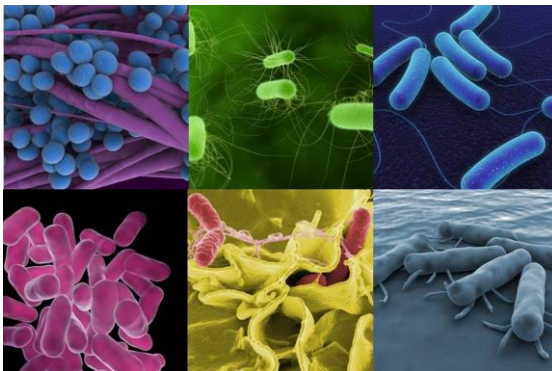


CONGEN

SureFast[®]
STEC 4plex ONE

Art. No. F5265
100 rxn

User Manual



August 2023

 **Inhalt**

| | | |
|-------|--|---|
| 1 | Allgemeines | 3 |
| 1.1 | Beschreibung | 3 |
| 1.2 | Nachweisgrenze | 3 |
| 1.3 | Kit-Inhalt und Lagerung | 4 |
| 1.4 | Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien | 4 |
| 1.5 | Geräteeinstellungen | 4 |
| 1.6 | Detektionskanaleinstellungen | 5 |
| 2 | Qualitative Analyse | 6 |
| 2.1 | Protokoll | 6 |
| 2.1.1 | Kulturelle Anreicherung | 6 |
| 2.1.2 | DNA-Präparation | 6 |
| 2.1.3 | Herstellen des Master-Mix | 7 |
| 2.1.4 | Herstellen des real-time PCR-Mix | 7 |
| 2.2 | Interpretation der Ergebnisse | 8 |
| 3 | Weitere Informationen | 9 |
| 3.1 | Weitere Dokumente und Hilfsmittel | 9 |



Content

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | General Information | 10 |
| 1.1 | Description | 10 |
| 1.2 | Limit of Detection | 10 |
| 1.3 | Kit components and storage | 11 |
| 1.4 | Additionally required equipment and materials | 11 |
| 1.5 | Setup | 11 |
| 1.6 | Detection channel Set-up | 12 |
| 2 | Qualitative Analysis | 13 |
| 2.1 | Protocol | 13 |
| 2.1.1 | Cultural Enrichment | 13 |
| 2.1.2 | DNA-preparation | 13 |
| 2.1.3 | Preparation of the master-mix | 14 |
| 2.1.4 | Preparation of the real-time PCR-mix | 14 |
| 2.2 | Interpretation of results | 15 |
| 3 | Further Information | 16 |
| 3.1 | Product Information | 16 |
| 3.2 | Technical Support | 16 |

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Das SureFast® STEC 4plex ONE dient der einfachen und zeitsparenden Extraktion und Detektion und Differenzierung von spezifischen DNA-Sequenzen der *Escherichia coli* Virulenzfaktoren *stx1* (Subtyp a-d), *stx2* (Subtyp a-g) und *eae* sowie des *Escherichia coli* Serotyp O157 in verschiedenen Lebensmitteln.

Die Methode setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen: 1) kulturelle Anreicherung, 2) DNA-Präparation, 3) real-time PCR und 4) Interpretation der Ergebnisse.

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, ROX und Cy5, detektieren können, verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Qiagen Rotor-Gene Q sowie am Bio Molecular Systems MIC.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® STEC 4plex 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 1100 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 –20°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 -20 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 vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 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)
- Anreicherungsflüssigkeit (z.B. modifizierte Trypton-Soja Bouillon (mTSB) + Novobiocin)

