



PCRFast[®]
Enterobacter sakazakii

Realtime (SYBR[®] Green) und / oder Gel
Realtime (SYBR[®] Green) and / or Gel

IF/MG1019

Deutsch Seite 2
English Page 16

Kurzinformation

Einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in Realtime (SYBR[®]Green) und / oder mit Geldetektion in Lebensmitteln und Futtermitteln (Nachweis des rpsU – dnaG Gen Übergangs mit 78 bp). Mit dem Test können 96 Reaktionen durchgeführt werden. Alle Reaktionsgefäße enthalten ein spezifisches Primerpaar.

48 Reaktionsgefäße (rote Markierung) enthalten zusätzlich *Enterobacter sakazakii*- DNA zur Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte (ITC) und für die Schmelzkurvenanalyse.

Zeitbedarf:	Anreicherung.....	ca. 24 h
(10 Proben)	DNA - Extraktion.....	25 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[®] Enterobacter sakazakii ist ein einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von Enterobacter sakazakii in Lebensmitteln und Futtermitteln (Nachweis des rpsU – dnaG Gen Übergangs mit 78 bp). Der Vorschlag zur Durchführung entspricht den internationalen Standards (ISO) für die PCR Analytik sowie den offiziellen Vorschriften nach § 64 LFGB.

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

Die **nicht markierten Reaktionsgefäße (farblos)** werden für den Nachweis von **Enterobacter sakazakii - 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 Enterobacter sakazakii - DNA. Diese werden für die **Inhibitionskontrollen ITC** (Überprüfung der extrahierten Proben - DNA auf Inhibitoren) sowie für die Schmelzkurvenanalyse 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. Bei Durchführung in Realtime enthält der MasterMix zusätzlich SYBR[®]Green. Die Zielsequenz wird dann in einem PCR - Thermocycler amplifiziert und dabei das gebildete Amplifikat in Realtime (SYBR[®]Green) und / oder mittels Agarose - Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Bei Realtime (SYBR[®]Green) müssen positive Reaktionen über Schmelzkurvenanalyse verifiziert werden. Dazu werden die **Maxima der Schmelzkurven von Probe** und **Inhibitionskontrolle (ITC)** miteinander verglichen. Mit Hilfe der Agarose - Gelelektrophorese kann das Amplifikat zusätzlich über die Basenlänge verifiziert werden.

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 Enterobacter sakazakii- DNA (für die Inhibitionskontrollen ITC und Positivkontrollen PTC)

3. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

Geräte und Labormaterialien

- Homogenisierer (Stomacher)
- Stomacher - Beutel, steril
- Messzylinder, steril
- Erlenmeyerkolben, steril
- Kulturröhrchen, steril
- Brutschrank 37 °C
- Vortexer
- Biozentrifuge, mind. 14.000 x g (für 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße)
- **PCR - Thermocycler:**
 - Gel z. B. Eppendorf MasterCycler mit Heizblock für 0,2 ml Reaktionsgefäße
 - Realtime z.B. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P jeweils mit Software für die Schmelzkurvenanalyse
- 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

Voranreicherung

- steriles deionisiertes Wasser (vorgewärmt auf 45 °C)

Selektivanreicherung

- Enterobacteriaceae Anreicherungs Bouillon (EE – Broth; Becton Dickinson) oder adäquate in gängigen Vorschriften beschriebene Nährmedien

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

nur für die Gelddetektion

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

für die Gelddetektion und / oder Realtime (SYBR[®]Green)

zweifach konzentrierter MasterMix (Hotstart empfohlen)

z. B. Power SYBR[®] Green PCR MasterMix, Applied Biosystems Nr. 4367659; QuantiTect SYBR[®]Green PCR Kit Qiagen Nr. 204143; Brilliant II SYBR[®] Green MasterMix Stratagene Nr. 600548

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. Voranreicherung

25 g (ml) einer Lebensmittelprobe werden in einen sterilen Stomacher - Beutel eingewogen, 1 : 10 (w / v) mit deionisiertem Wasser (vorgewärmt) verdünnt und über Nacht bei 37 °C bebrütet (z. B. 25 g Probe + 225 ml Wasser).

