

**SureFast® Listeria Screening PLUS (100 Reakt.)**

Art. Nr. F5117

Version 2.3

**Beschreibung**

Mit diesem Test wird *Listeria* spp. DNA nachgewiesen.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (PLUS) ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 510 nm und 580 nm (FAM und VIC/HEX) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 2.0<sup>1</sup>, Applied Biosystems 7500, LTF MyGo Pro sowie am Qiagen RotorGene Q.

**Nachweisgrenze**

Die SureFast® Listeria Screening PLUS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

**DNA-Präparation**

Für die DNA-Präparation wird das SureFast® PREP Bacteria Kit empfohlen.

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

**Kit-Inhalt und Lagerung**

2x	Reaction Mix (1,1 ml)	<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  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern.

**Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien**

- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- 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 Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Es wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen und zentrifugieren. Die Taq Polymerase sollte nicht aufgetaut und nicht im Vortex gemischt werden.

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 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

<sup>1</sup> Für die Benutzung des Roche LightCycler® 2.0 ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) verwendet werden.

2. Geräteeinstellungen

	<b>Blockcycler</b>	<b>Rotorcycler/ LightCycler® 480 II</b>
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
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase  Nachweissystem: Diverse Geräte FAM-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LightCycler 2.0 530 nm - none LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  Interne Amplifikationskontrolle: Diverse Geräte VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LightCycler 2.0 560 nm - none LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm  Passive Reference: None	
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 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 Reaktionsgefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und 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.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt (FAM). Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** (VIC/HEX) ist. Sollte die Probe sowie die interne Amplifikationskontrolle **negativ** sein, sind in der Probe Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

**Weitere Informationen**

- Validierungsdaten

**Technischer Support**

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

## Description

The test detects *Listeria* spp. DNA.

Each reaction contains an internal amplification control (PLUS). The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at 510 nm and 580 nm (FAM and VIC/HEX) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 2.0<sup>2</sup>, Applied Biosystems 7500, LTF MyGo Pro and Qiagen RotorGene Q.

## Limit of Detection

The SureFast® Listeria Screening PLUS real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

## DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Bacteria is recommended.

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

## Kit components and storage

2x	Reaction Mix (1.1 ml)	<b>(Code 1)</b>
1x	Taq Polymerase (11 $\mu$ l)	<b>(Code 2)</b>
1x	Positive Control (200 $\mu$ l)	<b>(Code 3)</b>

Store all reagents at  $-20^{\circ}\text{C}$  and protected from light.

## Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument, equipped with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumable (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 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. The tube of the Taq Polymerase should be kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  and not be mixed by vortexing.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 $\mu$ l	218.9 $\mu$ l
Taq Polymerase	0.1 $\mu$ l	1.1 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	<b>220 <math>\mu</math>l</b>

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

<sup>2</sup> note: For the use of the Roche LightCycler® 2.0 a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010) must be used for the color compensation of such devices.

2. Setup

	<b>Blockcycler</b>	<b>Rotorcycler/ LightCycler® 480 II</b>
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
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of Extension Phase  Detection System: Various devices                      FAM-Channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q                              Green LightCycler 2.0                            530 nm - none LightCycler 480 II                        465 nm - 510 nm  Internal Amplification Control: Various devices                      VIC/HEX-Channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q                              Yellow LightCycler 2.0                            560 nm - none LightCycler 480 II                        533 nm - 580 nm  Passive Reference: None	
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 real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- Close the tube of the negative control (the negative control consist of the master-mix).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells or capillaries.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells or capillaries into the real-time 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.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows an amplification in the detection system (FAM).

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system and the internal amplification control (inhibition control) of the sample is **positive** (VIC/HEX). If the sample DNA and the internal amplification control are **negative** the sample contains inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the sample is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

**Product Information**

Validation Report

**Technical Support**

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de).