

CONGEN

SureFast® Listeria 3plex ONE

Art. No. F5217
100 rxn

User Manual



June 2024

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.4	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.5	Vorsichtsmaßnahmen	4
1.6	Geräteeinstellungen	5
1.7	Detektionskanaleinstellungen	5
2	Qualitative Analyse	6
2.1	Protokoll	6
2.1.1	Kulturelle Anreicherung	6
2.1.2	DNA-Präparation	6
2.1.3	Herstellen des Master-Mix	7
2.1.4	Herstellen des real-time PCR-Mix	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse	8
3	Grenzen der Methode	9
4	Weitere Informationen	9
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	9
4.2	Technischer Support	9



Content

1	General Information.....	10
1.1	Description.....	10
1.2	Limit of Detection.....	10
1.3	Kit components and storage.....	11
1.4	Additionally required equipment and materials.....	11
1.5	Precautions for users.....	11
1.6	Setup.....	12
1.7	Detection channel Set-up.....	12
2	Qualitative Analysis.....	13
2.1	Protocol.....	13
2.1.1	Cultural Enrichment.....	13
2.1.2	DNA-preparation.....	13
2.1.3	Preparation of the master-mix.....	14
2.1.4	Preparation of the real-time PCR-mix.....	14
2.2	Interpretation of results.....	15
3	Limitations of the method.....	16
4	Further Information.....	16
4.1	Product Information.....	16
4.2	Technical Support.....	16

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Das SureFast® Listeria 3plex ONE dient der einfachen und zeitsparenden Extraktion und Differenzierung von *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Lebensmitteln.

Die Methode setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen: 1) kulturelle Anreicherung, 2) DNA-Präparation, 3) real-time PCR und 4) Interpretation der Ergebnisse.

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). Des Weiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen **VIC/HEX**, **ROX** und **Cy5** detektieren können, verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Bio-Rad CFX96 Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Agilent AriaDx.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Listeria 3plex ONE 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.

Hinweis:

1.3 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
L	Lysis Buffer	2 x 25 ml	Klar

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.

Der Lysis Buffer soll bei -28 bis +8 °C gelagert werden. Die Reagenzien können bis zum Erreichen des auf den Etiketten aufgedruckten Haltbarkeitsdatums verwendet 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.

1.4 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- 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
- 2 ml Reaktionsgefäße
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße
- Thermomixer/Heizblock (bis 95 °C)
- Anreicherungsmedium (empfohlen: Half Fraser)

1.5 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.
- Lebensmittelproben und Anreicherungskulturen 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.

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LightCycler® 480 II
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

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent AriaDx /Mx	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>Listeria</i> spp.	ROX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>Listeria</i> spp.	ROX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	IAC	yellow	+	Ignore cycles before , 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.
	<i>Listeria</i> spp.	orange	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	red	+	
Applied Biosystems 7500 Fast Dx	IAC	VIC/HEX	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	<i>Listeria</i> spp.	ROX	None	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cy5	None	
Roche LightCycler® 480 II	IAC	533-580	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt. In ROX Kanal mit Fit Point auswerten.
	<i>Listeria</i> spp.	533-610	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	618-660	+	

2 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Kulturelle Anreicherung

Für die Probenvorbereitung von Lebens- und Futtermitteln gelten die Vorgaben von ISO 6887.

Zur Vorbereitung der Anreicherung werden 25 g bzw. 25 ml Probenmenge in 225 ml einer Anreicherungsflüssigkeit (Half Fraser) eingewogen und homogenisiert. Weicht die Probenmenge von 25 g ab, sollte das Volumen des Mediums in einem 1:10-Verhältnis gewählt werden. Anschließend erfolgt die Anreicherung bei einer Temperatur von 37 °C für 26 - 28 h. Bei der Verwendung von SureFast® PREP Bacteria (F1021) erfolgt die Anreicherung bei einer Temperatur von 37 °C für 18 - 20 h.

Um das Wachstumspotenzial des Bakteriums besser beurteilen zu können, wird empfohlen, die Proben zu Beginn und am Ende der kulturellen Anreicherung zu analysieren (Wachstum ab einer Cp-Wert Differenz von > 3).

