



PCRFast[®]
Yersinia enterocolitica

Realtime (Sonde)
Realtime (probe)

IF / MR1007

Deutsch Seite 2
English Page 15

Kurzinformation

Einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* nach Anreicherung in Lebensmitteln und zur Identifizierung verdächtiger Kolonien in Realtime (Fam Sonde mit nicht fluoreszierendem Quencher, Nachweis des ail Gens der humanpathogenen Serotypen 0:3, 0:5, 0:6, 0:8, 0:9 und 0:5:27). Mit dem Test können 96 Reaktionen durchgeführt werden. Alle Reaktionsgefäße enthalten ein spezifisches Primerpaar, die Sonde und eine interne Amplifikationskontrolle (HEX Sonde mit nicht fluoreszierendem Quencher) zur Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte.

8 Reaktionsgefäße (rote Markierung) enthalten zusätzlich *Yersinia enterocolitica* - DNA.

Zeitbedarf:	Anreicherung.....ca. 24 h
(10 Proben)	DNA - Extraktion.....25 min
	PCR - Ansatz.....15 min
	PCR.....2 h

PCRFast®

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH. ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

PCRFast®

is a registered trademark of the ifp Institut für Produktqualität GmbH. ifp also offers contract analysis.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

1. Testprinzip

PCRFast[®] *Yersinia enterocolitica* ist ein einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* der humanpathogenen Serotypen (0:3, 0:5, 0:6, 0:8, 0:9 und 0:5:27) in Lebensmitteln nach Anreicherung und zur Identifizierung verdächtiger Kolonien in Realtime (Nachweis des *ail* Gens). Der Vorschlag zur Durchführung entspricht den internationalen Standards (ISO) für die PCR Analytik sowie den offiziellen Vorschriften nach § 64 LFGB.

Alle Reaktionsgefäße enthalten die für die PCR - Reaktion notwendigen spezifischen Primer und Sonde in optimaler Menge und eine **interne Amplifikationskontrolle**¹. Die **markierten Reaktionsgefäße (rot)** enthalten zusätzlich *Yersinia enterocolitica* - DNA.

In das Reaktionsgefäß werden **12,5 µl zweifach konzentrierter MasterMix** vorgelegt und anschließend **12,5 µl des DNA - Extraktes** zugegeben. Der MasterMix enthält bereits Polymerase, Nukleotide und Magnesiumchlorid in optimaler Konzentration. Die Zielsequenz wird dann in einem PCR - Thermocycler amplifiziert. Bei korrekter Amplikonsequenz hybridisiert die Sonde auf den vervielfältigten DNA - Abschnitten. Dabei werden Reporter (Fam/HEX) und Quencher (nicht fluoreszierend) der Sonde getrennt und der Reporter (Fam/HEX) sendet ein Fluoreszenzsignal (Fam: 520 nm, HEX: 553 nm) aus. Die Intensität dieses Signals steigt mit der Menge an neu gebildeter DNA an, wodurch sich bei vorhandener Zielsequenz ein Anstieg der Fluoreszenz messen und darstellen lässt. Bei nicht vorhandener Zielsequenz ist kein Fluoreszenzanstieg beobachtbar.

2. Packungsinhalt

Der Testkit enthält:

- 11 x **Streifen (farblos)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäße (88 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern, Sonde und interner Amplifikationskontrolle.
- 1 x **Streifen (rot)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäße (8 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern, Sonde, interner Amplifikationskontrolle und zusätzlicher *Yersinia enterocolitica* - DNA.

¹ siehe Seite 12 Kapitel 12

3. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

Geräte und Labormaterialien

- Homogenisierer (Stomacher)
- Stomacher - Beutel, steril
- Messzylinder, steril
- Erlenmeyerkolben, steril
- Kulturröhrchen, steril
- Brutschrank 28 °C bis 30 °C
- Vortexer
- Biozentrifuge, mind. 14.000 x g (für 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße)
- **PCR - Thermocycler Realtime:**
 - z. B. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P
- Mikroliterpipetten 2 - 20 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl, z. B. Gilson Pipetman P, jeweils mit Filterspitzen
- 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße

Reagenzien

Anreicherung

- Hirn - Herz - Bouillon (z. B. Brain - Heart - Infusion, Fluka) oder
- Trypticase Soy Broth (TSB)
- Agarplatte zum Ausstreichen der Anreicherung

DNA-Extraktion

- Ethanol > 95 % (vergällt)
- 0,1 x TE - Puffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0,1 mmol / l)
- Wasser deionisiert, DNA - frei
- DNA - Extraktionskit, z.B. PCRFast[®] Microbe Extraction