Bei jeder Analysenserie sollte ein Ansatz ohne Matrixzugabe als Extraktionskontrolle mitgeführt werden. Eine positive Extraktionskontrolle zeigt eine Kontamination der Reagenzien an.

6.1.1. Selektivanreicherung

10 ml der Voranreicherung werden zu 90 ml Enterobacteriaceae – Anreicherungs - Bouillon gegeben und 24 h bei 37 °C bebrütet.

6.2. DNA – Isolierung

Thermisches Extraktionsverfahren

- 1) für die DNA - Extraktion wird 1 ml aus der Anreicherungskultur (6.1.2.) entnommen und 10 min. bei 14.000 x g zentrifugiert, der Überstand wird verworfen
- 2) das Pellet in 200µl 0,1 x TE – Puffer resuspendieren, 10 min. bei 14.000 x g zentrifugieren und den Überstand verwerfen
- 3) das Pellet erneut in 200 µl 0,1 x TE – Puffer resuspendieren
- 4) thermische Lyse: Pellet 15 min. bei 95 °C erhitzen
- 5) Lysat abkühlen (z.B. 1-2 min bei -20°C)
- 6) Lysat kräftig vortexen, 5 min bei 14.000 x g zentrifugieren
- 7) den Überstand (enthält die DNA) in ein neues Reaktionsgefäß überführen

Nach der DNA - Extraktion wird den Überstand 1 : 10 (w / v) mit 0,1 x TE - Puffer verdünnt und für die PCRFast Reaktion eingesetzt (z.B. 10 µl Überstand + 90 µl 0,1 x TE – Puffer).

Alternativ können konventionell erhältliche Extraktionssysteme verwendet werden (z.B. PCRFast[®] Microbe Extraction).

6.3. 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® Enterobacter sakazakii

- 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

60 sec 62 °C **45 Zyklen**

Anmerkung:

Die Validierung wurde mit AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (für die Geldetektion) und Power SYBR® Green PCR Master Mix (für die Geldetektion und / oder Realtime) 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. Detektion

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

7.3.2. Realtime (SYBR®Green)

- die Auswertung der Amplifikation in Realtime (SYBR® Green) erfolgt über den Amplificationplot und Schmelzkurvenanalyse
- negative Proben können aussortiert werden
- ist ein Fluoreszenzanstieg im Amplificationplot sichtbar, muss die Probe über die Schmelzkurvenanalyse verifiziert werden
- dabei wird die Schmelzkurve der Probe mit der Schmelzkurve der Inhibitionskontrolle (ITC) verglichen
- bei positiven Proben müssen die Maxima der Schmelzkurven von Probe und Inhibitionskontrolle (ITC) übereinstimmen (Abweichung ± 0,5 °C)
- um eine positive Probe zusätzlich über die Basenlänge zu verifizieren, empfiehlt sich eine Elektrophorese in 2,0 - 2,5 % Agarose und Anfärbung des Amplifikates mit Ethidiumbromid

8. Auswertung

8.1. Geldetektion

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung zusammengefasst. Bei einer positiven Probe liegt die Bande der Probe und die Bande 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® Enterobacter sakazakii Geldetektion

8.1.2. Beispiel für ein typisches Agarosegelbild

– Im Folgenden ist ein Agarosegelbild exemplarisch dargestellt.

