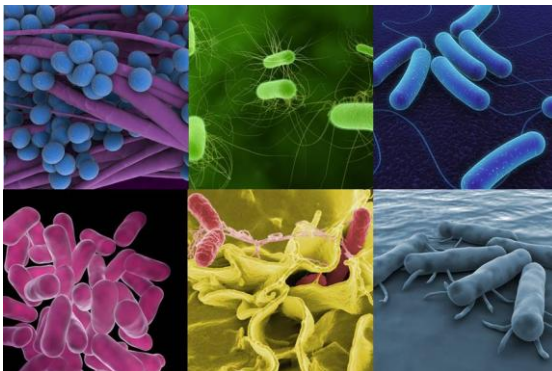


CONGEN

SureFast® STEC 4plex ONE

Art. No. F5265
100 rxn

User Manual



September 2025

 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	Vorsichtsmaßnahmen	4
1.6	Geräteeinstellungen	5
1.7	Detektionskanaleinstellungen	5
2	Qualitative Analyse	7
2.1	Protokoll	7
2.1.1	Kulturelle Anreicherung	7
2.1.2	DNA-Präparation	7
2.1.3	Herstellen des Master-Mix	8
2.1.4	Herstellen des real-time PCR-Mix	8
2.2	Interpretation der Ergebnisse	9
3	Grenzen der Methode	10
4	Weitere Informationen	10
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	10
4.2	Technischer Support	10



Content

1	General Information	11
1.1	Description	11
1.2	Limit of Detection	11
1.3	Kit components and storage	12
1.4	Additionally required equipment and materials	12
1.5	Precautions for users	12
1.6	Setup.....	13
1.7	Detection channel Set-up	13
2	Qualitative Analysis	15
2.1	Protocol	15
2.1.1	Cultural Enrichment	15
2.1.2	DNA-preparation.....	15
2.1.3	Preparation of the master-mix	16
2.1.4	Preparation of the real-time PCR-mix	16
2.2	Interpretation of results	17
3	Limitations of the method	18
4	Further Information	18
4.1	Product Information	18
4.2	Technical Support	18

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Das SureFast® STEC 4plex ONE dient der einfachen und zeitsparenden Extraktion und Detektion 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 und eignet sich zur Anwendung in der Diagnostik von Laboratorien für Lebensmittelanalytik.

Die Methode setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen: 1) kulturelle Anreicherung, 2) DNA-Präparation siehe 2.1.2 DNA Präparation, 3) spezifische real-time PCR und 4) Interpretation der Ergebnisse.

Schritt 2) Die DNA-Präparation kann ebenfalls mit SureFast® PREP Bacteria (F1021) erfolgen.

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 interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent AriaDx, Agilent Mx3005P, Bio-Rad CFX96, Applied Biosystems 7500, Bio Molecular Systems MIC, Qiagen Rotor-Gene Q, Roche cobas® z 480 Analyzer und Roche LightCycler® 480 II.

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 1050 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau
L	Lysis Buffer	2 x 25 ml	Klar

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.

Der Lysis Buffer soll bei -28 bis +8°C gelagert werden. Die Reagenzien können bis zum Erreichen des auf den Etiketten aufgedruckten Haltbarkeitsdatums verwendet werden.

Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.

1.4 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm)
- DNA-Extraktionskit SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021), optional
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Inkubator
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- 2 ml Reaktionsgefäße
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße
- Thermomixer/Heizblock (bis 95°C)
- Anreicherungsmedium (z.B. modifizierte Trypton-Soja Bouillon (mTSB) + Novobiocin)
- Autoklav
- Sicherheitswerkbank

1.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Lebensmittelproben und Anreicherungskulturen müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Inhalt gemäß der örtlichen, regionalen, nationalen und/oder internationalen Vorschriften bei einer Sammelstelle für gefährliche Abfälle oder Sondermüll entsorgen.

1.6 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

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	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 / Mx	<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	VIC	None	
	<i>E. coli</i> O157	ROX	None	
	<i>E. coli eae</i>	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	<i>E. coli stx1/stx2</i>	FAM	+	Baseline Einstellungen: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	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	+	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	+	
	<i>E. coli</i> O157	orange	+	
	<i>E. coli eae</i>	red	+	

SureFast® STEC 4plex ONE (100 rxn)

Art. Nr. F5265

September 2025

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
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 Lebensmitteln gelten die Vorgaben von ISO 6887 und ISO 13136. Zur Vorbereitung der Anreicherung werden 25 g bzw. 25 ml Probemenge in 225 ml einer 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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

Die DNA-Präparation kann mit den in diesem Kit enthaltenen Materialien gemäß dem untenstehenden Protokoll durchgeführt werden oder mit dem SureFast® PREP Bacteria (F1021) Kit (entsprechend den produktbegleitenden Unterlagen folgen).

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

500 µL Lysis Buffer (**Code L**) in ein 2,0 ml Tube (nicht im Kit enthalten) vorlegen.

Dann aus dem oberen Drittel der Anreicherungskultur 200 µl entnehmen und zu den 500 µl Lysis Buffer (**Code L**) geben.

Im Anschluss das Tube vortexen und in den Heizblock stellen.

Die Inkubation erfolgt bei 95°C für 10 min ohne Schütteln.

Das Tube aus dem Heizblock entnehmen und 1 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

Achtung: Bei der weiteren Verwendung des Lysates muss beachtet werden, dass das Sediment nicht aufgewirbelt wird und keine Partikel in den PCR Ansatz pipettiert werden. 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 direkt in der PCR eingesetzt oder ist eine längere Lagerung vorgesehen, werden 100 µl des Überstandes in ein neues Tube (nicht im Kit enthalten) überführt und bei -20°C gelagert.