PCR

Realtime

zweifach konzentrierter MasterMix (Hotstart empfohlen),
z. B. AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix, Applied Biosystems Nr. 4318739;
Brilliant[®] II QPCR MasterMix, Stratagene Nr. 600828; QuantiTect Probe
PCR Kit, Qiagen Nr. 204343

4. Vorsichtsmaßnahmen

- alle Arbeiten sollten mit den im Labor üblichen Schutzmassnahmen und alle PCR Arbeiten entsprechend den Empfehlungen nach CEN / ISO durchgeführt werden
- zur Vermeidung von Verschleppungen alle Arbeiten mit Schutzhandschuhen und Filterspitzen durchführen
- räumliche Trennung von Probenaufarbeitung, PCR - Setup und Detektion beachten
- potentiell *Yersinia enterocolitica*haltige Medien und Gefäße sollten autoklaviert werden (20 Minuten bei 120 °C)

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Den Testkit bzw. die Reaktionsgefäße bei 2 - 8 °C lagern.

6. Probenanreicherung und DNA - Isolierung

6.1. Anreicherung

Die Prüfung auf Abwesenheit von *Yersinia enterocolitica* erfolgt durch eine Anreicherung, z. B. in einer Hirn - Herz - Bouillon. Eine Lebensmittelprobe wird in einen sterilen Stomacher - Beutel eingewogen, 1 : 10 (w / v) mit der Hirn - Herz - Bouillon verdünnt und 24 h bei 28 °C - 30 °C bebrütet (z. B. 25 g Probe + 225 ml Hirn - Herz - Bouillon)

6.2. DNA - Isolierung

Für die DNA - Isolierung können konventionell erhältliche Extraktionssysteme verwendet werden (z.B. PCRFast[®] Microbe Extraction).

Nach der DNA - Extraktion wird das Eluat 1 : 10 (v / v) mit 0,1 x TE - Puffer verdünnt und für die PCRFast[®] Reaktion eingesetzt (z. B. 10 µl Eluat + 90 µl 0,1 x TE - Puffer).

6.3. Bestätigung verdächtiger Kolonien

Zur Bestätigung verdächtiger Kolonien auf festen Nährmedien ist es ausreichend, mit einer Öse diese Kolonien picken und in einem Reaktionsgefäß in 0,2 ml 0,1 x TE - Puffer aufschlämmen und 10 min bei 95 °C erhitzen. Anschließend wird die Probe abgekühlt und 5 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand kann dann direkt für PCRFast® verwendet werden.

7. PCR - Ansatz

7.1. Vorbereitungen

- Streifen aus der Folie entnehmen und benötigte Anzahl Reaktionsgefäße abtrennen
- die restlichen Streifen / Reaktionsgefäße zusammen mit dem Trockenbeutel in die Folie zurücklegen, Folie gut verschließen und bei 2 - 8 °C lagern
- die benötigte Menge MasterMix bereitstellen (pro Reaktion 12,5 µl)

7.2. Ansatz

- folgende Volumina in die Reaktionsgefäße pipettieren:

Pro Probe	Reaktionsgefäß	Master- Mix	Probe
Probe	farblos	12,5 µl	12,5 µl

Tab. 1: Pipettieransatz PCRFast® *Yersinia enterocolitica*

- die Reaktionsgefäße verschließen (abzentrifugieren empfohlen) und in den PCR - Thermocycler stellen.
- **Empfohlene Kontrollen sind im Kapitel 12 „Anhang“, Seite 12 näher beschrieben**

7.3. Geräteeinstellungen

Reporter: Fam und HEX
Quencher: keine Fluoreszenz
Referenzfarbstoff: ROX (abhängig vom verwendeten MasterMix)

Für die Amplifikation folgendes Temperatur - / Cyclerprofil einstellen:

Cyclerprofil

10 min	95 °C	Aktivierung der Polymerase
15 sec	95 °C	
30 sec	55 °C	45 Zyklen
30 sec	72 °C	

Anmerkung:

Die Validierung wurde mit Brilliant[®] II QPCR MasterMix von Stratagene und den unter Punkt 3 genannten Thermocyclern durchgeführt. Eventuell muss das vorgegebene Cyclerprofil an das jeweilige Gerät und den MasterMix angepasst werden.