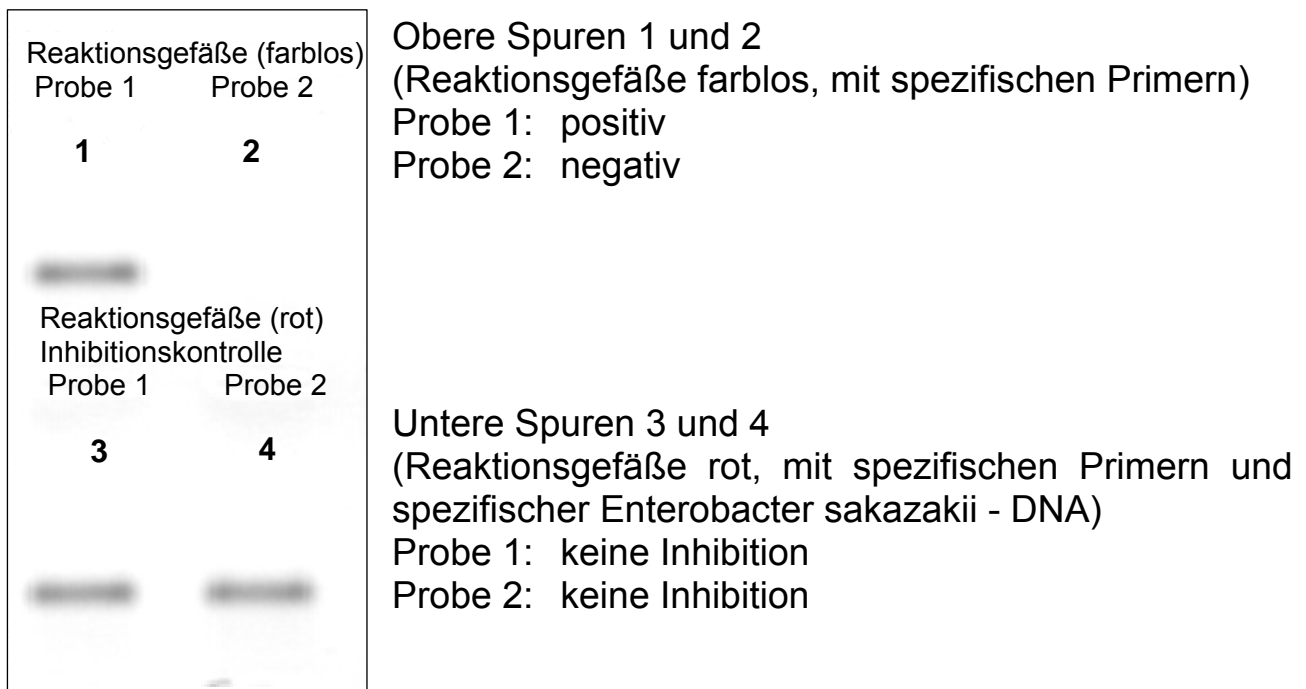


Abb. 1: Beispiel für ein Agarosegelbild PCRFast® Enterobacter sakazakii

8.2. Realtime (SYBR®Green)

8.2.1. Auswertematrix Realtime (SYBR®Green)

Probe	Inhibitions- kontrolle ITC	Ergebnis
keine Amplifizierung	Amplifizierung + Schmelzkurve	Probe negativ
Amplifizierung + Schmelzkurve, aber Schmelz- temperaturunter- schied zur ITC ($\geq 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$)	Amplifizierung + Schmelzkurve	Probe negativ
Amplifizierung + Schmelzkurve mit gleicher Schmelz- temperatur zur ITC ($\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$)	Amplifizierung + Schmelzkurve	Probe positiv
keine Amplifizierung	keine Amplifizierung	Inhibition*

Negativ-kontrolle NTC	Positiv-kontrolle PTC	Ergebnis
keine Amplifizierung		MasterMix nicht kontaminiert
	Amplifizierung + Schmelzkurve	MasterMix funktionsfähig

* extrahierte Proben - DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

Tab. 3: Auswertung PCRFast® E. sakazakii (Realtime SYBR®Green)

