



PCRFast[®] VTEC

**Geldetektion
gel detection**

IF/MG1004

Deutsch Seite 2
English Page 13

Kurzinformation

Einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum qualitativen Nachweis von Shigatoxin bildenden Escherichia coli (VTEC stx1 und stx2) in Lebensmitteln mit Geldetektion. Mit dem Test können 96 Reaktionen durchgeführt werden. Alle Reaktionsgefäße enthalten ein spezifisches Primerpaar.

48 Reaktionsgefäße (rote Markierung) enthalten zusätzlich VTEC stx1 und VTEC stx2 DNA zur Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte (ITC) und für die Schmelzkurvenanalyse.

Zeitbedarf:	Anreicherung.....ca. 18 h
(10 Proben)	DNA - Extraktion.....45 min
	PCR-Ansatz.....15 min
	PCR.....2,0 h
	Gelelektrophorese.....15 - 30 min

PCRFast®

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

PCRFast®

is a registered trademark of the ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp also offers contract analysis.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

1. Testprinzip

PCRFast[®] VTEC ist ein einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von Shigatoxin bildenden Escherichia coli (VTEC stx1 und stx2) in Lebensmitteln. Die Vorgabe zur Durchführung entspricht den internationalen Standards (z.B. ISO/DIS 20838) für die PCR Analytik.

Alle Reaktionsgefäße enthalten die für die PCR - Reaktion notwendigen spezifischen Primer in optimaler Menge.

Die **nicht markierten Reaktionsgefäße (farblos)** werden für den Nachweis von **VTEC stx1 und VTEC stx2 - DNA in der extrahierten Probe** verwendet, sowie für die **Negativkontrollen NTC** (Überprüfung des MasterMixes auf Kontamination).

Die **markierten Reaktionsgefäße (rot)** enthalten neben den Primern zusätzlich VTEC - DNA. Diese werden für die **Inhibitionskontrollen ITC** (Überprüfung der extrahierten Proben - DNA auf Inhibitoren) verwendet. Zusätzlich ermöglichen die markierten Reaktionsgefäße die Mitführung von **Positivkontrollen PTC** (Überprüfung der Funktionalität des MasterMixes).

In das Reaktionsgefäß wird **12,5 µl zweifach konzentrierter MasterMix** vorgelegt und anschließend **12,5 µl des DNA - Extraktes** zugegeben. Der MasterMix enthält bereits Polymerase, Nukleotide und Magnesiumchlorid in optimaler Konzentration. Die Zielsequenz wird dann in einem PCR - Thermocycler amplifiziert und dabei das gebildete Amplifikat (stx1 282 bp / stx2 584 bp) mittels Agarose - Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

2. Packungsinhalt

Der Testkit enthält:

- 6 x **Streifen (farblos)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (48 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern (für die Probenbestimmungen und Negativkontrollen NTC)
- 6 x **Streifen (rot)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (48 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern und VTEC stx1 und VTEC stx2 DNA (für die Inhibitionskontrollen ITC und Positivkontrollen PTC)

3. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

Geräte und Labormaterialien

- Inkubator 56 °C und 70 °C
- Brutschrank 37 °C
- Vortexer
- Biozentrifuge, mind. 14.000 x g (für 2,0 ml Reaktionsgefäße)
- **PCR - Thermocycler:**
Gel z. B. Eppendorf MasterCycler mit Heizblock für 0,2 ml Reaktionsgefäße
- Gelkammer mit Netzteil und Gel - Dokumentationssystem
- Mikroliterpipetten 2 - 20 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl, z. B. Gilson Pipetman P, jeweils mit Filterspitzen
- 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße

Reagenzien

Verdünnungslösung

- modifizierte Tryptose Soja Bouillon mit Novobiocin (mTSNB) entsprechend LFGB § 64 L 00.00 – 92

DNA-Extraktion

- Ethanol >95 % (vergällt)
- 0,1 x TE - Puffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0,1 mmol / l)
- Wasser deionisiert, DNA – frei
- DNA-Extraktionskit, z.B. PCRFast[®] Microbe Extraction

PCR

zweifach konzentrierter MasterMix (Hotstart empfohlen)
z. B. AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix, Applied Biosystems Nr. 4318739;
Qiagen HotStarTaq MasterMix Kit Qiagen Nr. 203443; Brilliant II QPCR
MasterMix, Stratagene Nr. 600804