7.4. Detektion

- die Auswertung der Amplifikation erfolgt über den Amplificationplot
- prinzipiell soll die Auswertung über die Software der Realtime Thermocycler erfolgen. Ergeben die Voreinstellungen der Analysesoftware keine zufrieden stellenden Ergebnisse, lassen sich die Einstellungen für den „Threshold“ und die „Basislinie“ ändern

8. Auswertung

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung zusammengefasst. Bei einer positiven Probe liegt der Fluoreszenzschwermwert der Amplifikationskurve deutlich über dem Threshold.

8.1. Auswertematrix

interne Amplifikationskontrolle	Probe	Ergebnis
+	+	Probe positiv
+	-	Probe negativ
-	-	Inhibition*

Tab. 2: Auswertung PCRFast® *Yersinia enterocolitica*

* extrahierte Proben - DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

+ = Amplifikation

- = keine Amplifikation

8.2. Beispiele für die Auswertung der Amplifikationplots

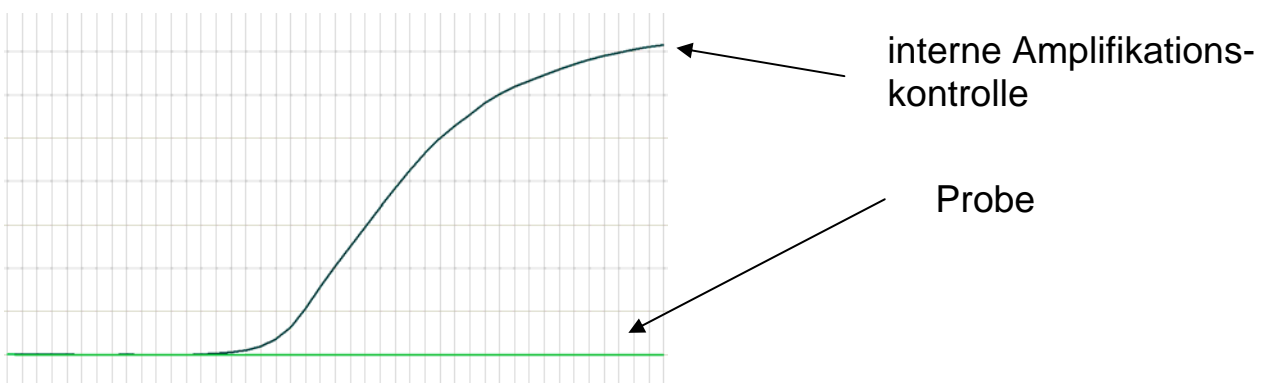


Abb. 1: Probe ist negativ (keine Amplifizierung der Probe)

