dog, if the sample DNA shows no amplification in the Cy5-channel and if the internal control (VIC-channel) of the sample is positive.

If the internal control (VIC-channel) of the sample DNA is detected significant before the signal of the negative control (master-mix without DNA) the sample contains animal DNA. Is the cp-value of the internal control (VIC-channel) in the range of the negative control the sample contains no PCR-inhibiting substances but only a low amount or no animal DNA.

If the sample DNA and the internal signal are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample needs to be improved.

**Note:** If the sample contains more than one animal species the DNA mixture can have a competitive influence on the absolute fluorescence. The lower the concentration of the determinant DNA is in a mixture of animal DNAs the lower is the fluorescence level of the amplification curve.

**Product Information**

- Validation Report

**Technical Support**

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

**Distribution and ordering**

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstrasse 17,  
64297 Darmstadt, Germany  
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20  
E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

