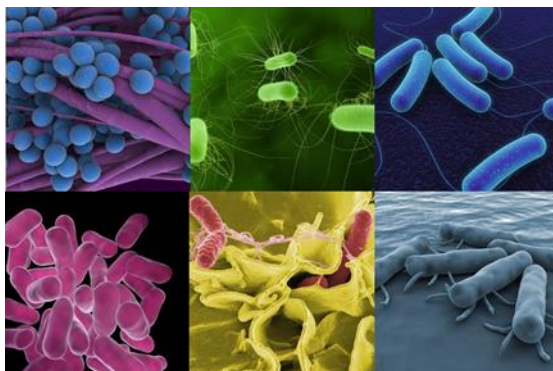


CONGEN

SureFast® STEC 4plex ONE

Art. No. F5265
100 rxn

User Manual



June 2026

 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.....	8
2.1.3	Herstellen des Master-Mix	9
2.1.4	Herstellen des real-time PCR-Mix	10
2.2	Interpretation der Ergebnisse	10
3	Validierung	12
4	Grenzen der Methode	12
5	Weitere Informationen	12
5.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	12
5.2	Technischer Support	12



Content

1	General Information	13
1.1	Description	13
1.2	Limit of Detection	13
1.3	Kit components and storage	14
1.4	Additionally required equipment and materials	14
1.5	Precautions for users	14
1.6	Setup	15
1.7	Detection channel Set-up	15
2	Qualitative Analysis	17
2.1	Protocol	17
2.1.1	Cultural Enrichment	17
2.1.2	DNA-preparation	18
2.1.3	Preparation of the master-mix	19
2.1.4	Preparation of the real-time PCR-mix	20
2.2	Interpretation of results	20
3	Validation	22
4	Limitations of the method	22
5	Further Information	22
5.1	Product Information	22
5.2	Technical Support	22

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Das SureFast® STEC 4plex ONE dient der einfachen und zeitsparenden Extraktion, 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 (einschl. O157:H7) in verschiedenen Lebensmitteln. Zudem eignet es sich zur Anwendung in der Diagnostik von Laboratorien für Lebensmittelanalytik.

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

* Die DNA-Extraktion kann ebenfalls mit SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021) erfolgen.

Das SureFast® STEC 4plex ONE wurde von AOAC (AOAC PTM 052602) einzeln und im Zusammenhang mit einer Extraktion mittels SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021) 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 zusätzlich am Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, 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 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. 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.

1.4 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm)
- SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021), optional
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Inkubator (bis 37°C)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern, für Volumina von 0,7 µL – 1000 µL
- 2 ml Reaktionsgefäße mit Verschlussdeckel
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Microzentrifuge (bis 12.000 rpm) mit Rotor für Reaktionsgefäße
- Thermomixer/Heizblock (einstellbar auf 60°C, 95°C und 99°C)
- Anreicherungsflüssigkeit (z.B. modifizierte Trypton-Soja Bouillon (mTSB) + Novobiocin)
- Geeignete Geräte für die Probenzerkleinerung und -homogenisierung
- Waage und Spatel zum Einwiegen der Proben
- 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 sind als potentiell infektiös zu betrachten und müssen gemäß den geltenden Vorschriften für potentiell infektiöse Materialien gehandhabt und entsorgt werden. Alle Reagenzien und Materialien, die mit solchen Proben in Kontakt kommen, sind als biologisch gefährlicher Abfall zu behandeln und entsprechend zu entsorgen.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Inhalt gemäß der örtlichen, regionalen und/oder internationalen Vorschriften bei einer Sammelstelle für gefährliche Abfälle oder Sondermüll entsorgen.

1.6 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

1.7 Detektionskanaleinstellungen

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

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P¹	<i>E. coli stx1/stx2</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>E. coli</i> O157	ROX	+	
	<i>E. coli eae</i>	Cy5	+	
Agilent AriaDx¹	<i>E. coli stx1/stx2</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>E. coli</i> O157	ROX	+	
	<i>E. coli eae</i>	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500¹	<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 (incl. Deep Well)¹	<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®CYCLER¹	<i>E. coli stx1/stx2</i>	green	+	Ignore cycles before , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	IAC	yellow	+	
	<i>E. coli</i> O157	orange	+	
	<i>E. coli eae</i>	red	+	
Qiagen Rotor- Gene Q²	<i>E. coli stx1/stx2</i>	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werk- einstellung) eingestellt sein.
	IAC	yellow	+	
	<i>E. coli</i> O157	orange	+	
	<i>E. coli eae</i>	red	+	

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 480 Instrument II²	<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</i> eae	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer²	<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</i> eae	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 6887-1 und ISO 13136. Zur Vorbereitung der Anreicherung werden 25 g bzw. 25 ml Probenmenge in 225 ml nicht-selektiver Anreicherungsflüssigkeit* eingewogen und homogenisiert. Weicht die Probenmenge von 25 g ab, sollte das Volumen des Mediums in einem 1:10-Verhältnis gewählt werden.