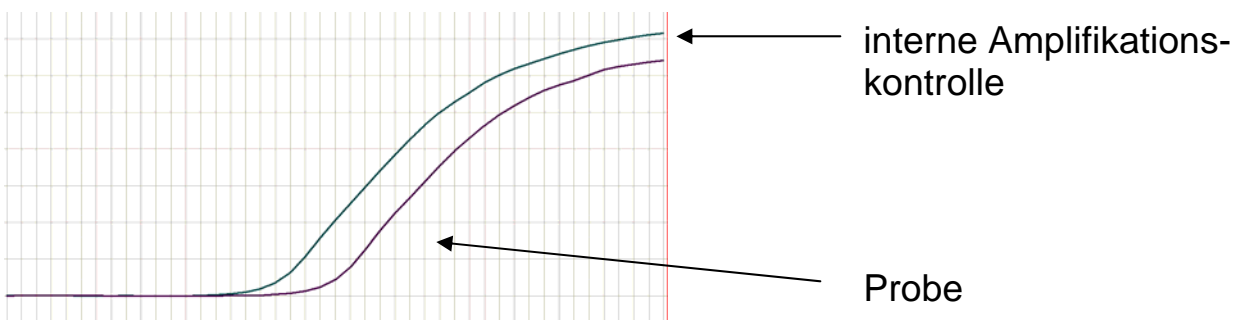


Abb. 2: Probe ist positiv

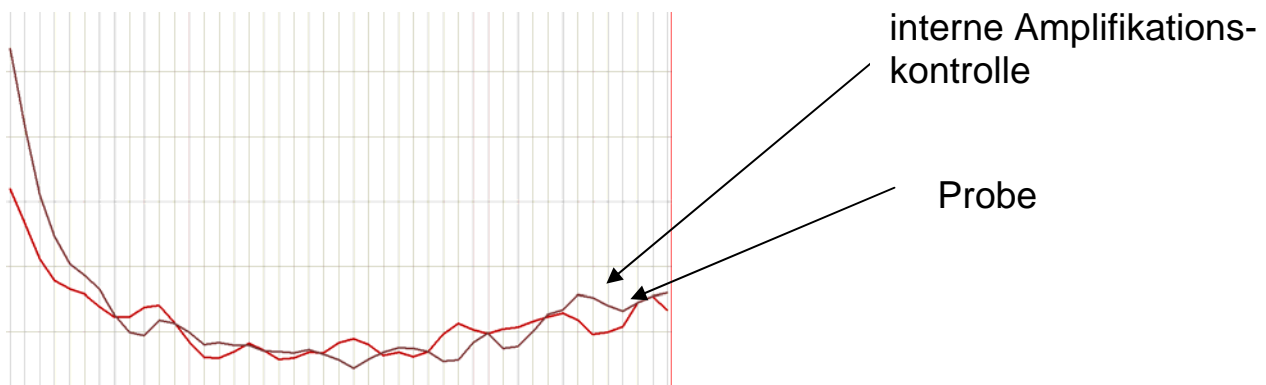


Abb. 3: Inhibition der Reaktion, isolierte DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

9. Sensitivität

Nachweisgrenze: 1 *Yersinia enterocolitica* in 25 g Probenmaterial.

10. Spezifität

PCRFast[®] *Yersinia enterocolitica* ist 100 % spezifisch auf *Yersinia enterocolitica*. Folgende Spezies wurden mit jeweils mindestens 2500 Kopien auf Kreuzreaktivität getestet:

Spezies		Spezies		Spezies	
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serotyp 0:3)	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serotyp 0:5)	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serotyp 0:6)	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serotyp 0:8)	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serotyp 0:9)	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serotyp (0:5:27))	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	nicht humanpathogene <i>Yersinia enterocolitica</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Salmonella</i> spp.	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Enterobacteriaceae STX 1	-	Enterobacteriaceae STX 2	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-

Tab. 3: Spezifität PCRFast[®] *Yersinia enterocolitica*

- + Amplifikation
- keine Amplifikation

Sollten Fragen zur Durchführung des Testes, zur Probenaufarbeitung oder zur PCR - Analytik im Allgemeinen bestehen, dann wenden Sie sich bitte an das Kompetenzzentrum für DNA - Analytik des ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com
Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0
Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50



Weitere Informationen zur Durchführung von PCRFast[®] finden Sie auch unter www.produktqualitaet.com.

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. ifp übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

11. Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 22174)

L 00.00 - 45 „Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase - Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln“

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20837)

L 00.00 - 109 „Anforderungen an die Probenvorbereitung für die qualitativen Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase - Kettenreaktion (PCR)“

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20838)

L 00.00 - 110 „Anforderung an die Amplifikation und den Nachweis bei qualitativen Verfahren zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase - Kettenreaktion (PCR)“

Nakajima H., Inoue M., Mori T, Itoh K.I., Arakawa E., Watanabe H.

“Detection and Identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an Improved Polymerase Chain Reaction Method” J Clin Microbiol, (1992), 30, No. 9, 2484-2486

12. Anhang

Für eine gute PCR - Praxis empfiehlt das ifp das regelmäßige Mitführen der unten genannten Kontrollen:

Interne Amplifikationskontrolle (in jedem Reaktionsgefäß enthalten)

Kontroll - DNA die in jedem PCRFast® Reaktionsgefäß enthalten ist für die Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte

Regelmäßig mitzuführende Kontrollen

Negative PCR - Kontrolle (farbloses Reaktionsgefäß)

Reaktion die mit 0,1 x TE - Puffer anstelle des DNA - Extrakts durchgeführt wird für die Überprüfung auf Kontamination des MasterMixes.

Empfehlung: mit jedem Analysenlauf mitführen.

Positive PCR - Kontrolle (rot markiertes Reaktionsgefäß)

Reaktion, die die Ziel - DNA in einer festgelegten Menge oder Anzahl an Kopien enthält für die Überprüfung der Funktionalität des MasterMixes.

Empfehlung: mit jedem Analysenlauf mitführen.

Negative Extraktionskontrolle (farbloses Reaktionsgefäß)

Kontrolle, die sämtliche Schritte der DNA - Extraktion ohne Zugabe des Untersuchungsmaterials durchläuft (Reagenzienblindwert). Das Untersuchungsmaterial wird durch die entsprechende Menge an Wasser ersetzt und dient der Überprüfung der Zielsequenzfreiheit der Extraktionsreagenzien.

Empfehlung: bei jeder Extraktionsserie mitführen.

Zusätzliche empfohlene Kontrollen

Negative Prozesskontrolle (farbloses Reaktionsgefäß)

Probe einer Lebensmittelmatrix ohne Zielsequenz, die sämtliche Stufen des analytischen Prozesses durchläuft, und für die Überprüfung der Zielsequenzfreiheit aller verwendeten Geräte und Reagenzien dient. Ersetzt bei Mitführung die negative Extraktionskontrolle.