2.1.2 DNA-Präparation

Wenn die Anreicherungskultur geschüttelt oder durchmischt wurde, soll diese für 5 bis 10 min sedimentieren.

Zuerst 500 µl Lysis Buffer (**Code L**) in ein 2,0 ml Tube vorlegen (nicht im Kit enthalten).

Dann aus dem oberen Drittel der Anreicherungskultur 200 µl entnehmen und zu den 500 µl Lysis Buffer hinzufügen.

Im Anschluss das Tube vortexen und in den Heizblock stellen.

Die Inkubation erfolgt bei 95 °C für 10 min ohne Schütteln.

Das Tube aus dem Heizblock entnehmen und 1 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

Achtung: Bei der weiteren Verwendung des Lysates muss beachtet werden, dass das Sediment nicht aufgewirbelt wird und keine Partikel in den PCR Ansatz pipettiert werden. Falls die Partikel nicht sedimentieren, sollte das Lysat für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert werden. Im Anschluss 100 µl des Überstandes in ein neues Tube (nicht im Kit enthalten) überführen.

Das Lysat kann direkt in der PCR eingesetzt werden. Wird das Lysat nicht innerhalb von 4 Stunden in der PCR eingesetzt oder ist eine längere Lagerung vorgesehen, werden 100 µL des Überstandes in ein neues Tube (nicht im Kit enthalten) überführt und bei -20 °C gelagert.

2.1.3 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.

Bei Analysen von Anreicherungen werden zusätzlich weitere Kontrollen empfohlen: Nullkontrolle (Probe vor der Anreicherung) und Mediumkontrolle.

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

Benötigte Reaktionen für den qualitativen *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes* -Nachweis in Anreicherungen:

5 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control, 1x Nullkontrolle, 1x Mediumkontrolle)

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:

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.

2.1.4 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 ROX-Kanal wird der Parameter *Listeria* spp. und im Cy5-Kanal wird der Parameter *Listeria monocytogenes* detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

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

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

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** ist.

Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal keine Amplifikation oder 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 *Listeria* spp. oder *Listeria monocytogenes* mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal			Interpretation
ROX-Kanal <i>Listeria</i> spp.	Cy5-Kanal <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	VIC/HEX-Kanal IAC	
positiv	negativ	positiv/negativ	<i>Listeria</i> spp. -DNA nachweisbar
positiv	positiv	positiv/negativ	<i>Listeria monocytogenes</i> -DNA nachweisbar
negativ	positiv	positiv	<i>Listeria monocytogenes</i> -DNA nicht eindeutig nachweisbar *
negativ	positiv	negativ	nicht auswertbar
negativ	negativ	positiv	Negativ, <i>Listeria</i> -DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

* *Listeria monocytogenes* -DNA ist nicht eindeutig nachweisbar und das Ergebnis sollte wiederholt werden, wenn kein charakteristischer Kurvenverlauf vorliegt. Das kann bei Konzentrationen der Zielsequenz an der Nachweisgrenze auftreten.

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.
- Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Es deutet darauf hin, dass die Ziel DNA (*Listeria*- 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/unternehmen/download)
- Validierungsreport auf Anfrage

4.2 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® Listeria 3plex ONE can be applied for the fast and simple isolation and detection of isolation and differentiation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in different types of food.

The method consists of the following three steps: 1) cultural enrichment, 2) DNA-preparation, 3) specific real-time PCR detection and 4) interpretation of results.

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). In addition spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of fluorescence emissions at the channels **VIC/HEX**, **ROX** and **Cy5** at the same time. The internal technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Bio-Rad CFX96 Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Agilent AriaDx.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Listeria 3plex ONE 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 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
L	Lysis Buffer	2 x 25 ml	Clear

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.

The Lysis Buffer should be stored at -28 to +8 °C. Reagents should be used until the expiry date indicated on the label.

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.

