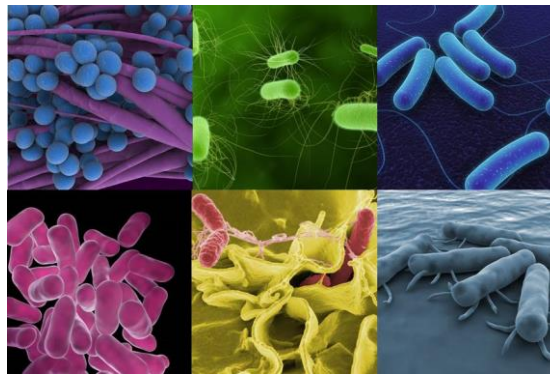
CONGEN

SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex

Art. No. F5168
100 rxn

User Manual

PERFORMANCE TESTED
AOAC
RESEARCH INSTITUTE
LICENSE NUMBER 052602



June 2026

SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex (100 rxn)

Art. Nr. F5168

Juni 2026

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 7
2.2 Interpretation der Ergebnisse 7
3 Validierung 9
4 Grenzen der Methode 9
5 Weitere Informationen 9
5.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel 9
5.2 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 14
2.2 Interpretation of results 14
3 Validation 16
4 Limitations of the method 16
5 Further Information 16
5.1 Product Information 16
5.2 Technical Support 16

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung spezifischer DNA-Sequenzen des *wzx*-Gens von *Escherichia coli* O45, des *wbdI*-Gens von *Escherichia coli* O111 und des *ihp1*-Gens von *Escherichia coli* O145 in Anreicherungen von Lebensmitteln. Zudem eignet es sich zur Anwendung in der Diagnostik von Laboratorien für Lebensmittelanalytik.

SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex wurde im Zusammenhang mit einer Extraktion mittels SureFast® STEC 4plex ONE (Art. Nr. F5265) bzw. SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021) durch die AOAC (PTM 052602) validiert und zertifiziert.

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 externe technische Gerätevalidierung erfolgte am Bio-Rad CFX96 Deep Well DX, Bio-Rad CFX96 Opus Deepwell und R-Biopharm RIDA®CYCLER.

Die interne technische Geräteverifizierung (nicht Teil der PTM Validierung) erfolgte am Roche LightCycler® 480 Instrument II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Agilent AriaDx und Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex 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), Speed PREP (Art. Nr. F1054) oder STEC 4plex ONE (Art. Nr. F5265) 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/TS 13136 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.

Die Reagenzien können bis zum Erreichen des auf den Etiketten aufgedruckten Haltbarkeitsdatums verwendet werden. Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal hat keinen Einfluss auf die PCR Effizienz.

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 / Speed PREP Art. Nr. F1054 / STEC 4plex ONE Art. Nr. F5265)
- 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, für Volumina von 0,7 µL – 1000 µL
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Inkubator
- Anreicherungsmedium (z.B. modifizierte Trypton-Soja Bouillon (mTSB) + Novobiocin)
- 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[1] & R-Biopharm RIDA®CYCLER[1]	**Rotorcycler[2] & LightCycler® 480 Instrument II[2]**
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[1]	*E. coli* O45	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	E. coli O111	ROX	+	
	E. coli O145	Cy5	+	
Agilent AriaDx /Mx[1]	*E. coli* O45	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	E. coli O111	ROX	+	
	E. coli O145	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500[1]	*E. coli* O45	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
	E. coli O111	ROX	None	
	E. coli O145	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus (incl. Deep Well)[1]	*E. coli* O45	FAM	+	Baseline Einstellungen: • Baseline substracted curve fit • Apply fluoresnce drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
	E. coli O111	ROX	+	
	E. coli O145	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER[1]	*E. coli* O45	green	+	**Ignore cycles before**, wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Bedienungsanleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	IAC	yellow	+	
	E. coli O111	orange	+	
	E. coli O145	red	+	
Roche LightCycler® 480 II[2]	*E. coli* O45	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	533-580	+	
	E. coli O111	533-610	+	
	E. coli O145	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer[2]	*E. coli* O45	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	540-580	+	
	E. coli O111	540-610	+	
	E. coli O145	610-670	+	

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 *E. coli* O45-, O111- und O145-Nachweis:

(z.B. bei Extraktion von nicht angereicherten Proben, wie gepickten Kolonien oder Abstrichtupfern - nicht Teil der PTM Validierung***** oder bei der vorherigen Verwendung von SureFast® STEC 4plex ONE, Art. Nr. F5265)

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 *E. coli* O45-, O111- und O145-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.