Positive Prozesskontrolle (farbloses Reaktionsgefäß)

Die Zielsequenz beinhaltende Probe, z. B. Referenzprobe oder dotierte Nullprobe, die genauso wie die zu untersuchenden Proben zu behandeln ist für die Überprüfung der Probenaufarbeitung.

Pro Ansatz	Reaktionsgefäß	MasterMix	0,1 x TE - Puffer
negative PCR - Kontrolle	farblos	12,5 µl	12,5 µl
positive PCR - Kontrolle	rot	12,5 µl	12,5 µl
Pro Extraktions- serie	Reaktionsgefäß	MasterMix	Extrakt
negative Extraktionskontrolle	farblos	12,5 µl	12,5 µl
negative Prozesskontrolle	farblos	12,5 µl	12,5 µl
positive Prozesskontrolle	farblos	12,5 µl	12,5 µl

Tab. 4: Pipettieransatz für Kontrollen

interne Amplifikationskontrolle	+	+	+	+	+
negative PCR - Kontrolle	-				
positive PCR - Kontrolle		+			
negative Extraktionskontrolle			-		
negative Prozesskontrolle				-	
positive Prozesskontrolle					+
Ergebnis	Mastermix nicht kontaminiert	MasterMix funktionsfähig	Extraktionsreagenzien nicht kontaminiert	Analyse fehlerfrei	Analyse fehlerfrei

Tab. 5: Auswertung für die Kontrollen

+ = Amplifikation

- = keine Amplifikation

PCRFast[®] Yersinia enterocolitica Realtime (probe)

Brief information

Simple, molecular biological test (PCR) for detecting Yersinia enterocolitica after enrichment from foodstuffs and for identification of colonies in realtime (probe with Fam reporter and non fluorescence quencher, detection of the ail gene of human pathogen serotypes 0:3, 0:5, 0:6, 0:8, 0:9, 0:5:27). The test kit has 96 reaction vials, each reaction vial contains a specific primer pair, the probe and an internal amplification control (probe with a HEX reporter and non fluorescence quencher) for investigating possible inhibiting effects.

8 reaction vials (red marking) contain additionally Yersinia enterocolitica DNA.

Time required:	enrichment.....	approx. 24 h
	extraction.....	25 min
(10 samples)	PCR setup.....	15 min
	PCR.....	2 h

PCRFast[®]
ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

PCRFast[®]
is a registered trademark of ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp also offers contract analyses.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

1. Principle of the test

PCRFast[®] *Yersinia enterocolitica* is a simple, molecular biological test (PCR) for detecting *Yersinia enterocolitica* (human pathogen serotypes 0:3, 0:5, 0:6, 0:8, 0:9, 0:5:27) after enrichment from foodstuffs and for the identification of colonies (detection of the ail gene). The analytical procedure described here complies with the international standards (ISO) for PCR analysis and the § 64 of the German Foodstuffs and Animal Feed Code (LFGB).

All the reaction vials contain for the PCR reaction necessary specific primers and probe in an optimum amount and an **internal amplification control**². The **red - coloured reaction vials** contain additionally *Yersinia enterocolitica* - DNA.

12.5 µl of double concentrated MasterMix and, subsequently, **12.5 µl of the extracted DNA sample** is added into the reaction vial. The MasterMix contains an optimum concentration of polymerase, nucleotides and magnesium chloride. The target sequence is then amplified in a PCR thermocycler. If the target is present the probe hybridises on the built up DNA fragments. Thereby the reporter (Fam/HEX) and the quencher (non fluorescence) of the probe will be separated and the reporter radiates a fluorescence signal (Fam: 520 nm, HEX: 553 nm). The intensity of the signal increases with the amount of synthesised DNA which could be measured and displayed. If the target sequence is not present no increase in the fluorescence is detectable.

2. Package contents

The test kit contains:

- 11 x **strips (colourless)** with eight 0.2 ml reaction vials (88 reaction vials), each coated with specific primers, probe and internal amplification control.
- 1 x **strips (red)** with eight 0.2 ml reaction vials (8 reaction vials), each coated with specific primers, probe, internal amplification control and additionally *Yersinia enterocolitica* - DNA.