1.4 Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument with **four** detection channels (510 nm, **580 nm**, **610 nm** and **660 nm**)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- 2 ml tubes
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- centrifuge with a rotor for the reaction tubes
- Thermomixer/heating block (up to 95 °C)
- enrichment broth (e. g. Half Fraser)

1.5 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.
- Food samples and enrichment cultures must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

1.6 Setup

	Blockcyler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcyler & LightCycler® 480 II
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

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent AriaDx /Mx	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>Listeria</i> spp.	ROX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>Listeria</i> spp.	ROX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	IAC	yellow	+	Ignore cycles before , 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.
	<i>Listeria</i> spp.	orange	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	red	+	
Applied Biosystems 7500 Fast Dx	IAC	VIC/HEX	None	Check the passive reference option ROX is none.
	<i>Listeria</i> spp.	ROX	None	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cy5	None	
Roche LightCycler® 480 II	IAC	533-580	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required. Evaluate the ROX channel with Fit Point.
	<i>Listeria</i> spp.	533-610	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	618-660	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Cultural Enrichment

Sample preparation of food and feed matrices should apply to ISO 6887.

For enrichment, a volume of 25 g or 25 ml sample material is homogenized with 225 ml of enrichment broth (Half Fraser). If test portions deviate from 25 g, the enrichment broth volume should be chosen in a 1:10 ratio. Enrichment is performed at 37 °C for 26 - 28 h. If SureFast® PREP Bacteria (F1021) is used for DNA-extraction enrichment has to be performed at 37 °C for 18 - 20 h.

To assess the process of bacterial growth, it is recommended to compare samples at the beginning and at the end of the culturing (bacterial growth at Cp difference > 3).

2.1.2 DNA-preparation

If the enrichment culture has been shaken or stirred, let the solids settle out for 5 to 10 min.

Pipette 500 µl Lysis Buffer (**Code L**) in a 2.0 ml Tube (not provided with the kit).

Afterwards transfer 200 µl of the upper third from the enrichment culture and add it to the 500 µl Lysis Buffer.

Vortex the tube briefly and put the tube in the heating block.

Incubate for 10 minutes at 95 °C without shaking.

Remove the tube from the heating block and leave the tube at room temperature for 1 minute.

Note: It is necessary to ensure that the sediment is not stirred up and no particles are pipetted in the PCR reaction. If the particles do not sediment, the lysate should be centrifuged for 1 minute at 12,000 rpm. Afterwards transfer 100 µl of the supernatant into a new tube (not provided with the kit).

The lysate is ready-to-use for PCR. If the lysate is not used within four hours in the PCR or is intended for a longer storage, transfer 100 µl of the lysate in a new tube (not provided with the kit) and store at -20 °C.

2.1.3 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, Positive Control. For the analysis of enrichments additional controls are recommended: zero control (sample before enrichment) and medium control.

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

Reactions needed for the qualitative *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in enrichments:

5 reactions for controls (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control, 1x zero control, 1x medium 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
Total volume	20 µl	220 µl

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

2.1.4 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 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.

Listeria spp. DNA is detected in the ROX-channel and *Listeria monocytogenes* DNA is detected in the Cy5-channel. In the VIC/HEX-channel the internal amplification control (IAC) is detected.

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control.

A Cp value for the internal amplification control is not needed to obtain a positive result of the positive control.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective 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 *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* PCR assay.

Result in the respective channel			Interpretation
ROX channel <i>Listeria</i> spp.	Cy5 channel <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	VIC/HEX channel IAC	
positive	negative	positive/negative	<i>Listeria</i> spp.- DNA detected
positive	positive	positive/negative	<i>Listeria monocytogenes</i> -DNA detected
negative	positive	positive	questionable* for <i>Listeria monocytogenes</i> -DNA
negative	positive	negative	invalid
negative	negative	positive	negative, <i>Listeria</i> - DNA is not detected
negative	negative	negative	invalid

* Result for *Listeria monocytogenes* is questionable and analysis for this sample shall be repeated if an irregular amplification curve is shown. This can appear with low levels of target at the limit of detection.

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.
- Inconsistent mixing ratios may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organism. It is indicative for the presence of the target DNA (*Listeria*-DNA).

4 Further Information

4.1 Product Information

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

4.2 Technical Support

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