Detektion

- Agarose
- Ethidiumbromid
- Puffer für die Gelherstellung, Überschichten des Gels und Elektrophorese - Laufpuffer:
1 x TAE - Puffer (Tris 40 mmol / l, Essigsäure 20 mmol / l, EDTA 1 mmol / l)
- Gelladepuffer, z. B. 5fach (Succrose 5 %, Orange G 0,25 %)
- DNA - Längenmarker, Bereich 50 - 1000 bp

4. Vorsichtsmaßnahmen

- alle Arbeiten sollten mit den im Labor üblichen Schutzmassnahmen und alle PCR Arbeiten entsprechend den Empfehlungen nach CEN / ISO durchgeführt werden
- zur Vermeidung von Verschleppungen alle Arbeiten mit Schutzhandschuhen und Filterspitzen durchführen
- räumliche Trennung von Probenaufarbeitung, PCR - Setup und Detektion beachten
- Ethidiumbromid ist DNA schädigend und sollte daher entsprechend den Vorschriften gehandhabt werden
- UV - Licht ist DNA schädigend: Vorsicht beim Umgang mit UV - Transilluminatoren

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Den Testkit bzw. die Reaktionsgefäße bei 2 - 8 °C lagern.

6. Probenanreicherung und DNA - Isolierung

6.1. Anreicherung

Die Anreicherung von Lebensmittelproben erfolgt nach den Vorschriften des § 64 LFGB.

6.1.1. Anreicherung

Zur Anreicherung von festen Lebensmitteln wird in einem sterilen Stomacher - Beutel eine 1:10 (w / v) Verdünnung mit Verdünnungslösung (siehe 3., z.B. 10 g Probe + 90 ml mTSNB) hergestellt, homogenisiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

6.2. DNA - Isolierung

Für die DNA - Extraktion wird 1 ml aus 6.1.1. entnommen und entsprechend den Angaben der Hersteller der Extraktionskits aufgearbeitet (Extraktionsprotokoll siehe z.B. PCRFast[®] Microbe Extraction).

6.3 Anmerkung

Die thermische Lyse ist nach einer Anreicherung in modifizierte Tryptose Soja Bouillon nicht zu empfehlen

6.4. Bestätigung verdächtiger Kolonien

Zur Bestätigung verdächtiger Kolonien auf festen Nährmedien ist es ausreichend, wenn eine Öse dieser Kolonie in 0,2 ml Wasser deionisiert aufgeschlämmt und 10 min bei 95 °C erhitzt wird. Anschließend wird die Probe abgekühlt und 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand kann dann direkt für PCRFast[®] verwendet werden.

7. PCR - Ansatz

7.1. Vorbereitungen

- Streifen aus der Folie entnehmen und benötigte Anzahl Reaktionsgefäße abtrennen
- die restlichen Streifen / Reaktionsgefäße zusammen mit dem Trockenbeutel in die Folie zurücklegen, Folie gut verschließen und bei 2 - 8 °C lagern
- die benötigte Menge MasterMix bereitstellen (pro Reaktion 12,5 µl)

7.2. Ansatz

–folgende Volumina in die Reaktionsgefäße pipettieren:

Pro Probe	Reaktionsgefäß	Master-Mix	Probe
	farblos	12,5 µl	12,5 µl
Inhibitions-kontrolle ITC	rot	12,5 µl	12,5 µl
Pro Ansatz	Reaktionsgefäß	Master-Mix	0,1 x TE - Puffer
Negativ-kontrolle NTC	farblos	12,5 µl	12,5 µl
Positiv-kontrolle PTC	rot	12,5 µl	12,5 µl

Tab. 1: Pipettieransatz PCRFast® VTEC – stx1/2

–die Reaktionsgefäße verschließen (abzentrifugieren empfohlen) und in den PCR - Thermocycler stellen. Die Amplifikation nach folgendem Temperatur - / Cyclerprofil durchführen:

–Cyclerprofil

10 min	95 °C	
15 sec	95 °C	
30 sec	60 °C	45 Zyklen
45 sec	72 °C	

Anmerkung:

Die Validierung wurde mit AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (für die Geldetektion) von Applied Biosystems und den unter Punkt 3 genannten Thermocyclern durchgeführt. Eventuell muss das vorgegebene Cyclerprofil an das jeweilige Gerät und den MasterMix angepasst werden.