² see page 25, chapter 12

3. Additionally required instruments and reagents

Lab material and instruments

- homogenizer (Stomacher)
- stomacher bag, sterile
- measuring cylinder, sterile
- erlenmeyer flask, sterile
- culture tube, sterile
- 28 °C - 30 °C (82 °F - 86 °F) incubator
- vortexer
- biocentrifuge, min. 14,000 x g (for 1.5 ml and 2.0 ml reaction vials)
- PCR thermocycler:**
 - e.g. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P
- microliter pipettes 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl, e.g. Gilson Pipetman P with filter tips
- 1.5 ml or 2.0 ml reaction vials

Reagents

Enrichment

- Brain - Heart - Infusion (Fluka) or
- Trypticase Soy Broth (TSB)
- agar plate for plating enrichment

DNA extraction

- ethanol > 95 % (denatured)
- 0.1 x TE - buffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0.1 mmol / l)
- water deionised, DNA free
- DNA - Extraction kit, e. g. PCRFast[®] Microbe Extraction

PCR

Realtime

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended),
e. g. AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix, Applied Biosystems No. 4318739;
Brilliant[®] II QPCR MasterMix, Stratagene No. 600828; QuantiTect Probe
PCR Kit, Qiagen No. 204343

4. Precautions

- all tasks should be performed taking all precautions common in labs, and all PCR tasks should be performed in accordance with the CEN / ISO recommendations
- to avoid carryovers, perform all work wearing protective gloves and use filter tips
- perform sample preparation, PCR setup and detection in separate rooms
- all materials and media possibly containing *Yersinia enterocolitica* should be autoclaved (20 minutes 120 °C (248 °F))

5. Storage instructions

Store the test kit and the reaction vials at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F).

6. Sample enrichment and DNA isolation

6.1. Enrichment

The absence of *Yersinia enterocolitica* is analysed by means of an enrichment e. g. in a Brain - Heart - Infusion. A foodstuff sample is weighed in a sterile stomacher bag, diluted at a ratio of 1 : 10 (w / v) with Brain - Heart - Infusion and incubated at 28 °C (82.4 °F) to 30 °C (86 °F) for 24 h (e. g. 25 g samples + 225 ml Brain - Heart - Infusion).

6.2. DNA isolation

The DNA isolation can be done by conventional extraction systems (e. g. PCRFast[®] Microbe Extraction).

After the extraction the eluate has to be diluted with a ratio of 1 : 10 with 0.1 x TE - buffer and can be used for the PCRFast[®] reaction (e.g. 10 µl eluate + 90 µl 0.1 x TE - buffer).

6.3. Confirming suspect colonies

To confirm suspect colonies on solid culture medium, it is sufficient to pick up this colonies with a loop and to slurry it in 0.2 ml of 0.1 x TE - buffer in a reaction vial and heat it at 95 °C (203 °F) for 10 min. The sample is then cooled and centrifuged at 14000 x g for 5 min. The supernatant can be used directly for PCRFast®.

7. PCR setup

7.1. Preparations

- remove strip from the plastic bag and separate required number of reaction vials
- place the remaining strips / reaction vials and the desiccant back into the bag, seal bag and store at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F)
- have the required amount of MasterMix at hand (12.5 µl per reaction)

7.2. Procedure

- pipette the following volumes into the reaction vials:

per sample	reaction vial	MasterMix	DNA from sample
sample	colourless	12.5 µl	12.5 µl

Tab. 1: PCRFast® Yersinia enterocolitica pipetting steps

- close the reaction vials (centrifuging recommended) and place them into the PCR thermocycler.
- recommended control reactions see page 25, chapter 12 “annex”**

7.3. Instrument settings

Reporter: Fam and HEX
Quencher: non fluorescence
Reference dye: ROX (depending on used master mix)

Perform amplification according to the following temperature / cycler profile:

Cycle profile

10 min	95 °C (203 °F)	
30 sec	95 °C (203 °F)	
30 sec	55 °C (131 °F)	45 cycles
30 sec	72 °C (161.6 °F)	

Note:

Validation was performed using Brilliant® II QPCR MasterMix by Stratagene and the thermocyclers specified in section 3. The specified cycler profile may need to be adjusted to the respective instrument and the MasterMix.

7.4. Detection

- assessment of the amplification in realtime is done via the amplification plot
- in principle the evaluation should be done using the software of the real-time thermocycler. Are the results not satisfactory using the instrument presettings, the “threshold” and the “baseline” settings could be changed

8. Evaluation

The following table summarizes the evaluation. With a positive sample the final point of the fluorescence curve lies clearly above the threshold.

