

**Beschreibung**

Mit diesem Test wird *Escherichia coli* DNA nachgewiesen. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (PLUS) ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 510 nm und 580 nm (FAM und VIC/HEX) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 480 Cobas, Roche LightCycler® 2.0<sup>1</sup>, Applied Biosystems 7500, LTF MyGo Pro sowie am Qiagen RotorGene Q.

**Nachweisgrenze**

Die SureFast® Escherichia coli PLUS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

**Kreuzreaktionen**

Das Nachweisverfahren weist Quersensitivitäten zu *Shigella* spp. auf.

**DNA-Präparation**

Für die DNA-Präparation wird das SureFast® PREP Bacteria oder das SureFast® PREP Aqua Kit 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  $>3$ ).

**Kit-Inhalt und Lagerung**

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern.

**Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien**

- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Kapillaren, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filter
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

**Protokoll**

## 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.

Desweiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen und zentrifugieren. Die Taq Polymerase sollte nicht aufgetaut und nicht im Vortex gemischt werden.

<sup>1</sup> Für die Benutzung des Roche LightCycler® 2.0 ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) verwendet werden.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

## 2. Geräteeinstellungen

	Blockcytler	Rotorcytler, LightCycler® 480
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
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase  <u>Nachweissystem:</u> Diverse Geräte                      FAM-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q                        Green LightCycler 2.0                      530 nm - none LightCycler 480 II                    465 nm - 510 nm  <u>Interne Amplifikationskontrolle:</u> Diverse Geräte                      VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q                        Yellow LightCycler 2.0                      560 nm - none LightCycler 480 II                    533 nm - 580 nm  Passive Reference: None	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

## 3. 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.

## 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.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt (FAM).

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** (VIC/HEX) ist.

Sollten die Probe sowie die interne Amplifikationskontrolle **negativ** sein, sind in der Probe Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

## Weitere Informationen

- Validierungsdaten

## Technischer Support

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

**Description**

The test detects *Escherichia coli* DNA. Each reaction contains an internal amplification control (PLUS). The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at 510 nm and 580 nm (FAM and VIC/HEX) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 480 Cobas, Roche LightCycler® 2.0<sup>2</sup>, Applied Biosystems 7500, LTF MyGo Pro and Qiagen RotorGene Q.

**Limit of Detection**

The SureFast® Escherichia coli PLUS real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

**Cross reactivity**

Cross reactivity was observed with DNA extracts from *Shigella* spp..

**DNA-preparation**

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Bacteria or SureFast® PREP Aqua 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  $>3$ ).

**Kit components and storage**

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at  $-20^{\circ}\text{C}$  and protected from light.

**Additionally required equipment and materials**

- real-time PCR instrument, equipped with two detection channels (510 nm and 580 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

**Protocol****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. The tube of the Taq Polymerase should be kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  and not be mixed by vortexing.

<sup>2</sup> note: For the use of the Roche LightCycler® 2.0 a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010) must be used for the color compensation of such devices.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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

## 2. Setup

	Blockcycler	Rotorcycler, LightCycler® 480
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
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase  <u>Detection System:</u> Various devices FAM-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LightCycler 2.0 530 nm - none LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  <u>Internal Amplification Control :</u> Various devices VIC/HEX-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LightCycler 2.0 560 nm - none LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm  Passive Reference: None	
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: <a href="http://www.congen.de/en/company/download">http://www.congen.de/en/company/download</a>		

## 3. Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- Close the tubes/wells or capillaries of the negative control (it is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells or capillaries and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries and close them.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates or capillaries into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

**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.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows an amplification in the detection system (FAM).

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system and the internal amplification control (inhibition control) of the sample is **positive** (VIC/HEX). If the sample DNA and the internal amplification control are **negative** the sample contains inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

**Product Information**

- Validation Report

**Technical Support**

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de).