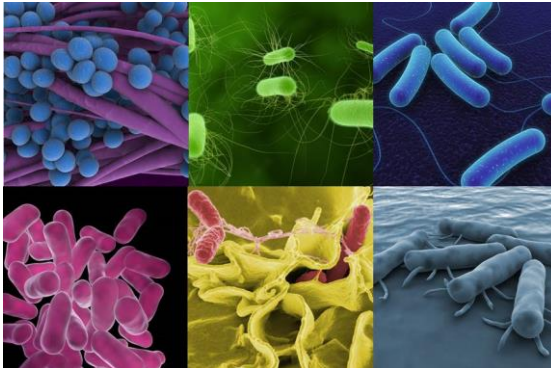


CONGEN

SureFast® Salmonella PLUS

Art. No. F5111
100 rxn

User Manual



January 2020

 Inhalt

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	3
1.6	Geräteeinstellungen	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen	4
2	Qualitative Analyse	5
2.1	Protokoll	5
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	5
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	5
2.2	Interpretation der Ergebnisse	6
3	Weitere Informationen	6
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	6
3.2	Technischer Support	6

 Content

1	General Information	7
1.1	Description	7
1.2	Limit of Detection	7
1.3	DNA-preparation	7
1.4	Kit components and storage	7
1.5	Additionally required equipment and materials	7
1.6	Setup.....	8
1.7	Detection channel Set-up	8
2	Qualitative Analysis	9
2.1	Protocol	9
2.1.1	Preparation of the master-mix	9
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	9
2.2	Interpretation of results	10
3	Further Information	10
3.1	Product Information	10
3.2	Technical Support	10

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® Salmonella PLUS ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz von *Salmonella* spp.. Das SureFast® Salmonella PLUS real-time PCR Kit wurde in Kombination mit dem SureFast® PREP Salmonella Kit von AOAC (Lizenz-Nr.: 041103) validiert und zertifiziert.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) ausgestattet.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 2.0, Applied Biosystems 7500, Qiagen Rotor-Gene, Cepheid SmartCycler®, BMS MIC sowie am LTF MyGo Pro.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Salmonella PLUS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFast® PREP Salmonella oder SureFast® Speed PREP 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).

1.4 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°C zu lagern.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit
(z.B. SureFast® PREP Salmonella Art. Nr. F1007 / Speed PREP Art. Nr. F1054)
- 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, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & BMS MIC	Rotorcycler & LightCycler® 480 II & LTF MyGo Pro
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	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf „none“.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
BMS MIC	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	
	IAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 2.0	<i>Salmonella</i> spp.	530	None	Das SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) wird benötigt. Stellen Sie die Seek Temperature auf 58°C.
	IAC	560	None	
Roche LightCycler® 480 II	<i>Salmonella</i> spp.	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>Salmonella</i> spp.	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

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 Master-Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen 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
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 *Salmonella* spp. detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter *Salmonella* spp. bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt.

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

Eine Probe, die **negativ** im FAM-Kanal 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.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung. 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® Salmonella PLUS is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific DNA sequence of *Salmonella* spp.. The SureFast® Salmonella PLUS real-time PCR kit has been validated and certified in combination with the SureFast® PREP Salmonella kit by AOAC (licence number: 041103).

Each reaction contains an internal amplification control (IAC).

The real-time PCR assay can be used with real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions in channels FAM and VIC/HEX at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 2.0, Applied Biosystems 7500, Cepheid SmartCycler®, BMS MIC, LTF MyGo Pro and Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Salmonella PLUS 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.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Salmonella or SureFast® Speed PREP 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).

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 11 µl	Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

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

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit
(e.g. SureFast® PREP Salmonella Art. No. F1007 / Speed PREP Art. No. F1054)
- Real- time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 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

1.6 Setup

	Blockcycler & BMS MIC	Rotorcycler & LightCycler® 480 II & LTF MyGo Pro
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 Detection channel set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	None	Use the passive reference dye ROX setting "none".
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
BMS MIC	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	
	IAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 2.0	<i>Salmonella</i> spp.	530	None	The SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010) is required. Set the Seek Temperature to 58°C.
	IAC	560	None	
Roche LightCycler® 480 II	<i>Salmonella</i> spp.	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>Salmonella</i> spp.	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

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.

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:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 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 or capillaries.
- Pipette 5 µl of 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. DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the amplification control is detected.

A sample is stated **positive** for *Salmonella* spp., if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel.

A sample is stated **negative** for *Salmonella* spp., if the sample DNA shows no amplification in the FAM-channel and the internal 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 samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

3 Further Information

3.1 Product Information

Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage. 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