8.1. Evaluation matrix

internal amplification control	Sample	Result
+	+	sample positive
+	-	sample negative
-	-	inhibition*

* dilute extracted sample DNA once more and amplify again

Tab. 2: Evaluation of PCRFast® *Yersinia enterocolitica*

- + = amplification
- = non amplification

8.2. Examples of amplification plot evaluation

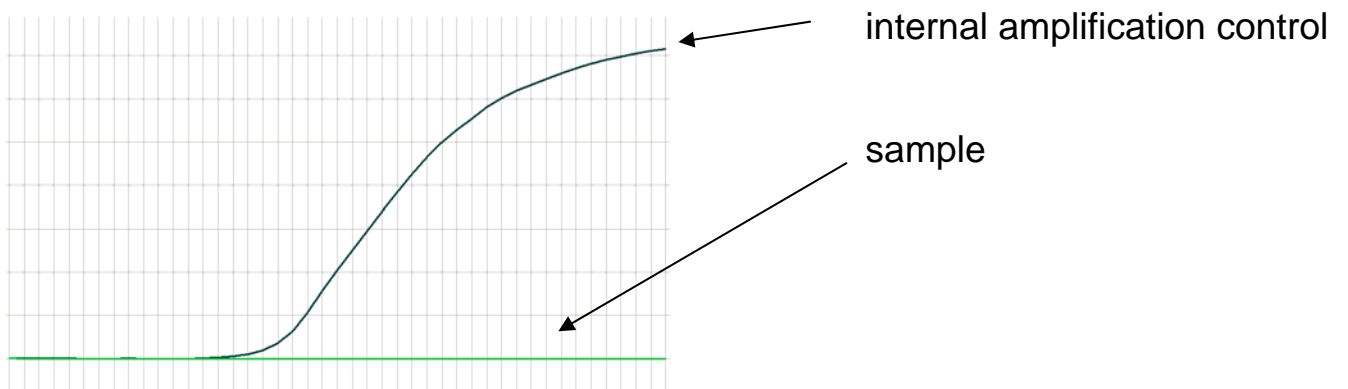


Fig. 1: sample negative; sample without amplification plot

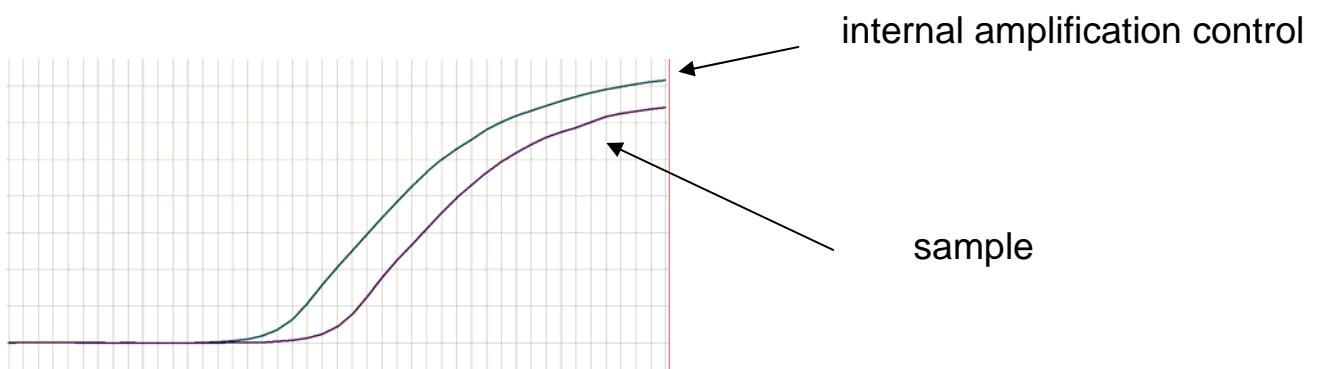


Fig. 2: sample positive

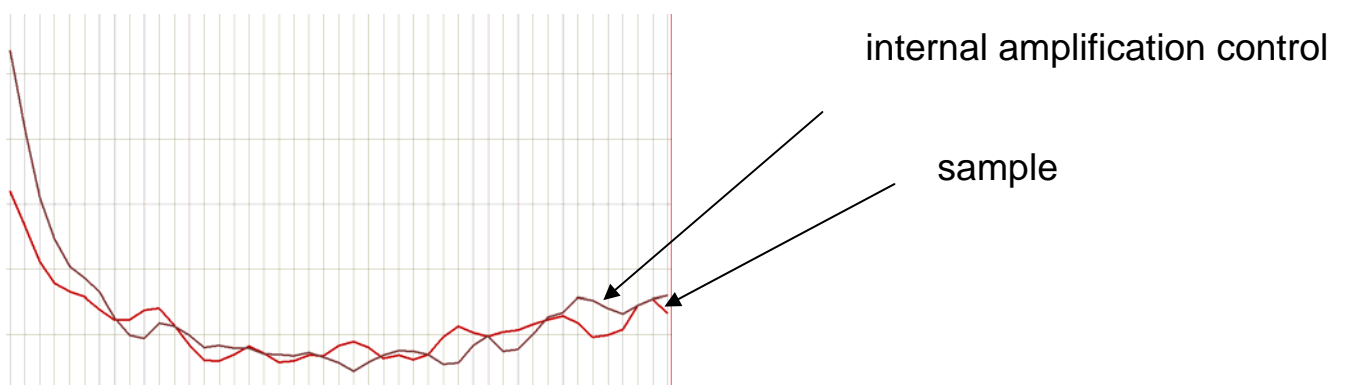


Fig. 3: reaction inhibition, further diluting the isolated DNA

9. Sensitivity

Limit of detection: 1 *Yersinia enterocolitica* in 25 g sample.

10. Specificity

PCRFast[®] *Yersinia enterocolitica* is 100% specific. The following species have each been tested for cross-reactivity with at least 2500 copies:

Species		Species		Species	
<i>Yersinia enterocolitica</i> (serotype 0:3)	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> (serotype 0:5)	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> (serotype 0:6)	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> (serotype 0:8)	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> (serotype 0:9)	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> (serotype 0:5:27)	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> non human pathogen	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Salmonella</i> spp.	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Enterobacteriaceae STX 1	-	Enterobacteriaceae STX 2	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-

Tab. 3: Specificity of PCRFast[®] *Yersinia enterocolitica*

+ amplification

- non amplification

Should you have any questions on how to conduct this test, on sample preparations or on PCR analysis in general, please contact the Competence Centre for DNA Analysis of ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com

Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0

Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50



You will also find more information on conducting PCRFast[®] at www.produktqualitaet.com.

These specifications are based on our current state of knowledge and are designed to provide information about our products and their potential applications. They are not intended to guarantee certain product properties or suitability for a specific application. ifp does not accept any liability except for the standard quality of the reagents. Replacement will be provided for any defective products. ifp is not liable for any other claims concerning direct or indirect damage or costs arising from the use of the products.

11. References

ISO 22174

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - General requirements and definitions