7.3.1. Geldetektion

- empfohlen wird eine Elektrophorese in 2,0 - 2,5 % Agarose und Anfärbung des Amplifikates mit Ethidiumbromid
- die Gelelektrophorese nach den Angaben des Herstellers durchführen

Beispiel:

- Agarosegel 2,0 - 2,5 % herstellen (1,0 - 1,25 g Agarose und 2 - 4 µl Ethidiumbromid 10 mg / ml in 50 ml 1 x TAE - Puffer durch Erhitzen auflösen und das Gel gießen)
- Agarosegel mit 1 x TAE - Puffer überschichten
- PCR - Amplifikat mit Gelladepuffer auf das Agarosegel auftragen, z. B. 6 µl des 5 x Ladepuffers zum PCR - Ansatz (25 µl) zugeben, mischen und 10 µl auftragen
- Längenmarker auftragen
- Elektrophorese für 15 min bis 30 min bei 3 - 6 V / cm (abhängig vom Elektrophorese System) durchführen
- auf einem Transilluminator die DNA visualisieren und dokumentieren

8. Auswertung

8.1. Geldetektion

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung zusammengefasst. Bei einer positiven Probe liegt die Bande eines Toxins oder beide Banden beider Toxine der Probe und die entsprechenden Banden der Positivkontrolle auf gleicher Höhe.

8.1.1. Auswertematrix Geldetektion

Probe	Inhibitions- kontrolle ITC	Negativ- kontrolle NTC	Positiv- kontrolle PTC	Ergebnis
■	■			Probe positiv
keine Bande	■			Probe negativ
keine Bande	keine Bande			Inhibition*
		keine Bande		MasterMix nicht kontaminiert
			■	MasterMix funktionsfähig

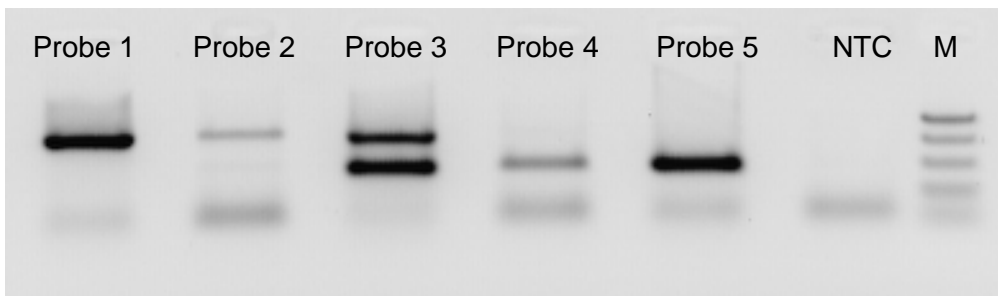
* extrahierte Proben - DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

■ = Bande

Tab. 2: Auswertung PCRFast® VTEC

8.1.2. Beispiel für ein typisches Agarosegelbild

–Im Folgenden ist ein Agarosegelbild exemplarisch dargestellt.



Probe 1 bis Probe 2: VTEC stx2 positiv

Probe 3: VTEC stx1 und stx2 positiv (entspricht Positivkontrolle)

Probe 4 bis Probe 5: VTEC stx 1 positiv

NTC: Negativkontrolle

M: Marker (von unten 50 bp, 150 bp, 300 bp, 500pb, 766 bp)

Abb. 1: Beispiel für ein Agarosegelbild PCRFast® VTEC

9. Sensitivität

Die Nachweisgrenze des Systems liegt bei < 10 Kopien pro Reaktionsansatz. Bezogen auf Shigatoxin bildende *Escherichia coli* (VTEC stx1 und stx2) in Lebensmittel liegt die Nachweisgrenze bei unter 1 veratoxin bildende *Escherichia coli* in 25g Probe.

10. Spezifität

PCRFast[®] VTEC stx1/2 ist 100 % spezifisch auf VTEC stx1 und VTEC stx2. Folgende Spezies wurden mit mind 2500 Kopien auf Kreuzreaktivität getestet:

Spezies		Spezies		Spezies	
VTEC - STX ₁	+	VTEC - STX ₂	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Salmonella spp.</i>	-		

Tab. 4: Spezifität PCRFast[®] VTEC

- + Bande mit 282 / 584 bp
- keine Bande mit 282 / 584 bp

Sollten Fragen zur Durchführung des Testes, zur Probenaufarbeitung oder zur PCR - Analytik im Allgemeinen bestehen, dann wenden Sie sich bitte an das Kompetenzzentrum für DNA - Analytik des ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com

Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0

Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50

Weitere Informationen zur Durchführung von PCRFast[®] finden Sie auch unter www.produktqualitaet.com.



Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. ifp übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

11. Literatur

Herbert Schmidt, Caren Geitz, Phillip I. Tarr, Matthias Frosch, and Helge Karch, "Non-O157:H7 Pathogenic Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli*: Phenotypic and Genetic Profiling of Virulence Traits and Evidence for Clonality", *The Journal of Infectious Diseases* 1999;179:115–23

Beutin, L., „Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, Causes und Effects of the Rise of a Human Pathogen“. *Journal Vet. Med. B* 53, Blackwell Verlag, Berlin, 2006, S. 299-303

Beutin, L.; Miko, A.; Krause, G.; Pries, K.; Haby, S.; Steege, K.; Albrecht, N. „Identification of human pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes“. *Appl. Environ Microbiol.*, 73 (15), 2007, S. 4769-4775

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 22174)

L 00.00 - 45 „Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln“

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20837)

L 00.00 - 109 „Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase - Kettenreaktion (PCR)“

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20838)

L 00.00 - 110 „Anforderung an die Amplifikation und den Nachweis bei qualitativen Verfahren zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase – Kettenreaktion (PCR)“

PCRFast[®] VTEC gel detection

Brief information

Simple, molecular biological test (polymerase chain reaction - PCR) for the qualitative detection of shigatoxin producing Escherichia coli (VTEC stx1 and stx2) in food with gel detection. With this kit 96 reactions could be done. Every reaction vial contains a specific primer pair.

48 reaction vials (red marking) contain additionally VTEC stx1 and VTEC stx2 DNA for investigating possible inhibition effects (ITC).

Time required:	enrichment.....	approx. 18 h
(10 samples)	DNA - Extraction.....	45 min
	PCR setup.....	15 min
	PCR.....	2.0 h
	gelelectrophoresis.....	15 - 30 min

PCRFast[®]

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

PCRFast[®]

is a registered trademark of ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp also offers contract analyses.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

1. Principle of the test

PCRFast[®] VTEC is a simple, molecular biological test (PCR) for the qualitative detection of shigatoxin producing Escherichia coli (VTEC stx1 and stx2) in foodstuff. The analytical procedure described here complies with the international standards (e.g. ISO/DIS 20838) for PCR analysis.

All the reaction vials contain the optimum amount of the specific primer required for the PCR reaction.

The **reaction vials that are not marked (colourless)** are used for detecting **VTEC stx1 and VTEC stx2 DNA in the extracted sample** and for the **negative controls NTC** (checking the MasterMix for contamination).

The **marked reaction vials (red)** contain VTEC DNA as well as the primers. These are used for the **inhibition controls ITC** (checking the extracted sample DNA for inhibitors). The marked reaction vials are also used for the **positive controls PTC** (checking the functionality of MasterMix).

Place **12.5 µl of double concentrated MasterMix** into the reaction vial and add **12.5 µl of the DNA sample extract**. The MasterMix already contains polymerase, nucleotides and magnesium chloride in optimum concentrations. The target sequence is then amplified in a PCR thermocycler and the resulting amplicate (stx1: 282 bp / stx2: 584 bp) made visible in agarose gel electrophoresis using ethidium bromide.

2. Package contents

The test kit contains:

- 6 x **strips (colourless)** with 8 x 0.2 ml reaction vials each (48 reaction vials), coated with specific primers (for sample determinations and for the negative controls NTC)
- 6 x **strips (red)** with 8 x 0.2 ml reaction vials each (48 reaction vials), coated with specific primers and additionally VTEC stx1 and VTEC stx2 DNA (for the inhibition controls ITC and positive controls PTC)

3. Additionally required instruments and reagents

Instruments

- 37 °C (98.6 °F) incubator
- vortexer
- biocentrifuge, min. 14,000 x g (for 1.5 ml and 2.0 ml reaction vials)
- PCR thermocycler:**
 - gel, e.g. Eppendorf MasterCycler with heating block for 0.2 ml reaction vials
- gel chamber with power pack and gel documentation system
- microliter pipettes 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl, e.g. Gilson Pipetman P with filter tips
- 1.5 ml or 2.0 ml reaction vials

Reagents

Dilution buffer

- modified Tryptose Soy Bouillon with Novobiocin (mTSNB) according to LFGB § 64 L 00.00 - 92

DNA extraction

- ethanol >95 % (denatured)
- 0.1 x TE - buffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0.1 mmol / l)
- water deionised, DNA free
- DNA-extraction kit, e.g. PCRFast[®] Microbe Extraction