2.1.3 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen.

Folgende Kontrollen werden empfohlen: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und Positive Control.

Bei Analysen von Anreicherungen werden zusätzlich weitere Kontrollen empfohlen: Nullkontrolle 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 Positive Control)

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 Positive Control, 1x Nullkontrolle, 1x Mediumkontrolle)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.4 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle.
- 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.

*** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

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

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. 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 Nachweis-Kanal-Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der IAC führen.

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

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

Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal **keine Amplifikation** oder einen irregulären Kurvenverlauf 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				Interpretation
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	
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>Escherichia coli stx1/stx2</i> - DNA nachweisbar
negativ	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, Ziel DNA ist nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

Hinweis: Die in der obenstehenden Tabelle dargestellten Ergebnisse dienen lediglich als Beispiel. Darüber hinaus sind weitere Kombinationen möglich.

Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen

	Spezifikationsbereich	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Negativkontrolle	negativ	$28 \leq C_p \leq 36$
Positive Control (FAM – <i>Escherichia coli stx1/stx2</i>)	$25 \leq C_p \leq 33$	nicht relevant
Positive Control (ROX – <i>Escherichia coli</i> O157)	$25 \leq C_p \leq 33$	nicht relevant
Positive Control (Cy5 – <i>Escherichia coli eae</i>)	$25 \leq C_p \leq 33$	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 (*Escherichia coli stx1/stx2*, *Escherichia coli* O157 oder *Escherichia coli eae* DNA) vorhanden ist.

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/)
- Validation Report 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® STEC 4plex ONE can be applied for the fast and simple isolation and detection of specific DNA sequences of *Escherichia coli* virulence factors *stx1* (subtype a-d), *stx2* (subtype a-g), *eae* and the *Escherichia coli* serotype O157 in different types of food and is intended to be used by all kinds of food testing laboratories.

The method consists of the following four steps: 1) cultural enrichment, 2) DNA-preparation see 2.1.2 DNA-preparation, 3) specific real-time PCR detection and 4) interpretation of results. Step 2) DNA preparation can also be performed using SureFast® PREP Bacteria (F1021).

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 and Cy5 at the same time.

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

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 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue
L	Lysis Buffer	2 x 25 ml	Clear

Store all reagents at -28 to -16°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.

The Lysis Buffer should be stored at -28 to +8°C. Reagents should be used until the expiry date indicated on the label.

Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.

1.4 Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- DNA-Extraction kit SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021), optional
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- 2 ml tubes
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- centrifuge with a rotor for the reaction tubes
- Thermomixer/heating block (up to 95°C)
- enrichment broth (e.g. modified tryptone soy broth (mTSB) with Novobiocin)
- autoclave
- biological safety cabinet

1.5 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Food samples and enrichment cultures must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled and disposed according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.
- Dispose of contents to hazardous or special waste collection point, in accordance with local, regional, national and/or international regulation.

1.6 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

1.7 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 /Mx	<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	VIC	None	
	<i>E. coli</i> O157	ROX	None	
	<i>E. coli eae</i>	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	<i>E. coli stx1/stx2</i>	FAM	+	Baseline Settings: • Baseline subtracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	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	+	Ignore cycles before , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cyclor operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	IAC	yellow	+	
	<i>E. coli</i> O157	orange	+	
	<i>E. coli eae</i>	red	+	

SureFast® STEC 4plex ONE (100 rxn)

Art. No. F5265

September 2025

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
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 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

The DNA preparation can be conducted with the materials included in this kit following the protocol below or with SureFast® PREP Bacteria (F1021) Kit according to the kit instructions.

If the enrichment culture has been shaken or stirred, let the solids settle out for 5 to 10 min.

Transfer 500 µl of Lysis Buffer (**Code L**) into a 2.0 ml tube (not provided with the kit) and add 200 µl of the upper third from the enrichment to the 500 µl Lysis Buffer (**Code L**).

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 min.

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 immediately in the PCR or is intended for a longer storage, transfer 100 µl of the lysate in a new tube (not provided with the kit) and store at -20°C.

2.1.3 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay.

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 STEC 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 STEC detection in enrichments:

5 reactions for controls* (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control, 1x zero control, 1x medium control)

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

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10 % excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	20 µl	220 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2.1.4 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control.
- 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.

***Description of the controls**

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – use only Lysis Buffer
- 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

2.2 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. In the VIC/HEX-channel the internal amplification control (IAC) 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 IAC.

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

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

If the sample DNA in the VIC/HEX-Channel shows **no amplification** or an irregular amplification curve, 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
negative	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, target DNA is not detected
negative	negative	negative	negative	invalid

Note: The results displayed in the table above represent merely an example. Additional combinations are also possible.

The following table shows the specification ranges of the kit controls

	Specification range	Internal amplification control (IAC)
negative control	negative	$28 \leq C_p \leq 36$
Positive Control (FAM – <i>Escherichia coli stx1/stx2</i>)	$25 \leq C_p \leq 33$	not relevant
Positive Control (ROX – <i>Escherichia coli</i> O157)	$25 \leq C_p \leq 33$	not relevant
Positive Control (Cy5 – <i>Escherichia coli eae</i>)	$25 \leq C_p \leq 33$	not relevant

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- A positive test result does not necessary indicate the presence of viable organism. It is indicative for the presence of the target DNA (*Escherichia coli stx1/stx2*, *Escherichia coli* O157 or *Escherichia coli eae* DNA).
- 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.

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.