***** Nach DNA-Extraktion mittels SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021), entsprechend der Kit Anweisungen.

**** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – Komponenten aus dem 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.
- 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 *E. coli* O45, im ROX-Kanal der Parameter *E. coli* O111 und im Cy5-Kanal der Parameter *E. coli* O145 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 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 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. Bei Verwendung einer Schnellextraktion wird empfohlen das Lysat vor der PCR abzuzentrifugieren oder 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 für *E. coli* O45, O111 oder O145 mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal *E. coli* O45	ROX-Kanal *E. coli* O111	Cy5-Kanal *E. coli* O145	VIC/HEX-Kanal IAC	
positiv	negativ	negativ	**positiv/negativ**	*E. coli* O45-DNA nachweisbar
negativ	**positiv**	negativ	**positiv/negativ**	*E. coli* O111-DNA nachweisbar
negativ	negativ	**positiv**	**positiv/negativ**	*E. coli* O145-DNA nachweisbar
positiv	**positiv**	negativ	**positiv/negativ**	*E. coli* O45 und O111-DNA nachweisbar
positiv	**positiv**	**positiv**	**positiv/negativ**	*E. coli* O45, O111 und O145-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 ≤ Cp ≤ 36
Positive Control (FAM – *E. coli* O45)	25 ≤ Cp ≤ 33	nicht relevant
Positive Control (ROX – *E. coli* O111)	25 ≤ Cp ≤ 33	nicht relevant
Positive Control (Cy5 – *E. coli* O145)	25 ≤ Cp ≤ 33	nicht relevant

3 Validierung

Die externe Validierung von SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex erfolgte nach AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces und der ISO 16140-2:2016 [Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method].

In der Matrixstudie wurden die Referenzmethoden USDA Microbiological Laboratory Guidebook (MLG) 5C.04, "Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) from Meat Products, Carcass, and Environmental Sponges" (USDA/MLG 5C.04) für rohe Fleischmatrices und US FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) "Chapter 4A: Diarrheagenic Escherichia coli" (FDA BAM Ch. 4a) für alle anderen Matrices eingesetzt.

Das Kit wurde für die folgenden Matrices AOAC-RI validiert: rohes Rindfleisch, rohes Rinderhackfleisch, Babyspinat, Sprossen, Guacamole und Weizenmehl.

4 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 (*E. coli* O45, *E. coli* O111 oder *E. coli* O145-DNA) vorhanden ist.

5 Weitere Informationen

5.1 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/)
- AOAC Zertifikat (Download: www.congen.de/qualitaetsstandards/)
- Validation Report auf Anfrage

5.2 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® Escherichia coli Serotype II 4plex is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific *wzx* gene DNA sequences of *Escherichia coli* O45, *wbdI* gene DNA sequences of *Escherichia coli O111* and *ihp1* gene DNA sequences of *Escherichia coli* O145 in enriched food and is intended to be used by all kinds of food testing laboratories.

SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex has been validated and certified in the context of an extraction using SureFast® STEC 4plex ONE (Art. No. F5265) or SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021) by AOAC (PTM #052602).

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 external technical validation of instruments was performed on Bio-Rad CFX96 Deep Well DX, Bio-Rad CFX96 Opus Deepwell, and R-Biopharm RIDA®CYCLER.

The internal technical verification of instruments (not part of the PTM validation) was performed on Roche LightCycler® 480 Instrument II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex 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), Speed PREP (Art. No. F1054) or STEC 4plex ONE (Art. No. F5265) 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/TS 13136 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.

Reagents should be used until the expiration date indicated on the label. Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance.