PCR

for gel detection

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended)

z. B. AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix, Applied Biosystems Nr. 4318739; Qiagen HotStarTaq MasterMix Kit Qiagen Nr. 203443; Brilliant II QPCR MasterMix, Stratagene Nr. 600804

Detection

- agarose
- ethidium bromide
- buffer for gel fabrication, gel overlaying, and electrophoresis running buffer: 1 x TAE - buffer (Tris 40 mmol / l, acetic acid 20 mmol / l, EDTA 1 mmol / l)
- gel loading buffer, e.g. 5 - fold (sucrose 5%, Orange G 0.25%)
- DNA length marker, range 50 - 1000 bp

4. Precautions

- all tasks should be performed taking all precautions common in labs, and all PCR tasks should be performed in accordance with the CEN / ISO recommendations
- to avoid carryovers, perform all work wearing protective gloves and use filter tips
- perform sample preparation, PCR setup and detection in separate rooms
- ethidium bromide is damaging to DNA and should therefore be handled in compliance with the regulations
- UV light is damaging to DNA, so take care when using the UV transilluminators

5. Storage instructions

Store the test kit and the reaction vials at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F).

6. Sample enrichment and DNA isolation

6.1. Enrichment

Foodstuff samples are enriched according to § 64 of the German Foodstuffs and Animal Feed Code (LFGB).

6.1.1. Enrichment

For enrichment of solid foodstuff samples are weighed in a sterile stomacher bag, diluted at a ratio of 1 : 10 (w / v) with dilution buffer (see 3.) and homogenised (e.g. 10 g sample + 90 ml dilution buffer). Incubated at 37 °C (98.6 °F) over night.

6.2. DNA isolation

For DNA extraction, take 1 ml from 6.1.1. and prepare the DNA accordingly to manual of the extraction kit manufacturer (e.g. the protocol of the PCRFast[®] Microbe Extraction kit).

6.3. Note

Pyrolyse is not advisable after enrichment in lauryl - sulfat broth.

6.4. Confirming suspect colonies

To confirm suspect colonies on solid culture medium, it suffices to slurry one loop of this colony in 0.2 ml of deionized water and heat it at 95 °C (203 °F) for 10 min. The sample is then cooled and centrifuged at 14,000 x g for 5 min. The supernatant can be used directly for PCRFast®.

7. PCR setup

7.1. Preparations

- remove strip from the plastic bag and separate required number of reaction vials
- place the remaining strips / reaction vials and the desiccant back into the bag, seal bag and store at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F)
- have the required amount of MasterMix at hand (12.5 µl per reaction)

7.2. Procedure

- pipette the following volumes into the reaction vials:

per sample	reaction vial	MasterMix	DNA from sample
	colourless	12.5 µl	12.5 µl
inhibition control ITC	red	12.5 µl	12.5 µl
per analysis run	reaction vial	Master-Mix	0.1 x TE buffer
negative control NTC	colourless	12,5 µl	12.5 µl
positive control PTC	red	12.5 µl	12.5 µl

Tab. 1: PCRFast® VTEC pipetting steps

- close the reaction vials (centrifuging recommended) and place them into the PCR thermocycler. Perform amplification according to the following temperature / cycler profile:

Cycler profile

15 min	95 °C (203 °F)	
15 sec	95 °C (203 °F)	
30 sec	60 °C (140 °F)	45 cycles
45 sec	72 °C (161.6 °F)	

Note:

Validation was performed using AmpliTaq Gold® PCR MasterMix by Applied Biosystems and the thermocycler specified in section 4. The specified cycler profile may need to be adjusted to the respective instrument and the MasterMix.

7.3. Detection

7.3.1. Gel detection

- we recommend electrophoresis in 2.0 - 2.5 % agarose and staining the amplificate with ethidium bromide
- perform gel electrophoresis according to the manufacturer's instructions

Example:

- fabricate agarose gel 2.0 % - 2.5 % (dissolve 1.0 - 1.25 g agarose and 2 - 4 µl ethidium bromide 10 mg / ml in 50 ml of 1 x TAE buffer by heating and pour gel
- overlay agarose gel with 1 x TAE buffer
- apply PCR amplificate with gel loading buffer to the agarose gel, e.g. add 6 µl of the 5 x loading buffer to the PCR amplificate (25 µl), mix and apply 10 µl
- apply length markers
- perform electrophoresis at 3 - 6 V / cm (depending on electrophoresis system) for 15 - 30 min
- visualize DNA on a transilluminator and document results

8. Evaluation

8.1. Gel detection

- The following table summarizes the evaluation. With a positive sample, the sample band of one toxin or the sample bands of both toxin and the bands of the positive control are at the same level.