8.2.2. Beispiele für die Auswertung der Amplifikationplots

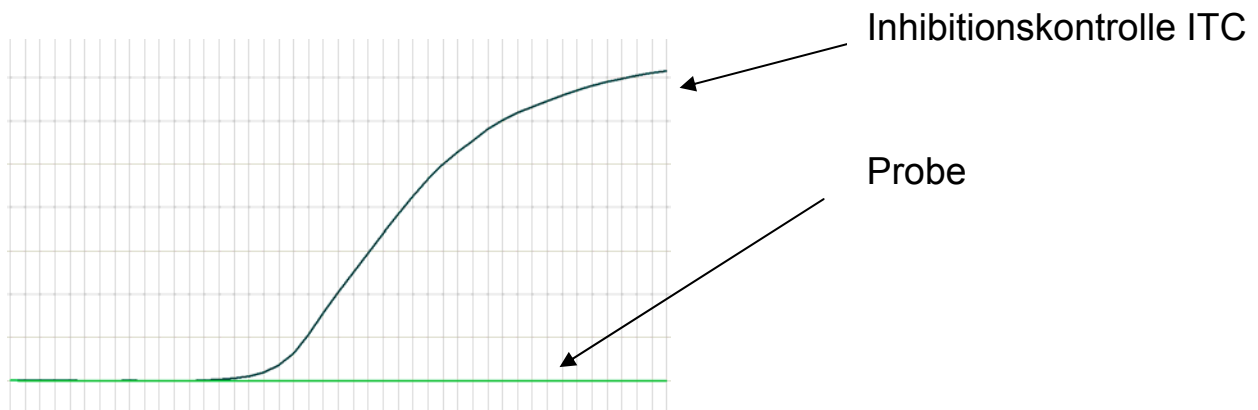


Abb. 2: Probe ist negativ (keine Amplifizierung der Probe)

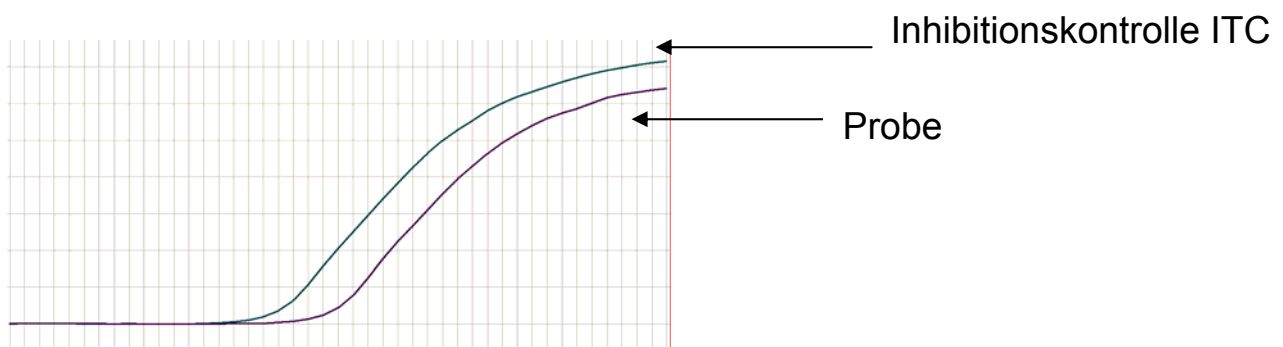


Abb. 3: Probe ist positiv, aber Ergebnisverifizierung über Schmelzkurvenanalyse (Vergleich mit der Inhibitionskontrolle ITC)