ISO 20837

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for sample preparation and qualitative detection

ISO 20838

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods

Nakajima H., Inoue M., Mori T, Itoh K.I., Arakawa E., Watanabe H.

“Detection and Identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an Improved Polymerase Chain Reaction Method” J Clin Microbiol, (1992), 30, No. 9, 2484-2486

12. Annex

For a good laboratory practice the following controls are recommended

Internal amplification control (included in each reaction vial)

All PCRFast[®] reaction vials contain control DNA for investigating possible inhibitory effects

Controls on a regularly base

Negative PCR control (colourless reaction vial)

Instead of DNA - extract 0.1 x TE - buffer should be used to check the MasterMix for contamination

Recommendation: Should be run with each analysis run

Positive PCR control (red marked reaction vial)

Reaction vial containing positive DNA for checking the functionality of the MasterMix

Recommendation: Should be run with each analysis run.

Negative extraction control (colourless reaction vial)

Control, treated like a sample during extraction and PCR (blank value of extraction reagents). The sample is substituted with the same amount of water.

Recommendation: Should be run with each extraction procedure.

Recommended additionally controls

Negative process control (colourless reaction vial)

Sample of a matrix not containing the analyte treated like an unknown sample. The control is used for checking all materials and reagents for contamination.

Positive process control (colourless reaction vial)

Sample of a matrix containing the analyte, e.g. reference material or spiked negative sample, treated like an unknown sample. The control is used for checking the functionality of the extraction process.

per analysis run	reaction vial	MasterMix	0,1 x TE - buffer
negative PCR - control	colourless	12,5 µl	12,5 µl
positive PCR - control	red marked	12,5 µl	12,5 µl
per extraction series	reaction vial	MasterMix	extraction
negative extraction control	colourless	12,5 µl	12,5 µl
negative process control	colourless	12,5 µl	12,5 µl
positive process control	colourless	12,5 µl	12,5 µl

Tab. 4: PCRFast® Control pipetting steps

internal ampli- fication control	+	+	+	+	+
negative PCR control	-				
positive PCR control		+			
negative extraction control			-		
negative process control				-	
positive process control					+
results	MasterMix not contami- nated	MasterMix functional	reagents of DNA extrac- tion not con- taminated	analyse functional	analyse functional

Tab 5: Evaluation of controls

+ = amplification

- = non amplification