*z.B. modifizierte Trypton-Soja Bouillon (mTSB) oder gepuffertes Peptonwasser (BPW)

Alternativ können auch andere geeignete, validierte Anreicherungsverfahren angewendet werden.

- **Anreicherungsbedingungen entsprechend der AOAC PTM Validierung Lizenz-Nr. 052602:**

Probenart	Anreicherung
• Guacamole • Weizenmehl	25 g Probe + 225 ml BPW
• Rohes Fleisch	25 g Probe + 225 ml mTSB oder BPW bzw. 375 g Probe + 1125 ml mTSB oder BPW
• Spinat • Sprossen	200 g Probe + 1800 ml BPW

Anschließend erfolgt die Anreicherung bei einer Temperatur von 41,5 °C für 18 h - 24 h.

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 dem SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021), (Protokoll nicht im Kit enthalten) oder mit den in diesem Kit enthaltenen Materialien gemäß dem untenstehenden Protokoll durchgeführt werden.

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, kann es bis zu 4 Stunden bei 2 – 8°C gelagert werden. Ist eine längere Lagerung vorgesehen, werden 100 µL des Überstandes in ein neues Tube (nicht im Kit enthalten) überführt und bei -28 bis -16°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:

(z.B. bei Extraktion von nicht angereicherten Proben, wie gepickten Kolonien oder Abstrichtupfern - nicht Teil der PTM Validierung*)

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.

* 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

2.1.4 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.

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 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. Es 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 *Escherichia coli stx1/stx2*, *Escherichia coli* O157 oder *Escherichia coli eae* mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation ^{1,2,3}
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	positiv	positiv/negativ	<i>E. coli stx1/stx2</i> - und <i>eae</i> -DNA nachweisbar, potentiell positiv für Nicht-O157 STEC
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>E. coli stx1/stx2</i> -DNA nachweisbar, potentiell positiv für Nicht-O157 STEC
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>E. coli stx1/stx2</i> -, <i>eae</i> - und O157-DNA nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>E. coli stx1/stx2</i> - und O157-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ, <i>E. coli stx1/stx2</i> , O157, <i>eae</i> -DNA ist nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

¹ Zum Nachweis von O157, einschließlich H7

² Das Kit ist für die Verwendung in Verbindung mit unseren SureFast® *Escherichia coli* Serotype 4plex Kits (Art. Nr. F5167 und F5168) vorgesehen. Wenn O157 nicht nachgewiesen wird, fahren Sie mit der Analyse unter Verwendung der Serotype I und II Kits zum Nachweis von Nicht-O157-STECS fort.

³ Für die folgenden Matrices: Sprossen, Spinat, Weizenmehl und Guacamole ist der Nachweis des *stx1/stx2*-Gens für O157 (einschließlich H7) und andere STECS für eine positive Interpretation erforderlich. Das Vorhandensein des *eae* Gens kann variieren.

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 Validierung

Die externe Validierung von SureFast® STEC 4plex ONE 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 Nachweiskante kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanische 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* (subtype a-d), *stx2* (subtype a-g), *eae* oder *Escherichia coli* Serotyp O157) 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® 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 (incl. O157:H7) in different types of food and is intended to be used by all kinds of food testing laboratories..

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

* DNA preparation can also be performed using SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021).

SureFast® STEC 4plex ONE has been validated and certified for use on its own or with an optional extraction using 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 Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, 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 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. 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.

1.4 Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021), optional
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- incubator (up to 37°C)
- pipettes with filter tips, for volumes from 0.7 µL – 1000 µL
- microcentrifuge tubes - 2 ml tubes with lock cap
- powder-free disposable gloves
- vortex mixer
- microcentrifuge (up to 12,000 rpm) with a rotor for the reaction tubes
- thermomixer/heating block (Capable of maintaining 60°C, 95°C and 99°C)
- enrichment broth (i.e. modified Tryptone Soy Broth (mTSB) + Novobiocin)
- suitable equipment for sample comminution and homogenization
- balance and spatula for weighing the samples
- 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 shall be considered as potentially infectious and must be handled and disposed of in accordance with applicable regulations for potentially infectious materials. All reagents and materials that come into contact with such samples shall be treated as biohazardous waste and disposed of accordingly. 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 regulations.