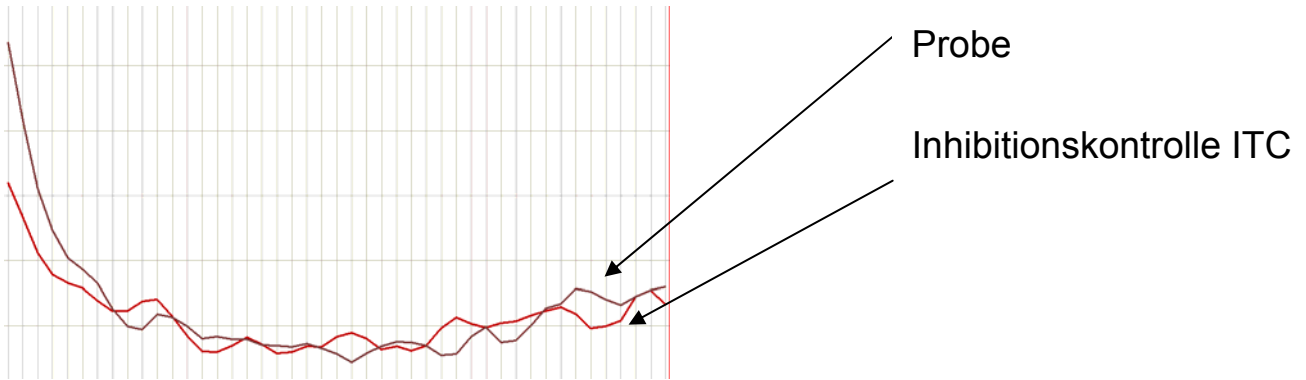


Abb. 4: Inhibition der Reaktion, isolierte DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

8.2.3. Beispiele für die Auswertung der Schmelzkurven

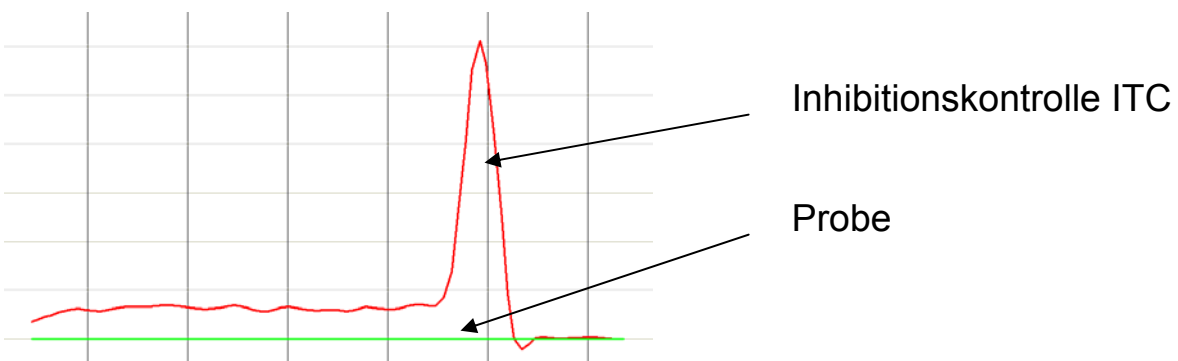


Abb. 5: Probe ist negativ (keine Schmelzkurve der Probe)

