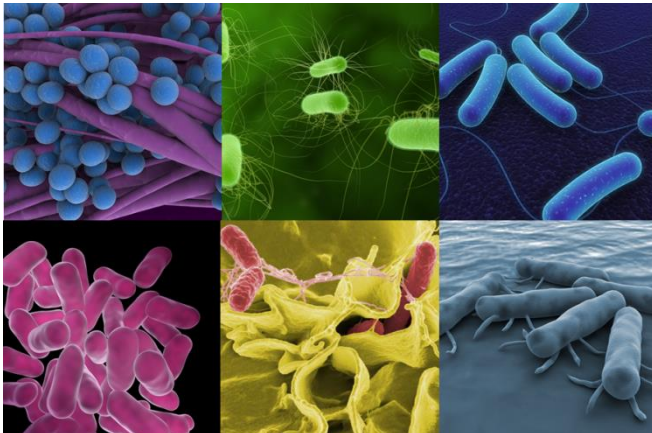


**SureFast<sup>®</sup> Salmonella  
Species/Enteritidis/Typhimurium  
4plex (R&D Version)**

Art. No. F5166

100 rxn

User Manual



August 2018

 **Inhalt** /  **Content**

1.	Allgemeines .....	2
1.1	Beschreibung .....	2
1.2	Nachweisgrenze .....	2
1.3	Kreuzreaktionen .....	2
1.4	DNA-Präparation .....	2
1.5	Kit-Inhalt und Lagerung .....	2
1.6	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien .....	2
1.7	Geräteeinstellungen .....	3
2	Qualitative Analyse .....	3
2.1	Protokoll .....	3
2.1.1	Herstellen des Master-Mix .....	3
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix .....	4
2.2	Interpretation der Ergebnisse .....	4
3	Weitere Informationen .....	4
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	4
3.2	Technischer Support .....	4
1	General Information .....	5
1.1	Description .....	5
1.2	Limit of Detection .....	5
1.3	Cross Reactivity .....	5
1.4	DNA-preparation .....	5
1.5	Kit components and storage .....	5
1.6	Additionally required equipment and materials .....	5
1.7	Setup .....	6
2	Qualitative Analysis .....	6
2.1	Protocol .....	6
2.1.1	Preparation of the master-mix .....	6
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix .....	7
2.2	Interpretation of results .....	7
3	Further Information .....	7
3.1	Product Information .....	7
3.2	Technical Support .....	7

## 1. Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

SureFast® Salmonella Species/Enteritidis/Typhimurium 4plex (R&D Version) ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm, 610 nm und 670 nm (FAM, VIC, ROX und Cy5) detektieren können, verwendet werden.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Salmonella Species/Enteritidis/Typhimurium 4plex (R&D Version) 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.

### 1.3 Kreuzreaktionen

Das Nachweisverfahren für *Salmonella* Enteritidis weist Querempfindlichkeiten zu *Salmonella* Amsterdam, *Salmonella* Blegdam, *Salmonella* Moscow und *Salmonella* Nitra auf.

### 1.4 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFast® PREP Bacteria oder der SureFast® Speed PREP 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  $>3$ ).

### 1.5 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern.

### 1.6 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP Bacteria oder SureFast® Speed PREP)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (522 nm, 553 nm, 610 nm und 670 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

**1.7 Geräteeinstellungen**

	<b>Blockcycler/MIC</b>	<b>Rotorcycler/ LightCycler® 480 II</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	1 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase Nachweissystem <i>Salmonella</i> spp.: Diverse Geräte <b>FAM</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm Interne Amplifikationskontrolle: Diverse Geräte <b>VIC/HEX</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm Nachweissystem <i>Salmonella</i> Enteritidis: Diverse Geräte <b>ROX</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 610 nm Nachweissystem <i>Salmonella</i> Typhimurium: Diverse Geräte <b>Cy5</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 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>		

**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: 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:

<b>Komponenten des Master-Mix</b>	<b>Menge pro Reaktion</b>	<b>10 Reaktionen (zusätzlich 10%)</b>
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.