8.1.1. Evaluation matrix for gel detection

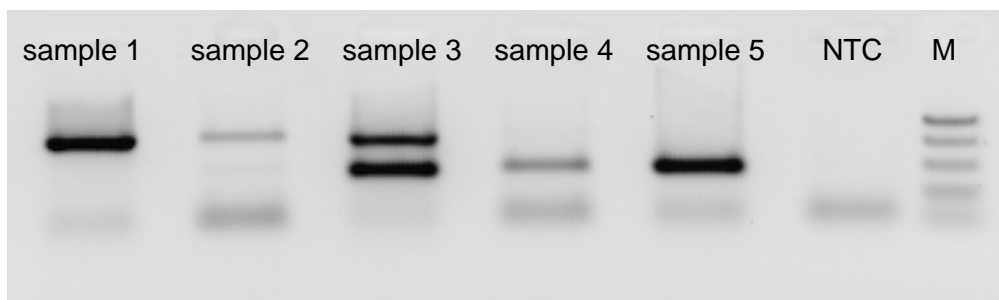
Sample	Inhibition control ITC	negative control NTC	positive control PTC	Result
██████	██████			sample positive
no band	██████			sample negative
no band	no band			inhibition*
		no band		MasterMix not contaminateded
			██████	MasterMix functional

* dilute extracted sample DNA once more and amplify again; ██████ = band

Tab. 2: Evaluation of PCRFast® VTEC gel detection

8.1.2. Example of a typical agarose gel image

– The following figure shows an exemplary agarose gel image.



sample 1 to sample 2: VTEC stx2 positive
 sample 3: VTEC stx1 und stx2 positive (equal to positive control)
 sample 4 to sample 5: VTEC stx 1 positive
 NTC: negativ control
 M: marker (50 bp, 150 bp, 300 bp, 500pb, 766 bp)

Fig. 1: Example of a PCRFast® VTEC agarose gel image

9. Sensitivity

The Limit of detection is < 10 copies per reaction. Regarding shigatoxin producing Escherichia coli (VTEC stx 1 / 2) in food the detection limit is less than 1 shigatoxin producing Escherichi coli in 25 g sample.

10. Specificity

PCRFast[®] VTEC is specific for Shigatoxin producing Escherichia coli (VTEC stx1 and stx2). The following species have been tested for cross - reactivity with at least 2500 copies each:

Species		Species		Species	
VTEC stx1	+	VTEC stx2	+	Escherichia coli	-
Yersinia enterocolitica	-	Legionella pneumophila	-	Campylobacter jejuni	-
Staphylococcus aureus	-	Bacillus cereus	-	Salmonellae	-
Clostridium perfringens	-	Listeria monocytogenes	-	Legionella erythra	-

Tab. 4: Specificity of PCRFast[®] VTEC

- + band with 282 / 584 bp
- + no band with 282 / 584 bp

Should you have any questions on how to conduct this test, on sample preparations or on PCR analysis in general, please contact the Competence Centre for DNA Analysis of ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com

Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0

Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50

You will also find more information on conducting PCRFast[®] at www.produktqualitaet.com.



These specifications are based on our current state of knowledge and are designed to provide information about our products and their potential applications. They are not intended to guarantee certain product properties or suitability for a specific application. ifp does not accept any liability except for the standard quality of the reagents. Replacement will be provided for any defective products. ifp is not liable for any other claims concerning direct or indirect damage or costs arising from the use of the products.

11. Literatur

Herbert Schmidt, Caren Geitz, Phillip I. Tarr, Matthias Frosch, and Helge Karch, “Non-O157:H7 Pathogenic Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli*: Phenotypic and Genetic Profiling of Virulence Traits and Evidence for Clonality”, *The Journal of Infectious Diseases* 1999;179:115–23

Beutin, L., „Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, Causes und Effects of the Rise of a Human Pathogen“. *Journal Vet. Med. B* 53, Blackwell Verlag, Berlin, 2006, S. 299-303

Beutin, L.; Miko, A.; Krause, G.; Pries, K.; Haby, S.; Steege, K.; Albrecht, N. „Identification of human pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes“. *Appl. Environ Microbiol.*, 73 (15), 2007, S. 4769-4775

ISO 22174

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - General requirements and definitions

ISO 20837

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for sample preparation and qualitative detection

ISO 20838

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods