

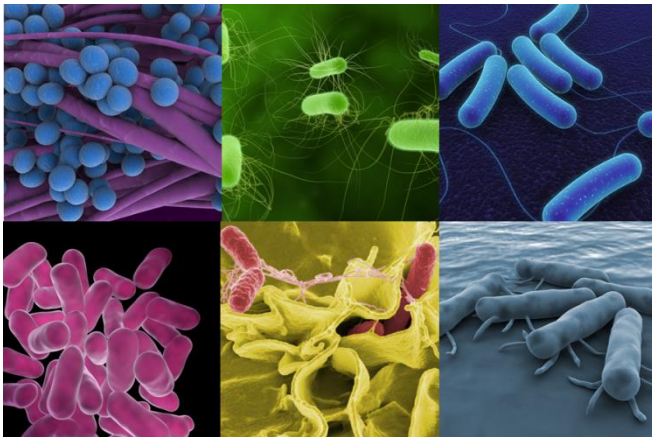
CONGEN

SureFast[®] EHEC/EPEC 4plex

Art. No. F5128

100 rxn

User Manual



November 2018

 Inhalt /  Content

1.	Allgemeines	2
1.1	Beschreibung	2
1.2	Nachweisgrenze	2
1.3	DNA-Präparation	2
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	2
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	2
1.6	Geräteeinstellungen	3
2	Qualitative Analyse	3
2.1	Protokoll	3
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	3
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	4
2.2	Interpretation der Ergebnisse	4
3	Weitere Informationen	4
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	4
3.2	Technischer Support	4
1	General Information	5
1.1	Description	5
1.2	Limit of Detection	5
1.3	DNA-preparation	5
1.4	Kit components and storage	5
1.5	Additionally required equipment and materials	5
1.6	Setup	6
2	Qualitative Analysis	6
2.1	Protocol	6
2.1.1	Preparation of the master-mix	6
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	7
2.2	Interpretation of results	7
3	Further Information	7
3.1	Product Information	7
3.2	Technical Support	7

1. Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® EHEC/EPEC 4plex ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von DNA-Sequenzen der *Escherichia coli* Virulenzfaktoren *stx1* (Subtyp a-d), *stx2* (Subtyp a-g) und *eae* sowie des *Escherichia coli* und *Shigella* spp. Virulenzfaktors *ipaH*.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm, 610 nm und 670 nm (FAM, VIC, ROX und Cy5) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II/Roche cobas z 480 Analyzer¹, Applied Biosystems 7500 und R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® EHEC/EPEC 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.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFast® PREP Bacteria oder der SureFast® Speed PREP empfohlen. Um das Wachstumspotenzial des Bakteriums besser beurteilen zu können, wird empfohlen, die Proben zu Beginn und am Ende der kulturellen Voranreicherung zu analysieren (Wachstum ab einer Cp-Wert Differenz von >3).

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP Bacteria oder SureFast® Speed PREP)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (522 nm, 553 nm, 610 nm und 670 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

¹ Für die Benutzung des Roche LightCycler® 480 I, II und Cobas ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) verwendet werden.

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler/RIDA®CYCLER	Rotorcycler/ LightCycler® 480 II
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	1 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase Nachweissystem <i>stx1/stx2</i> : Diverse Geräte FAM -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm Interne Amplifikationskontrolle: Diverse Geräte VIC/HEX -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm Nachweissystem <i>ipaH</i> : Diverse Geräte ROX -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 610 nm Nachweissystem <i>eae</i> : Diverse Geräte Cy5 -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 618 nm - 660 nm	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download		

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: Positivkontrolle, Negativkontrolle und Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Es wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen 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 im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

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

2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle (Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix).
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Reaktionsgefäße.
- 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 Analysen-Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter *stx*, im ROX-Kanal der Parameter *ipaH* und im Cy5-Kanal der Parameter *eae* detektiert. Ist kein Pathogenitätsfaktor-Gen in der Probe vorhanden, wird die Interne Amplifikationskontrolle im VIC/HEX-Kanal detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige Interne Amplifikationskontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** ist (siehe dazu auch Tabelle unten).

Eine Probe, die **negativ** für alle Parameter und **negativ** im VIC/HEX-Kanal (interne Amplifikationskontrolle) ist, kann nicht bewertet werden. In diesem Fall sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden oder die Nukleinsäure-Extraktion hat nicht ordnungsgemäß funktioniert. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

Pathogenitätsfaktor-Gene				
FAM-Kanal <i>stx1/stx2</i>	ROX -Kanal <i>ipaH</i>	Cy5-Kanal <i>eae</i>	VIC/HEX-Kanal	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv	STEC (EHEC)
positiv	negativ	positiv	positiv	EHEC
negativ	negativ	positiv	positiv	EPEC
negativ	positiv	negativ	positiv	EIEC / <i>Shigella</i> spp.
positiv	positiv	negativ	positiv	<i>Shigella dysenteriae</i> Typ 1
negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ (Virulenzfaktor-Gene sind nicht nachweisbar)
negativ	negativ	negativ	negativ	Nicht auswertbar

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten

3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an info@congen.de.

CONGEN Biotechnologie GmbH | Robert-Roessle-Straße 10 | 13125 Berlin

Tel: +49 30 9489-3500 | Fax +49 30 9489-3510 | e-mail: info@congen.de | www.congen.de

1 General Information

1.1 Description

SureFast® EHEC/EPEC 4plex is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of DNA sequences of the virulence factors *stx1* (subtype a-d), *stx2* (subtype a-g), *eae* and the *E. coli* and *Shigella* spp. virulence factor *ipaH*.

Each reaction contains an internal amplification control. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm, 610 nm and 670 nm (FAM, VIC, ROX and Cy5) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II/ Roche cobas z 480 Analyzer², Applied Biosystems 7500 and R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® EHEC/EPEC 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.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Bacteria or SureFast® Speed PREP is recommended. To assess the process of bacterial growth, it is recommended to compare the samples at the beginning and at the end of the culturing (bacterial growth at Cp difference >3).

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at -20°C and protected from light.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP Bacteria or SureFast® Speed PREP)
- real-time PCR instrument with four detection channels (522 nm, 553 nm, 610 nm and 670 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps) pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

² note: For the use of the Roche LightCycler® 480 I, II and Cobas a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must be used for the color compensation of such devices.

1.6 Setup

	Blockcycler/RIDA®CYCLER	Rotorcycler/ LightCycler® 480 II
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	1 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of Extension Phase Detection System <i>stx1/stx2</i> : Various devices FAM -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm Internal Amplification Control: Various devices VIC/HEX -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm Detection System <i>ipaH</i> : Various devices ROX -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 610 nm Detection System <i>eae</i> : Various devices Cy5 -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 618 nm - 660 nm	
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/downloads		

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). Recommended control reactions: negative control, positive control and extraction control. The master-mix includes an internal amplification control (inhibition control) for each reaction.

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 by vortexing and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for 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.

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

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- Close the tube of the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells or capillaries.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells or capillaries 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 need to give the correct results.

Stx is detected in the FAM-channel, *ipaH* is detected in the ROX-channel and *eae* is detected in the Cy5-channel. If there is no virulence factor gene in the sample, the internal amplification control will be detected in the VIC/HEX-channel.

A sample is stated **positive** for the virulence factor genes, if the sample DNA shows an amplification in respective channel. A sample is stated **negative** for the virulence factor genes, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and the internal amplification control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** (see also table below).

If the sample DNA and the internal amplification control are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances or the sample preparation was not successful. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

Virulence factor genes			VIC/HEX channel	result
FAM-channel <i>stx1/stx2</i>	ROX -channel <i>ipaH</i>	Cy5-channel <i>eae</i>		
positive	negative	negative	positive	STEC (EHEC)
positive	negative	positive	positive	EHEC
negative	negative	positive	positive	EPEC
negative	positive	negative	positive	EIEC/ Shigella spp.
positive	positive	negative	positive	Shigella dysenteriae Typ 1
negative	negative	negative	positive	Negative (Virulence factor genes are not detectable)
negative	negative	negative	negative	Not evaluable

3 Further Information

3.1 Product Information

- Validation Report

3.2 Technical Support

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