## 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 Reaktionsgefäße.
- 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 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 *Salmonella* spp., im ROX-Kanal der Parameter *Salmonella* Enteritidis und im Cy5-Kanal der Parameter *Salmonella* Typhimurium detektiert (Siehe Tabelle). Die Interne Amplifikationskontrolle wird im VIC/HEX-Kanal detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige Interne Amplifikationskontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** ist.

Eine Probe, die **negativ** für alle Parameter und **negativ** im VIC/HEX-Kanal (Interne Amplifikationskontrolle) ist, kann nicht bewertet werden. In diesem Fall sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden oder die Nukleinsäure-Extraktion hat nicht ordnungsgemäß funktioniert. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

FAM-Kanal <i>Salmonella</i> spp.	Ergebnis im jeweiligen Kanal			Ergebnis
	ROX-Kanal <i>Salmonella</i> Enteritidis	Cy5-Kanal <i>Salmonella</i> Typhimurium	VIC/HEX-Kanal Amplifikations- kontrolle	
<b>positiv</b>	negativ	negativ	<b>positiv</b>	<i>Salmonella</i> spp. DNA nachweisbar
negativ	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	<i>Salmonella</i> Enteritidis DNA nachweisbar
negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<i>Salmonella</i> Typhimurium DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

## 3 Weitere Informationen

### 3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten

### 3.2 Technischer Support

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

## 1 General Information

### 1.1 Description

The SureFast® Salmonella Species/Enteritidis/Typhimurium 4plex (R&D Version) is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium.

Each reaction contains an internal amplification control. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm, 610 nm and 670 nm (FAM, VIC, ROX and Cy5) at the same time.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFast® Salmonella Species/Enteritidis/Typhimurium 4plex (R&D Version) 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.

### 1.3 Cross Reactivity

Cross reactivity was observed with DNA extracts from *Salmonella* Amsterdam, *Salmonella* Blegdam, *Salmonella* Moscow and *Salmonella* Nitra in the detection system for *Salmonella* Enteritidis.

### 1.4 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Bacteria or SureFast® Speed PREP 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  $C_p$  difference  $>3$ ).

### 1.5 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

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

### 1.6 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP Bacteria or SureFast® Speed PREP)
- real-time PCR instrument with four detection channels (522 nm, 553 nm, 610 nm and 670 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps) pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

### 1.7 Setup

	<b>Blockcycler/MIC</b>	<b>Rotorcycler/ LightCycler® 480 II</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	1 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of Extension Phase  Detection System <i>Salmonella</i> spp.: Various devices <b>FAM</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  Internal Amplification Control: Various devices <b>VIC/HEX</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm  Detection System <i>Salmonella</i> Enteritidis: Various devices <b>ROX</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 610 nm  Detection System <i>Salmonella</i> Typhimurium: Various devices <b>Cy5</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 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>		

## 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). 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°C and not be mixed by vortexing.

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 µl</b>	<b>220 µl</b>

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 or capillaries.
- 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 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.

## 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 need to give the correct results.

*Salmonella* spp. is detected in the FAM-channel, *Salmonella* Enteritidis is detected in the ROX-channel and *Salmonella* Typhimurium is detected in the Cy5-channel (see table). The internal amplification control will be detected in the VIC/HEX-channel.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows an amplification in the respective channel. A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and the internal amplification control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive**.

If the sample DNA and the internal amplification control are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances or the sample preparation was not successful. Under these circumstances an evaluation of the results is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

result in the respective channel				VIC/HEX channel amplification control	result
FAM channel <i>Salmonella</i> spp.	ROX channel <i>Salmonella</i> Enteritidis	Cy5 channel <i>Salmonella</i> Typhimurium			
<b>positive</b>	negative	negative	<b>positive</b>	<i>Salmonella</i> spp. DNA detected	
negative	<b>positive</b>	negative	<b>positive</b>	<i>Salmonella</i> Enteritidis DNA detected	
negative	negative	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<i>Salmonella</i> Typhimurium DNA detected	
negative	negative	negative	negative	invalid	

## 3 Further Information

### 3.1 Product Information

- Validation Report

### 3.2 Technical Support

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