1.6 Setup

	Blockcycler ¹ & R-Biopharm RIDA®CYCLER ¹	Rotorcycler ² & LightCycler® 480 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

1.7 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 Mx3005P¹	<i>E. coli stx1/stx2</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>E. coli O157</i>	ROX	+	
	<i>E. coli eae</i>	Cy5	+	
Agilent AriaDx¹	<i>E. coli stx1/stx2</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>E. coli O157</i>	ROX	+	
	<i>E. coli eae</i>	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500¹	<i>E. coli stx1/stx2</i>	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
	<i>E. coli O157</i>	ROX	None	
	<i>E. coli eae</i>	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96 Dx/Opus (incl. Deep Well)¹	<i>E. coli stx1/stx2</i>	FAM	+	Baseline Settings: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>E. coli O157</i>	ROX	+	
	<i>E. coli eae</i>	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER¹	<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 cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	IAC	yellow	+	
	<i>E. coli O157</i>	orange	+	
	<i>E. coli eae</i>	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q²	<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 O157</i>	orange	+	
	<i>E. coli eae</i>	red	+	

SureFast® STEC 4plex ONE (100 rxn)

Art. No. F5265

June 2026

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Roche LightCycler® 480 II ²	<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</i> eae	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer ²	<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</i> eae	610-670	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Cultural Enrichment

Sample preparation of food and feed matrices should apply to ISO 6887-1 and ISO 13136 standards. For enrichment, a volume of 25 g or 25 ml sample material is homogenized with 225 ml of a non-selective enrichment broth*.

If test portions deviate from 25 g, the enrichment broth volume should be chosen in a 1:10 ratio.

*e.g. modified Trypton-Soy broth (mTSB) or buffered peptone water (BPW)

Alternatively other suitable, validated enrichment procedures can be used.

- **Enrichment conditions according to AOAC PTM validation #052602:**

Sample type	Enrichment
• Guacamole • Wheat flour	25 g sample + 225 ml BPW
• Raw meat	25 g sample + 225 ml mTSB or BPW or 375 g sample + 1125 ml mTSB or BPW
• Spinach • Sprouts	200 g sample + 1800 ml BPW

Enrichment is performed at 41.5°C for 18 h - 24 h.

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 SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021),(protocol not provided with the kit) or with the materials included in this kit following the protocol below.

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

Pipette 500 µl of Lysis Buffer (**Code L**) into a 2.0 ml tube (not provided with the kit). Afterwards, transfer add 200 µl of the upper third from the enrichment culture to the 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 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 12000 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 it is not used immediately, it can be stored at 2-8°C for up to 4h. If it is intended for a longer storage, transfer 100 µl of the lysate in a new tube (not provided with the kit) and store at -28 to -16°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:

(e.g. when using samples without enrichment such as picked colonies or swabs - not part of the PTM validation*)

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.

* 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 incubate enrichment
- Medium control: only medium - no sample

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.

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 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 no 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 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 *Escherichia coli stx1/stx2*, *Escherichia coli* O157 or *Escherichia coli eae* PCR assay.

Result in the respective channel				Interpretation ^{1,2,3}
FAM channel <i>Escherichia coli</i> <i>stx1/stx2</i>	ROX channel <i>Escherichia coli</i> O157	Cy5 channel <i>Escherichia coli</i> <i>eae</i>	VIC/HEX channel IAC	
positive	negative	positive	positive/negative	<i>E. coli stx1/stx2</i> and <i>eae</i> DNA detected, potential positive for non-O157 STEC
positive	negative	negative	positive/negative	<i>E. coli stx1/stx2</i> DNA detected, potential positive for non-O157 STEC
positive	positive	positive	positive/negative	<i>E. coli stx1/stx2</i> , <i>eae</i> and O157-DNA detected
positive	positive	negative	positive/negative	<i>E. coli stx1/stx2</i> and O157-DNA detected
negative	negative	negative	positive	Negative, <i>E. coli stx1/stx2</i> , O157, <i>eae</i> -DNA is not detected
negative	negative	negative	negative	invalid

¹ For detection of O157 including H7

² Kit intended for use in conjunction with our SureFast® *Escherichia coli* Serotype 4plex kits (Art. No. F5167 and F5168). If O157 is not detected proceed with analysis using the Serotype I and II kits for the detection of non-O157 STECs.

³ For with the following matrices: sprouts, spinach, wheat flour and guacamole detection of the *stx1/stx2* gene for O157 (including H7) and other STECs is required for positive interpretation. Presence of the *eae* gene may be variable.

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 – <i>Escherichia coli stx1/stx2</i>)	25 ≤ Cp ≤ 33	not relevant
Positive Control (ROX – <i>Escherichia coli</i> O157)	25 ≤ Cp ≤ 33	not relevant
Positive Control (Cy5 – <i>Escherichia coli eae</i>)	25 ≤ Cp ≤ 33	not relevant

3 Validation

SureFast® STEC 4plex ONE 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.
- Extremely 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 (*Escherichia coli stx1* (subtype a-d), *stx2* (subtype a-g), *eae* or *Escherichia coli* serotype O157 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 and 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.