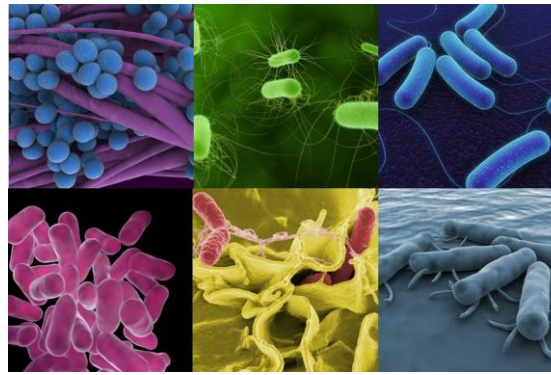
CONGEN

SureFast® Yersinia 3plex

Art. No. F5132
100 rxn

User Manual



December 2025

SureFast® Yersinia 3plex (100 rxn)

Art. Nr. F5132

Dezember 2025

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 9
4 Weitere Informationen 9
4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel 9
4.2 Technischer Support 9

Content

1 General Information 10
1.1 Description 10
1.2 Limit of Detection 10
1.3 DNA-preparation 11
1.4 Kit components and storage 11
1.5 Additionally required equipment and materials 11
1.6 Precautions for users 11
1.7 Setup 12
1.8 Detection channel Set-up 12
2 Qualitative Analysis 13
2.1 Protocol 13
2.1.1 Preparation of the master-mix 13
2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix 13
2.2 Interpretation of results 14
3 Limitations of the method 16
4 Further Information 16
4.1 Product Information 16
4.2 Technical Support 16

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® Yersinia 3plex ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung spezifischer DNA-Sequenzen der *ail*-Gene von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* in Anreicherungen von Lebensmitteln.

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 vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystems 7500, Qiagen Rotor-Gene Q sowie am R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Yersinia 3plex 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 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021) 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 DIN CEN ISO 18867 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 vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm und 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Inkubator
- Anreicherungsmedium
- 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.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

1.7 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LightCycler® 480 II
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 Detektionskanaleinstellungen

Für zusätzliche Informationen wird auf die jeweilige Cycler-Bedienungsanleitung verwiesen.

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions-kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	*Y. pseudotuberculosis*	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Y. enterocolitica	Cy5	+	
Agilent AriaDx /Mx	*Y. pseudotuberculosis*	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Y. enterocolitica	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	*Y. pseudotuberculosis*	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
	Y. enterocolitica	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/ Opus	*Y. pseudotuberculosis*	FAM	+	Baseline Einstellungen: • Baseline substracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
	Y. enterocolitica	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	*Y. pseudotuberculosis*	green	+	**Ignore cycles before**, wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungs-anleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	IAC	yellow	+	
	Y. enterocolitica	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	*Y. pseudotuberculosis*	green		Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	IAC	yellow		
	Y. enterocolitica	red		
Roche LightCycler® 480 II	*Y. pseudotuberculosis*	465-510		
	IAC	533-580		
	Y. enterocolitica	618-660		

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 Positive Control.

Bei Analysen von Anreicherungen werden zusätzlich weitere Kontrollen empfohlen: Nullkontrolle und Mediumkontrolle.

Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen *Y. pseudotuberculosis*- und *Y. enterocolitica*-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 *Y. pseudotuberculosis*- und *Y. enterocolitica*-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.

*** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – Komponenten aus verwendeten Prep Kit
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigefügte Positive Control
- Nullkontrolle: Master-Mix und Probe vor Anreicherung
- Mediumkontrolle: nur Medium – keine Probe

2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle.
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und 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 *Y. pseudotuberculosis* und im Cy5-Kanal der Parameter *Y. enterocolitica* detektiert (siehe Tabelle). Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle führen.

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

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

Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal keine Amplifikation oder keinen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigen, weist dies auf das mögliche Vorhandensein von PCR Inhibitoren in der Probe hin. In diesem Fall muss die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Es wird empfohlen den Extraktionsprozess zu wiederholen. 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 mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal			**Interpretation**
FAM-Kanal *Y. pseudotuberculosis*	Cy5-Kanal *Y. enterocolitica*	VIC/HEX-Kanal IAC	
positiv	negativ	**positiv/negativ**	*Y. pseudotuberculosis*-DNA nachweisbar
negativ	**positiv**	**positiv/negativ**	*Y. enterocolitica*-DNA nachweisbar
positiv	**positiv**	**positiv/negativ**	*Y. pseudotuberculosis*- und *Y. enterocolitica*-DNA nachweisbar
negativ	negativ	**positiv**	Negativ, Ziel-DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen

	Spezifikationsbereich	**Interne Amplifikationskontrolle (IAC)**
Negativkontrolle	negativ	28 ≤ Cp ≤ 36
Positive Control (FAM – *Y. pseudotuberculosis*)	25 ≤ Cp ≤ 33	nicht relevant
Positive Control (Cy5 – *Y. enterocolitica*)	25 ≤ Cp ≤ 33	nicht relevant

3 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.
- Bei stark prozessierten Proben kann es zu einer Verschiebung der Nachweisgrenze kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanischen Belastungen, chemische Behandlung, extreme Temperaturen und/oder extreme pH-Werte während des Verarbeitungsprozesses– wie z B. bei der Konservenherstellung – können Nukleinsäuren beschädigen oder abbauen. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Testkits verringert sein kann und möglicherweise nicht alle ursprünglichen Bestandteile erfasst werden.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Es deutet darauf hin, dass die Ziel DNA (*Yersinia pseudotuberculosis*- und *Yersinia enterocolitica*-DNA) vorhanden ist.
- Das Nachweisverfahren *Yersinia pseudotuberculosis* weist Querempfindlichkeiten zu *Yersinia pestis* auf.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/download)
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: www.congen.de/eifu/)
- Validierungsreport 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® Yersinia 3plex is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific *ail* gene DNA sequences of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* for enriched food.

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. 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 four fluorescence emissions at the channels FAM, VIC/HEX and Cy5 at the same time. The internal technical verification of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystems 7500, Qiagen Rotor-Gene Q and R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Yersinia 3plex 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 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021) 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 DIN CEN ISO 18867 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 four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- incubator
- enrichment broth
- microcentrifuge 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 and disposed according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used must be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

1.7 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LightCycler® 480 II
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

For additional details see cycler operating instructions for real-time PCR device.

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	*Y. pseudotuberculosis*	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Y. enterocolitica	Cy5	+	
Agilent AriaDx /Mx	*Y. pseudotuberculosis*	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Y. enterocolitica	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	*Y. pseudotuberculosis*	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
	Y. enterocolitica	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/ Opus	*Y. pseudotuberculosis*	FAM	+	Baseline Settings: • Baseline substracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
	Y. enterocolitica	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	*Y. pseudotuberculosis*	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 cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	IAC	yellow	+	
	Y. enterocolitica	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	*Y. pseudotuberculosis*	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	+	
	Y. enterocolitica	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	*Y. pseudotuberculosis*	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
	Y. enterocolitica	618-660	+	

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 and Positive Control.

For the analysis of enrichments additional controls are recommended: zero control and medium control.

The reaction mix contains an internal amplification control (inhibition control) per reaction.

Reactions needed for the qualitative *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* 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 *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* 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.

*** Description of the controls**

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – components from used Prep Kit
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control
- Zero control: master-mix and sample prior enrichment
- Medium control: only medium – no sample

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.
- 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.

Y. pseudotuberculosis DNA is detected in the FAM-channel and *Y. enterocolitica* DNA is detected in the Cy5-channel (see table). In the VIC/HEX-channel the amplification control is detected.

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control.

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

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

If the sample DNA shows no amplification or sigmoidal amplification curve in the VIC/HEX channel, this indicates that inhibitors are present in the sample DNA that inhibit the PCR. Under these circumstances DNA isolation and purification of the sample need to be improved. It is recommended to repeat the extraction process. 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 PCR assay.

Result in the respective channel			Interpretation
FAM channel *Y. pseudotuberculosis*	Cy5 channel *Y. enterocolitica*	VIC/HEX channel IAC	
positive	negative	**positive/negative**	*Y. pseudotuberculosis* DNA detected
negative	**positive**	**positive/negative**	*Y. enterocolitica* DNA detected
positive	**positive**	**positive/negative**	*Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* DNA detected
negative	negative	**positive**	negative, target DNA is not detected
negative	negative	negative	invalid

The following table shows the specification ranges of the kit controls

	Specification range	Internal amplification control (IAC)
negative control	negative	28 ≤ Cp ≤ 36
Positive Control (FAM – *Y. pseudotuberculosis*)	25 ≤ Cp ≤ 33	not relevant
Positive Control (Cy5 – *Y. enterocolitica*)	25 ≤ Cp ≤ 33	not relevant

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremly low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- In highly processed samples, the limit of detection may be shifted. Factors such as high pressures, mechanical stresses, chemical treatment, extreme temperatures and/or extreme pH values during manufacturing process – such as in canning production – can damage or degrade nucleic acids. This means that the sensitivity of the test kit may be reduced and not all original components may be detected.
- A positive test result does not necessary indicate the presence of viable organism. It is indicative for the presence of the target DNA (*Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* DNA).
- The detection system of *Yersinia pseudotuberculosis* shows a cross reactivity to *Yersinia pestis*.

4 Further Information

4.1 Product Information

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

4.2 Technical Support

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