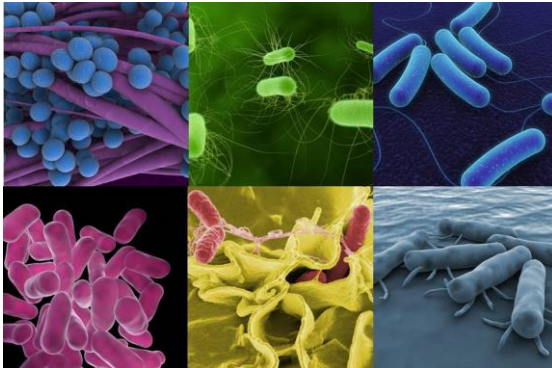


CONGEN

SureFast®
Enterobacteriaceae Screening
PLUS

Art. No. F5507
100 rxn

User Manual



February 2024

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	Vorsichtsmaßnahmen	4
1.7	Geräteeinstellungen	5
1.8	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	Grenzen der Methode	7
4	Weitere Informationen	7
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	7
4.2	Technischer Support	7



Content

1	General Information	8
1.1	Description	8
1.2	Limit of Detection	8
1.3	DNA-preparation	9
1.4	Kit components and storage	9
1.5	Additionally required equipment and materials	9
1.6	Precautions for users	9
1.7	Setup.....	10
1.8	Detection channel Set-up	10
2	Qualitative Analysis	11
2.1	Protocol	11
2.1.1	Preparation of the master-mix	11
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	11
2.2	Interpretation of results	12
3	Limitations of the method	12
4	Further Information	12
4.1	Product Information	12
4.2	Technical Support	12

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® Enterobacteriaceae Screening PLUS ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen Enterobacteriaceae DNA-Sequenz.

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 zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung 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 Q, LTF MyGo Pro sowie am R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Enterobacteriaceae Screening 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 Bacteria Kit 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 die Methode nach ISO 21528-1 empfohlen.

1.4 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

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.

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 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 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.

1.7 Geräteeinstellungen

	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

1.8 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Enterobacteriaceae	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx/Mx	Enterobacteriaceae	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Enterobacteriaceae	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Enterobacteriaceae	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Enterobacteriaceae	green	+	
	IAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	Enterobacteriaceae	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Enterobacteriaceae	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	Enterobacteriaceae	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Enterobacteriaceae	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 Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Enterobacteriaceae-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 Enterobacteriaceae-Nachweis in Anreicherungen:

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 Enterobacteriaceae detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter Enterobacteriaceae bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen 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 Parameter Enterobacteriaceae 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 Enterobacteriaceae mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

3 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Es deutet darauf hin, dass die Ziel DNA (Enterobacteriaceae DNA) vorhanden ist.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- Das Nachweisverfahren weist Querempfindlichkeiten zu *Aeromonas* Spezies und *Aggregatibacter aphrophilus* zu 100 % auf.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

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

4.2 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® Enterobacteriaceae Screening PLUS is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific Enterobacteriaceae DNA sequence.

The Test contain 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 two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The technical verification 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, Qiagen Rotor-Gene Q, LTF MyGo Pro and R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Enterobacteriaceae Screening 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 Bacteria 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 the method of the ISO 21528-1 is recommended.

1.4 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

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.

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 two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 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.

1.7 Setup

	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

1.8 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	Enterobacteriaceae	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx/Mx	Enterobacteriaceae	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Enterobacteriaceae	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Enterobacteriaceae	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Enterobacteriaceae	green	+	
	IAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	Enterobacteriaceae	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Enterobacteriaceae	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	Enterobacteriaceae	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Enterobacteriaceae	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.

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 Enterobacteriaceae 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 Enterobacteriaceae 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.

2.1.2 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 or capillaries 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.

Enterobacteriaceae DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the amplification control is detected.

A sample is stated **positive** for Enterobacteriaceae, if the sample DNA shows amplification in the FAM-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 Enterobacteriaceae, 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 Enterobacteriaceae PCR assay.

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- A positive test result does not necessary indicate the presence of viable organism. It is indicative for the presence of the target DNA (Enterobacteriaceae DNA).
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- 100 % Cross reactivity was observed with DNA extracts from *Aeromonas* species and *Aggregatibacter aphrophilus*.

4 Further Information

4.1 Product Information

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

4.2 Technical Support

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