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 / Speed PREP Art. No. F1054 / STEC 4plex ONE Art. No. F5265)
- 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, for volumes from 0.7 µL – 1000 µL
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- Incubator
- Enrichement broth (i.e. modified tryptone soy broth (mTSB) + Novobiocin)
- 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 have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

1.7 Setup

	Blockcycler[1] & R-Biopharm RIDA®CYCLER[1]	**Rotorcycler[2] & LightCycler® 480 Instrument II[2]**
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[1]	*E. coli* O45	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	E. coli O111	ROX	+	
	E. coli O145	Cy5	+	
Agilent AriaDx /Mx[1]	*E. coli* O45	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	E. coli O111	ROX	+	
	E. coli O145	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500[1]	*E. coli* O45	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
	E. coli O111	ROX	None	
	E. coli O145	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus (incl. Deep Well)[1]	*E. coli* O45	FAM	+	Baseline Settings: • Baseline substracted curve fit • Apply fluoresnce drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
	E. coli O111	ROX	+	
	E. coli O145	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER[1]	*E. coli* O45	green	+	**Ignore cycles before**, if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	IAC	yellow	+	
	E. coli O111	orange	+	
	E. coli O145	red	+	
Roche LightCycler® 480 II[2]	*E. coli* O45	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	533-580	+	
	E. coli O111	533-610	+	
	E. coli O145	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer[2]	*E. coli* O45	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	540-580	+	
	E. coli O111	540-610	+	
	E. coli O145	610-670	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

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

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control, Positive control.

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

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

Reactions needed for the qualitative *E. coli* O45, O111 and O145 detection:

(e.g. when using samples without enrichment a.o. picked colonies or swabs - not part of the PTM validation* or after previous use of SureFast® STEC 4plex ONE, Art. No. F5265)

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 *E. coli* O45, O111 and O145 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.

* After DNA extraction with SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021), according to kit instructions.

** **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.

E. coli O45 DNA is detected in the FAM-channel, *E. coli* O111 DNA is detected in the ROX-channel and *E. coli* O145 DNA is detected in the Cy5-channel (see table). 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 internal control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive**.

If the sample DNA in the VIC/HEX-Channel 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. When using a fast extraction it is recommended to centrifuge the lysate before the PCR or 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 *E. coli* O45, *E. coli* O111 or *E. coli* O145 PCR assay.

Result in the respective channel				Interpretation
FAM channel *E. coli* O45	ROX channel *E. coli* O111	Cy5 channel *E. coli* O145	VIC/HEX channel IAC	
positive	negative	negative	**positive/negative**	*E. coli* O45-DNA detected
negative	**positive**	negative	**positive/negative**	*E. coli* O111-DNA detected
negative	negative	**positive**	**positive/negative**	*E. coli* O145-DNA detected
positive	**positive**	negative	**positive/negative**	*E. coli* O45 and O111-DNA detected
positive	**positive**	**positive**	**positive/negative**	*E. coli* O45, O111 and O145-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 ≤ Cp ≤ 36
Positive Control (FAM – *Escherichia coli* O45)	25 ≤ Cp ≤ 33	not relevant
Positive Control (ROX – *Escherichia coli* O111)	25 ≤ Cp ≤ 33	not relevant
Positive Control (Cy5 – *Escherichia coli* O145)	25 ≤ Cp ≤ 33	not relevant

3 Validation

SureFast® Escherichia coli Serotype II 4plex was validated per the AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces and the ISO 16140-2:2016 [Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method].

The reference method for the matrix study was USDA Microbiological Laboratory Guidebook (MLG) 5C.04, "Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) from Meat Products, Carcass, and Environmental Sponges" (USDA/MLG 5C.04) for raw meat matrices und US FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) "Chapter 4A: Diarrheagenic Escherichia coli" (FDA BAM Ch. 4a) for all other matrices.

The kit has been AOAC RI validated for the following matrices: raw beef trim, raw ground beef, baby spinach, sprouts, guacamole, wheat flower.

4 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 (*E. coli* O45, *E. coli* O111 or *E. coli* O145-DNA).

5 Further Information

5.1 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/)
- AOAC certificate (Download: www.congen.de/en/quality-standards/)
- Validation Report upon request

5.2 Technical Support

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