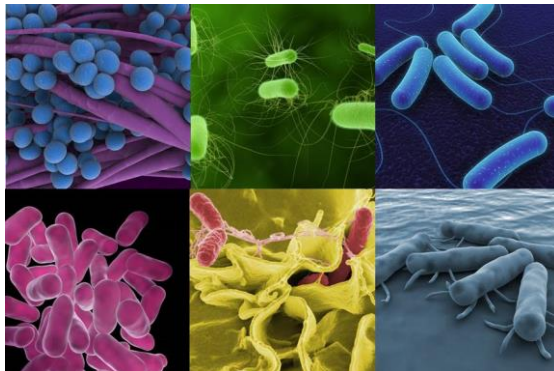


CONGEN

SureFast[®] Foodborne Pathogens 4plex

Art. No. F5175
100 rxn

User Manual



Juli 2022

 **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	6
2.2	Interpretation der Ergebnisse	7
3	Weitere Informationen	8
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	8
3.2	Technischer Support	8

 **Content**

1	General Information	9
1.1	Description	9
1.2	Limit of Detection	9
1.3	DNA-preparation	10
1.4	Kit components and storage	10
1.5	Additionally required equipment and materials	10
1.6	Setup	10
1.7	Detection channel Set-up	11
2	Qualitative Analysis	12
2.1	Protocol	12
2.1.1	Preparation of the master-mix	12
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	12
2.2	Interpretation of results	13
3	Further Information	14
3.1	Product Information	14
3.2	Technical Support	14

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® Foodborne Pathogens 4plex ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung spezifischer DNA-Sequenzen der *Escherichia coli* Virulenzfaktoren (*stx1* [Subtyp a-d] und *stx2* [Subtyp a-g]), *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp.

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 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, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Agilent AriaDx und Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Foodborne Pathogens 4plex 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: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein Cp-Wert < 20 detektiert wird.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021) empfohlen. Um das Wachstumspotenzial des Bakteriums besser beurteilen zu können, wird angeraten, die Proben zu Beginn und am Ende der kulturellen Voranreicherung zu analysieren (Wachstum ab einer Cp-Wert Differenz von > 3). Zur kulturellen Voranreicherung wird für *Escherichia coli* die Methode nach ISO 13136, für *Listeria monocytogenes* die Methode nach ISO 11290-1 und für *Salmonella* spp. die Methode nach ISO 10135 empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

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 Bacteria Art. Nr. F1021)
- 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 & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LightCycler® 480 II
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 Mx3005P	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ROX	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	Cy5	+	
Agilent AriaDx	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ROX	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ROX	None	
	<i>Salmonella</i> spp.	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ROX	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>E. coli stx1/stx2/stx2f</i>	green	+	
	IAC	yellow	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	orange	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	533-580	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	533-610	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	540-580	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	540-610	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	610-670	+	

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 Positivkontrolle. 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 *E. coli stx1|2/2f*, *Listeria monocytogenes*- und *Salmonella spp.*-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den qualitativen *E. coli stx1|2/2f*, *Listeria monocytogenes*- oder *Salmonella spp.*-Nachweis in Anreicherungen:

Je Anreicherung 5 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle, 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.

2.1.2 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 FAM-Kanal wird der Parameter *Escherichia coli stx1|2| 2f*, im ROX-Kanal der Parameter *Listeria monocytogenes* und im Cy5-Kanal der Parameter *Salmonella* spp. detektiert (Siehe Tabelle). 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 Amplifikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der interne Amplifikationskontrolle (IAC) führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle 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** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist. Sollte die Proben-DNA **keine Amplifikation** im VIC/HEX Kanal 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 *E. coli stx1|2|2f*, *Listeria monocytogenes* oder *Salmonella* spp. mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal <i>E.coli</i> <i>stx1 stx2 stx2f</i>	ROX-Kanal <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Cy5-Kanal <i>Salmonella</i> spp.	VIC/HEX-Kanal IAC	
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>E. coli</i> <i>stx1 2 2f</i> DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>Listeria monocytogenes</i> -DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>Salmonella</i> spp.-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	negativ, <i>E. coli stx1 2 2f</i> , <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> und <i>Salmonella</i> spp. sind nicht 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)
- Validierungsdaten 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® Foodborne Pathogens 4plex is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific DNA sequences of *Escherichia coli* virulence factors (*stx1* [subtype a-d] and *stx2* [subtype a-g]), *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp..

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 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, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Foodborne Pathogens 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.

Note: Inconsistent mixing ratios may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations (Cp value < 20).

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021) is recommended. To assess the process of bacterial growth, it is suggested to compare the samples at the beginning and at the end of the culturing (bacterial growth at Cp difference > 3). For cultivation of *Escherichia coli* the method of the ISO 13136, for *Listeria monocytogenes* the method of the ISO 11290-1 and for *Salmonella* spp. the method of the ISO 10135 is recommended.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light 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 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP Bacteria Art. No. F1021)
- 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
- microcentrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Setup

	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 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ROX	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	Cy5	+	
Agilent AriaDx	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ROX	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ROX	None	
	<i>Salmonella</i> spp.	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ROX	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	green	+	
	IAC	yellow	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	orange	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	533-580	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	533-610	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>E. coli stx1/2/2f</i>	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	540-580	+	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	540-610	+	
	<i>Salmonella</i> spp.	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 as well as for the inhibition control.

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 (IAC) per reaction.

Reactions needed for the qualitative *E. coli stx1/2/2f*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection:

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

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

Reactions needed for the qualitative *E. coli stx1/2/2f*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection in enrichments:

For every enrichment 5 reactions for controls (1x no-template 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.

2.1.2 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.

Escherichia coli stx1/2/2f DNA is detected in the FAM-channel, *Listeria monocytogenes* DNA is detected in the ROX-channel and *Salmonella* spp. DNA is detected in the Cy5-channel (see table). In the VIC/HEX-channel the amplification control 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 (IAC).

A Cp value for the internal amplification control (IAC) 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** 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 *E. coli stx1/2/2f*, *Listeria monocytogenes* or *Salmonella* spp. PCR assay.

Result in the respective channel				Interpretation
FAM channel <i>E. coli</i> <i>stx1/2/2f</i>	ROX channel <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Cy5 channel <i>Salmonella</i> spp.	VIC/HEX channel IAC	
positive	negative	negative	positive/negative	<i>E. coli stx1/2/2f</i> DNA detected
negative	positive	negative	positive/negative	<i>Listeria monocytogenes</i> DNA detected
negative	negative	positive	positive/negative	<i>Salmonella</i> spp. DNA detected
negative	negative	negative	positive	negative for <i>E. coli stx1/2/2f</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp.
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.