1.5 Geräteeinstellungen

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

1.6 Detektionskanaleinstellungen

| Real-time PCR Gerät | Nachweis | Detektionskanal | Quencher | Bemerkung |
|------------------------------------|--------------------------|-----------------|----------|--|
| Agilent Mx3005P | <i>E. coli stx1/stx2</i> | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | ROX | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | Cy5 | + | |
| Agilent AriaDx | <i>E. coli stx1/stx2</i> | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | ROX | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | Cy5 | + | |
| Applied Biosystems 7500 | <i>E. coli stx1/stx2</i> | FAM | None | Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none. |
| | IAC | HEX | None | |
| | <i>E. coli</i> O157 | ROX | None | |
| | <i>E. coli eae</i> | Cy5 | None | |
| Bio-Rad CFX96 | <i>E. coli stx1/stx2</i> | FAM | + | |
| | IAC | VIC/HEX | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | ROX | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | Cy5 | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | <i>E. coli stx1/stx2</i> | green | + | |
| | IAC | yellow | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | orange | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | red | + | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | <i>E. coli stx1/stx2</i> | green | + | Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein. |
| | IAC | yellow | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | orange | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | red | + | |
| Roche LightCycler® 480 II | <i>E. coli stx1/stx2</i> | 465-510 | + | Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt. |
| | IAC | 533-580 | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | 533-610 | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | 618-660 | + | |
| Roche cobas® z 480 Analyzer | <i>E. coli stx1/stx2</i> | 465-510 | + | Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt. |
| | IAC | 540-580 | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | 540-610 | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | 610-670 | + | |

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 13136. Zur Vorbereitung der Anreicherung werden 25 g- bzw. 25 ml Probemenge in 225 ml einer nicht-selektiven Anreicherungsflüssigkeit (z.B. modifizierte Trypton-Soja Bouillon (mTSB) + Novobiocin) 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 $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für 18 h - 24 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 Cp-Wert Differenz von > 3).

2.1.2 DNA-Präparation

Wenn die Anreicherungskultur geschüttelt oder durchmischt wurde, soll diese für 5 bis 10 min sedimentieren.

Aus dem oberen Drittel der Anreicherungskultur 200 µl entnehmen und in ein 2,0 ml Tube überführen (nicht im Kit enthalten). Dann 500 µL Lysis Buffer (**Code L**) zu den 200 µl der Anreicherungskultur 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. Falls die Partikel nicht sedimentieren, sollte das Lysat für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert werden. Im Anschluss 100 µL des Überstandes in ein neues Tube (nicht im Kit enthalten) überführen.

Das Lysat kann direkt in der PCR eingesetzt werden. Wird das Lysat nicht innerhalb von 4 Stunden 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 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 STEC-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 STEC-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.

2.1.4 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 *Escherichia coli stx1/stx2*, im ROX-Kanal der Parameter *Escherichia coli* O157 und im Cy5-Kanal der Parameter *Escherichia coli eae* 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 (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 jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen 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 *Escherichia coli stx1/stx2*, *Escherichia coli* O157 oder *Escherichia coli eae* mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

| Ergebnis im jeweiligen Kanal | | | | |
|--|--|--|------------------------|---|
| FAM-Kanal <i>Escherichia coli</i> <i>stx1/stx2</i> | ROX-Kanal <i>Escherichia coli</i> O157 | Cy5-Kanal <i>Escherichia coli</i> <i>eae</i> | VIC/HEX-Kanal IAC | Interpretation |
| positiv | negativ | negativ | positiv/negativ | <i>Escherichia coli stx1/stx2</i> -DNA nachweisbar |
| positiv | positiv | negativ | positiv/negativ | <i>Escherichia coli</i> O157-DNA nachweisbar |
| negativ | negativ | positiv | positiv/negativ | <i>Escherichia coli eae</i> -DNA nachweisbar |
| negativ | negativ | negativ | positiv | Negativ, <i>Escherichia coli stx1/stx2</i> , O157, <i>eae</i> – DNA ist nicht nachweisbar |
| negativ | negativ | negativ | negativ | nicht auswertbar |

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

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

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an info@congen.de.

1 General Information

1.1 Description

The SureFast® STEC 4plex ONE can be applied for the fast and simple isolation, detection and differentiation of specific DNA sequences of the *Escherichia coli* virulence factors *stx1* (subtype a-d), *stx2* (subtype a-g), *eae* and the *Escherichia coli* serotype O157 in different types of food.

The method consists of the following three steps: 1) cultural enrichment, 2) DNA-preparation, 3) specific real-time PCR detection and 4) interpretation of results.