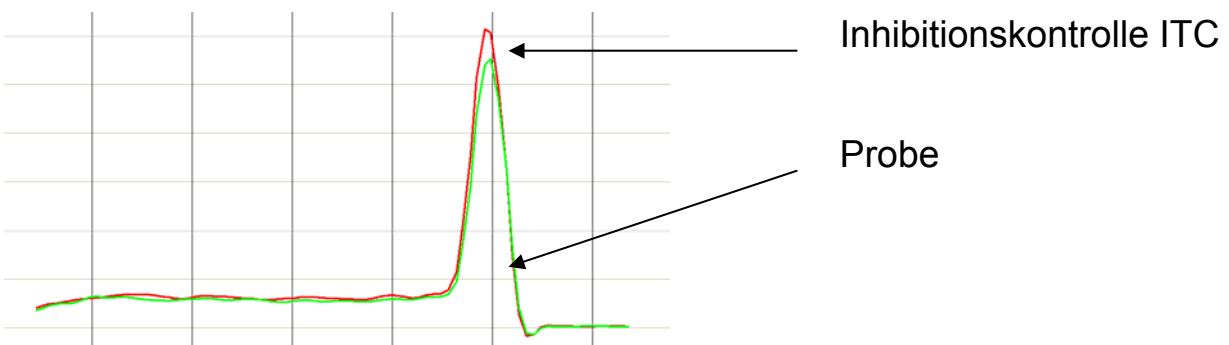


Abb. 6: Probe ist positiv; Probe und Inhibitionskontrolle ITC zeigen dieselbe Schmelzkurve

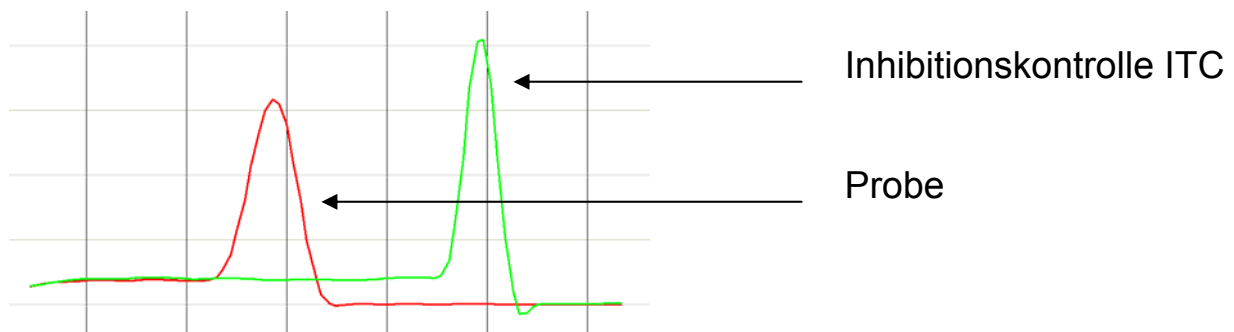


Abb. 7: Probe ist negativ (Probe zeigt im Vergleich zur Inhibitionskontrolle ITC eine unterschiedliche Schmelzkurve)

9. Sensitivität

Nachweisgrenze: weniger als 1 *Enterobacter sakazakii* in 25g Probenmaterial.

10. Spezifität

PCRFast[®] *Enterobacter sakazakii* ist spezifisch auf *Enterobacter sakazakii* und Shigellen. Folgende Spezies wurden mit jeweils mindestens 2500 Kopien auf Kreuzreaktivität getestet:

Spezies		Spezies		Spezies	
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	<i>Legionella pneumophila</i>	-
Salmonellen	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Legionella erythra</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
VTEC stx1	-	VTEC stx2	-		

Tab. 4: Spezifität PCRFast[®] *Enterobacter sakazakii*

- + Bande mit 78 bp
- keine Bande mit 78 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

Seo, K. H. et al.

“Rapid, Specific Detection of Enterobacter sakazakii in Infant Formula Using a Real – Time PCR Assay” Journal of Food Protection, 68 No.1, 59-63

**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[®] Enterobacter sakazakii Realtime (SYBR[®]Green) and / or gel detection

Brief information

Simple, molecular biological test (PCR) for detecting Enterobacter sakazakii in foodstuffs and animal feed in realtime (SYBR[®]Green) and / or gel detection (detection of the intergenic sequenz from rpsU - dnaG gene with 78 bp). The test kit has 96 reaction vials, each reaction vial contains a specific primer pair.

48 reaction vials (red marking) contain additionally Enterobacter sakazakii DNA for investigating possible inhibiting effects (ITC) and for melting curve analysis.

Time required:	enrichment.....	approx. 24 h
	extraction.....	25 min
(10 samples)	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[®] Enterobacter sakazakii is a simple, molecular biological test (PCR) for detecting Enterobacter sakazakii in foodstuffs and animal feed (detection of the intergenic sequence from rpsU - dnaG gene with 78 bp). The analytical procedure described here complies with the international standards (ISO) for PCR analysis and the § 64 of the German Foodstuffs and Animal Feed Code (LFGB).

