

CONGEN

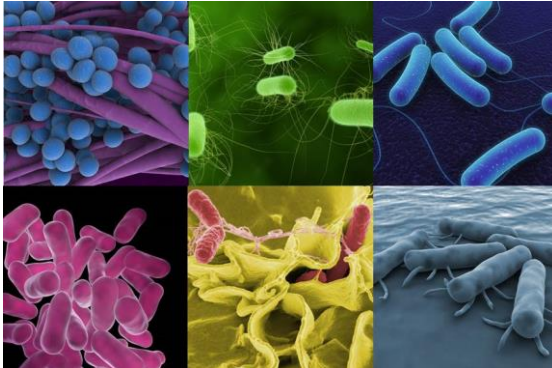
SureFast® Salmonella ONE

Art. No. F5211
100 rxn

User Manual



MICROVAL 
European validation and certification organisation



March 2025

 **Inhalt**

1	Allgemeines	4
1.1	Beschreibung	4
1.2	Nachweisgrenze	4
1.3	Kit-Inhalt und Lagerung	5
1.4	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	5
1.5	Vorsichtsmaßnahmen	5
1.6	Geräteeinstellungen	6
1.7	Detektionskanaleinstellungen	6
2	Qualitative Analyse	8
2.1	Protokoll	8
2.1.1	Kulturelle Anreicherung	8
2.1.2	DNA-Präparation	8
2.1.3	Herstellen des Master-Mix	9
2.1.4	Herstellen des real-time PCR-Mix	9
2.2	Interpretation der Ergebnisse	10
2.3	Kulturelle Bestätigung	10
3	Validierung	11
4	Grenzen der Methode	11
5	Weitere Informationen	11
5.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	11
5.2	Technischer Support	11



Content

1 General Information12

1.1 Description12

1.2 Limit of Detection12

1.3 Kit components and storage13

1.4 Additionally required equipment and materials13

1.5 Precautions for users13

1.6 Setup14

1.7 Detection channel Set-up14

2 Qualitative Analysis16

2.1 Protocol16

2.1.1 Cultural Enrichment16

2.1.2 DNA-preparation16

2.1.3 Preparation of the master-mix17

2.1.4 Preparation of the real-time PCR-mix17

2.2 Interpretation of results18

2.3 Cultural Confirmation18

3 Validation19

4 Limitations of the method19

5 Further Information19

5.1 Product Information19

5.2 Technical Support19

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Das SureFast® Salmonella ONE dient der einfachen und zeitsparenden Extraktion und Detektion von *Salmonella* spp. in verschiedenen Lebensmitteln und eignet sich zur Anwendung in der Diagnostik von Laboratorien für Lebensmittelanalytik.

Die Methode setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen: 1) kulturelle Anreicherung, 2) DNA-Präparation, 3) real-time PCR und 4) Interpretation der Ergebnisse. SureFast® Salmonella ONE wurde von MicroVal (Lizenz-Nr. 2014LR43) und AOAC (Lizenz-Nr. 081803) validiert und zertifiziert.

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.

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 AriaMx, Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystems® 7500, Bio-Rad CFX96 und Bio Molecular Systems MIC.

Die interne technische Geräteverifizierung (nicht Teil der PTM Validierung) erfolgte zusätzlich am Roche LightCycler® 2.0, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Cepheid SmartCycler, LTF MyGo Pro und Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Salmonella 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.

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 zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 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)
- Nicht-selektive Anreicherungsflüssigkeit (z.B. gepuffertes Peptonwasser)

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 & 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/ Dx/Opus	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
Bio Molecular Systems MIC	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	
	IAC	yellow	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	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.
	IAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	VIC	+	

SureFast® Salmonella ONE (100 rxn)

Art. Nr. F5211

März 2025

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	IAC	yellow	+	
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 Kulturelle Anreicherung

Für die Probenvorbereitung von Lebens- und Futtermitteln gelten die Vorgaben von ISO 6887 und ISO 6579. Zur Vorbereitung der Anreicherung werden 25 g bzw. 25 ml Probemenge in 225 ml einer nicht-selektiven Anreicherungsflüssigkeit (z.B. gepuffertes Peptonwasser) 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ für $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Alternativ können auch andere geeignete, validierte Anreicherungsverfahren angewendet werden.

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 C_p -Wert Differenz von > 3).

2.1.2 DNA-Präparation

Wenn die Anreicherungskultur geschüttelt oder durchmischt wurde, soll diese für 5 bis 10 min sedimentieren. 500 μl Lysis Buffer (**Code L**) in ein 2,0 ml Tube (nicht im Kit enthalten) vorlegen. Dann aus dem oberen Drittel der Anreicherungskultur 500 μl entnehmen und zu den 500 μl Lysis Buffer (**Code L**) geben.

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.

Das Lysat kann direkt in der PCR eingesetzt werden. Wird das Lysat nicht direkt 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 *Salmonella* spp.-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den qualitativen *Salmonella* spp.-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 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. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der IAC führen.

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

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** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist.

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

Hinweis: Während der MicroVal-Studie wurden erhöhte Inhibitionslevel für frische Kräuter, Kakaopulver, Gewürze und Aromaten sowie Eiprodukte beobachtet.

2.3 Kulturelle Bestätigung

Positive PCR Ergebnisse sollten mittels kultureller Nachweismethoden bestätigt werden (z.B. ISO 6579).

3 Validierung

Die externe Validierung von SureFast® Salmonella ONE erfolgte nach AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces und der ISO 16140-2:2016 [Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method]. In der Matrixstudie wurde die Referenzmethode ISO 6579:2002 (Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.) eingesetzt.

Das Kit stellt eine Erweiterung der SureFast® Salmonella PLUS Methode dar und wurde AOAC-RI für die folgenden zusätzlichen Matrices validiert: rohes Hackfleisch, gefrorenes Geflügelfleisch, Rohmilch, frischer Spinat, pasteurisiertes flüssiges Vollei, Tierfutter Pellets.

Die MicroVal-Studie erfolgte nach ISO 16140-2:2016 mit jeweils 25 g Portionen des jeweiligen Probenmaterials. Die Probenpräparation wurde nach ISO 6887 durchgeführt. In der Sensitivitätsstudie wurden insgesamt 391 Proben aus sechs Lebensmittel-Kategorien untersucht. SureFast® Salmonella ONE wurde für die folgenden Lebensmittel-Kategorien validiert: Geflügelfleisch, Fleischprodukte, Milchprodukte, Gemüse (ausgenommen Sprossen), Eiprodukte und Tierfutter.

4 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.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Es deutet darauf hin, dass die Ziel DNA (*Salmonella* DNA) vorhanden ist.

5 Weitere Informationen

5.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/download)
- Validation Report auf Anfrage

5.2 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 ONE can be applied for the fast and simple isolation and detection of *Salmonella* spp. in different types of food and is intended to be used by all kinds of food testing laboratories.

The method consists of the following steps: 1) cultural enrichment, 2) DNA-preparation, 3) real-time PCR detection and 4) interpretation of results. SureFast® Salmonella ONE has been validated and certified by MicroVal (License-No. 2014LR43) and AOAC (License-No. 081803).

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.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time.

The technical validation of instruments was performed on Agilent AriaMx, Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystems® 7500, Bio-Rad CFX96 and Bio Molecular Systems MIC.

The internal technical verification of instruments (not part of the PTM validation) was performed on Roche LightCycler® 2.0, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Cepheid SmartCycler, LTF MyGo Pro and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Salmonella 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 two detection channels (510 nm and 580 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)
- Non-selective enrichment broth (e.g. buffered peptone water)

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

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LightCycler® 480 II & LTF MyGo Pro
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>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
Bio Molecular Systems MIC	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	
	IAC	yellow	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	Ignore cycles before , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cyclor operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	IAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	+	
	IAC	VIC	+	

SureFast® Salmonella ONE (100 rxn)

Art. No. F5211

March 2025

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Salmonella</i> spp.	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	IAC	yellow	+	
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 Cultural Enrichment

Sample preparation of food and feed matrices should apply to ISO 6887 and ISO 6579 standards. For enrichment, a volume of 25 g or 25 ml sample material is homogenized with 225 ml of a non-selective enrichment broth (e. g. buffered peptone water). If test portions deviate from 25 g, the enrichment broth volume should be chosen in a 1:10 ratio. Enrichment is performed for 18 h ± 2 h at 37°C ± 1°C. Alternatively, other suitable, validated enrichment procedures can be used.

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.

Transfer 500 µl of Lysis Buffer (**Code L**) into a 2.0 ml tube (not provided with the kit) and add 500 µl of the upper third from the enrichment to the Lysis Buffer (**Code L**).

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

Incubate for 10 min at 95°C without shaking.

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

Note: It is necessary to ensure that the sediment is not stirred up and no particles are pipetted in the PCR reaction.

The lysate is ready-to-use for PCR. If the lysate is not used immediately 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 as well as for the inhibition control.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control and 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 *Salmonella* spp. detection:

3 reactions for controls (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control)

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

Reactions needed for the qualitative *Salmonella* spp. 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.

Salmonella spp. DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the internal amplification control (IAC) is detected.

A sample is stated **positive** for *Salmonella* spp., if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the IAC.

A Cp value for the IAC is not needed to obtain a positive result of the Positive Control.

A sample is stated **negative** for *Salmonella* spp., if the sample DNA shows no amplification in the FAM-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 *Salmonella* spp. PCR assay.

Note: During the MicroVal study increased inhibition levels were observed for fresh herbs, cocoa, spices and aromatics as well as egg products. In these cases, please proceed as recommended above.

2.3 Cultural Confirmation

Positive PCR results should be confirmed by cultural detection methods (e.g. ISO 6579).

3 Validation

SureFast® Salmonella ONE was validated per the AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces and the ISO 16140-2:2016 [Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method]. The reference method for the matrix study was ISO 6579:2002 (Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.).

The kit is an extension of the SureFast® Salmonella PLUS method and has been AOAC RI validated for the following additional food matrices: raw ground beef, frozen poultry meat, raw milk, fresh spinach, pasteurized liquid whole egg, pet food pellets.

The MicroVal method comparison study according to ISO 16140-2:2016 was carried out using 25 g portions of sample material. Sample preparations were done according to ISO 6887 parts. In the sensitivity study a total of 391 samples from six different food categories were investigated. SureFast® Salmonella ONE has been MicroVal validated for the following food categories: poultry meat, meat products, dairy products, vegetables (excluding sprouts), egg products and feed.

4 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.
- A positive test result does not necessary indicate the presence of viable organism. It is indicative for the presence of the target DNA (*Salmonella* DNA).

5 Further Information

5.1 Product Information

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

5.2 Technical Support

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