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, ROX und Cy5 at the same time. The technical verification of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Qiagen Rotor-Gene Q and Bio Molecular Systems MIC.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® STEC 4plex 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 1100 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 –20°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 -20 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 four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, 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)
- enrichment broth (e. g. modified tryptone soy broth (mTSB) with Novobiocin)

1.5 Setup

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

1.6 Detection channel Set-up

| Real-time PCR device | Detection | Detection channel | Quencher | Note |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------|----------|--|
| Agilent Mx3005P | <i>E. coli stx1/stx2</i> | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | ROX | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | Cy5 | + | |
| Agilent AriaDx | <i>E. coli stx1/stx2</i> | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | ROX | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | Cy5 | + | |
| Applied Biosystems 7500 | <i>E. coli stx1/stx2</i> | FAM | None | Check the passive reference option ROX is none. |
| | IAC | HEX | None | |
| | <i>E. coli</i> O157 | ROX | None | |
| | <i>E. coli eae</i> | Cy5 | None | |
| Bio-Rad CFX96 | <i>E. coli stx1/stx2</i> | FAM | + | |
| | IAC | VIC/HEX | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | ROX | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | Cy5 | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | <i>E. coli stx1/stx2</i> | green | + | |
| | IAC | yellow | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | orange | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | red | + | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | <i>E. coli stx1/stx2</i> | 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 | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | orange | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | red | + | |
| Roche LightCycler® 480 II | <i>E. coli stx1/stx2</i> | 465-510 | + | The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required. |
| | IAC | 533-580 | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | 533-610 | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | 618-660 | + | |
| Roche cobas® z 480 Analyzer | <i>E. coli stx1/stx2</i> | 465-510 | + | The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required. |
| | IAC | 540-580 | + | |
| | <i>E. coli</i> O157 | 540-610 | + | |
| | <i>E. coli eae</i> | 610-670 | + | |

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 13136 standards. For enrichment, a volume of 25 g or 25 ml sample material is homogenized with 225 ml of an enrichment broth (e. g. modified tryptone soy broth (mTSB) with Novobiocin). 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 - 24 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 200 µl of the upper third from the enrichment culture into a 2.0 ml tube (not provided with the kit) and add 500 µl of Lysis Buffer (**Code L**) to this sample.

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

Incubate for 10 minutes at 95 °C without shaking.

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

Note: It is necessary to ensure that the sediment is not stirred up and no particles are pipetted in the PCR reaction. If the particles do not sediment, the lysate should be centrifuged for 1 minute at 12.000 rpm. Afterwards transfer 100 µl of the supernatant into a new tube (not provided with the kit).

The lysate is ready-to-use for PCR. If the lysate is not used within four hours 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, 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 STEC detection:

3 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1x positive control)

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

Reactions needed for the qualitative STEC detection in enrichments:

5 reactions for controls (1x no-template 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 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.

Escherichia coli stx1/stx2 DNA is detected in the FAM-channel, *Escherichia coli* O157 DNA is detected in the ROX-channel and *Escherichia coli eae* 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 (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 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** 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 *Escherichia coli stx1/stx2*, *Escherichia coli* O157 or *Escherichia coli eae* PCR assay.

| Result in the respective channel | | | | Interpretation |
|--|---|--|--------------------------|--|
| FAM channel <i>Escherichia coli stx1/stx2</i> | ROX channel <i>Escherichia coli</i> O157 | Cy5 channel <i>Escherichia coli eae</i> | VIC/HEX channel IAC | |
| positive | negative | negative | positive/negative | <i>Escherichia coli stx1/stx2</i> DNA detected |
| positive | positive | negative | positive/negative | <i>Escherichia coli</i> O157 DNA detected |
| negative | negative | positive | positive/negative | <i>Escherichia coli eae</i> DNA detected |
| negative | negative | negative | positive | Negative, <i>Escherichia coli stx1/stx2</i> , O157, <i>eae</i> – DNA is not detected |
| negative | negative | negative | negative | invalid |

3 Further Information

3.1 Product Information

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

3.2 Technical Support

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