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 **Enterobacter sakazakii DNA in the extracted sample** and for the **negative controls NTC** (checking the MasterMix for contamination).

The **marked reaction vials (red)** contain Enterobacter sakazakii DNA as well as the primers. These are used for the **inhibition controls ITC** (checking the extracted sample DNA for inhibitors) and for the melting curve analysis. 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. In realtime the MasterMix contains additionally SYBR[®]Green. The target sequence is then amplified in a PCR thermocycler and the resulting amplificate made visible in realtime (SYBR[®]Green) and / or agarose gel electrophoresis using ethidium bromide. With realtime (SYBR[®]Green), positive reactions need to be verified via melting curve analysis. To do so, the melting curve peaks of the sample are compared to those of the **inhibition control ITC**. The amplificate can additionally be verified by means of agarose gel electrophoresis via the base length.

2. Package contents

The test kit contains:

- 6 x **strips (colourless)** with eight 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 eight 0.2 ml reaction vials each (48 reaction vials), coated with specific primers and additionally *Enterobacter sakazakii* DNA (for the inhibition controls ITC and positive controls PTC)

3. Additionally required instruments and reagents

Lab material and instruments

- homogenizer (Stomacher)
- stomacher bag, sterile
- measuring cylinder, sterile
- erlenmeyer flask, sterile
- culture tube, sterile
- 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
 - Realtime, e.g. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P with software for the melting curve analysis each
- 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

Pre - Enrichment

- sterile deionized water (prewarmed to 45 °C)

Enrichment

- Enterobacteriaceae enrichment broth (EE - broth; Becton Dickinson)

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

only for gel detection

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended)

e.g. AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix, Applied Biosystems No. 4318739; Qiagen HotStarTaq MasterMix Kit Qiagen No. 203443; Brilliant II QPCR MasterMix, Stratagene No. 600804

for gel detection and / or Realtime (SYBR[®]Green)

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended)

e.g. Power SYBR[®] Green PCR MasterMix, Applied Biosystems No. 4367659; QuantiTect SYBR[®]Green PCR Kit Qiagen No. 204143; Brilliant II SYBR[®] Green MasterMix Stratagene No. 600548

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. Pre - Enrichment

25 g (ml) of a foodstuff sample is weighed in a sterile stomacher bag, diluted at a ratio of 1 : 10 (w / v) with sterile deionized water (prewarmed) and incubated at 37 °C (98.6 °F) over night (e.g. 25 g sample + 225 ml water).

With each analyzing series one sample without matrix should be done as an extraction control. A positive extraction control indicates a contamination in the reagents.

6.1.1. Selective enrichment

10 ml of the pre - enrichment from 6.1. is transferred to 90ml Enterobacteriaceae – Enrichment – Broth and incubated at 37 °C (98.6 °F) 24 h.

6.2. DNA isolation

Thermal Extraction procedure

- 1) for DNA - extraction take 1 ml from the enrichment culture (6.1.2.) and centrifuge at 14,000 x g for 10 min, discard supernatant
- 2) resuspend the pellet in 200 µl 0,1 x TE – buffer, centrifuge at 14,000 x g for 10 min, discard supernatant
- 3) resuspend the pellet again in 200 µl 0,1 x TE – buffer
- 4) thermal lysis: heat the pellet for 15 min. at 95 °C (203 °F)
- 5) cool down the solution (e.g. 1-2 min at - 20 °C (- 4 °F))
- 6) mix the solution and centrifuge at 14,000 x g for 5 min
- 7) transfer the supernatant (contains the DNA) in a new reaction vial

After the extraction the supernatant has to be diluted with a ratio of 1 : 10 with 0.1 x TE – buffer and can be used for the PCRFast[®] reaction (e.g. 10 µl supernatant + 90 µl 0,1 x TE – buffer).

Moreover every conventional extraktionsystem can be used for the DNA – extraction (e.g. PCRFast[®] Microbe Extraction).

6.3. 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[®] Enterobacter sakazakii 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

10 min	95 °C (203 °F)	
15 sec	95 °C (203 °F)	
60 sec	62 °C (143.6 °F)	45 cycles

Note:

Validation was performed using AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix (for the gel detection) and Power SYBR[®] Green PCR MasterMix (for realtime and / or gel detection) by Applied Biosystems and the thermocyclers specified in section 3. 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

7.3.2. Realtime (SYBR[®] Green)

- assessment of the amplification in realtime (SYBR[®] Green) is done via the amplification plot and the melting curve analysis
- negative samples can be sorted out

- if the amplification plot shows an increase in fluorescence, the sample must be verified via the melting curve analysis
- to do so, compare the sample melting curve with the melting curve resulting from the inhibition control ITC
- with positive samples, the sample's melting curve peak must agree with the melting curve peak of the inhibition control ITC (temperature deviance not more than ± 0.5 °C (0.9 °F))
- in order to additionally verify a positive sample via the base length, we recommend performing an electrophoresis in 2.0 % - 2.5 % agarose gel and staining the amplification product with ethidium bromide

8. Evaluation

8.1. Gel detection

The following table summarizes the evaluation. With a positive sample, the sample band and the band 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

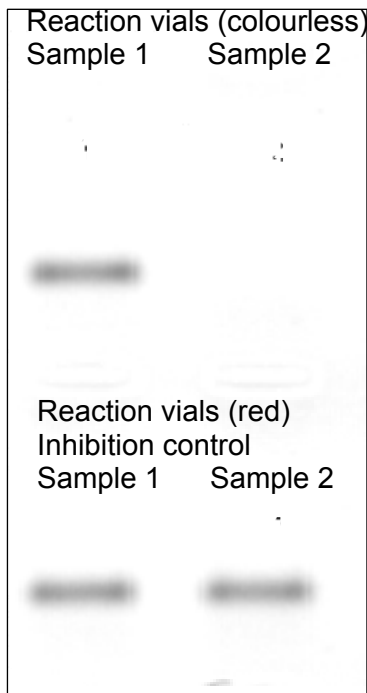
* dilute extracted sample DNA once more and amplify again

██████ = band

Tab. 2: Evaluation of PCRFast[®] Enterobacter sakazakii gel detection

8.1.2. Example of a typical agarose gel image

– The following figure shows an exemplary agarose gel image.



upper lanes 1 and 2
(reaction vials colourless, containing specific primers)
sample 1: positive
sample 2: negative

lower lanes 3 and 4
(reaction vials red, containing specific primers and specific *Enterobacter sakazakii* DNA)
sample 1: no inhibition
sample 2: no inhibition

Fig. 1: Example of a PCRFast[®] *E.sakazakii* agarose gel image

8.2. Realtime (SYBR[®] Green)

8.2.1. Realtime (SYBR[®] Green) evaluation matrix

Sample	Inhibition control (ITC)	Result
no amplification	amplification + melting curve	sample negative
amplification + melting curve, but different melting temperature than inhibition control ITC (≥ 0.5 °C)	amplification + melting curve	sample negative
amplification + melting curve with same melting temperature as inhibition control ITC (± 0.5 °C)	amplification + melting curve	sample positive

Negative control NTC	Positive control PTC	Result
no amplification	no amplification	inhibition*
no amplification		MasterMix not contaminated
	amplification + melting curve	MasterMix functional

* dilute extracted sample DNA once more and amplify again

Tab. 3: Evaluation of PCRFast® E.sakazakii (Realtime SYBR® Green)

8.2.2. Examples of amplification plot evaluation

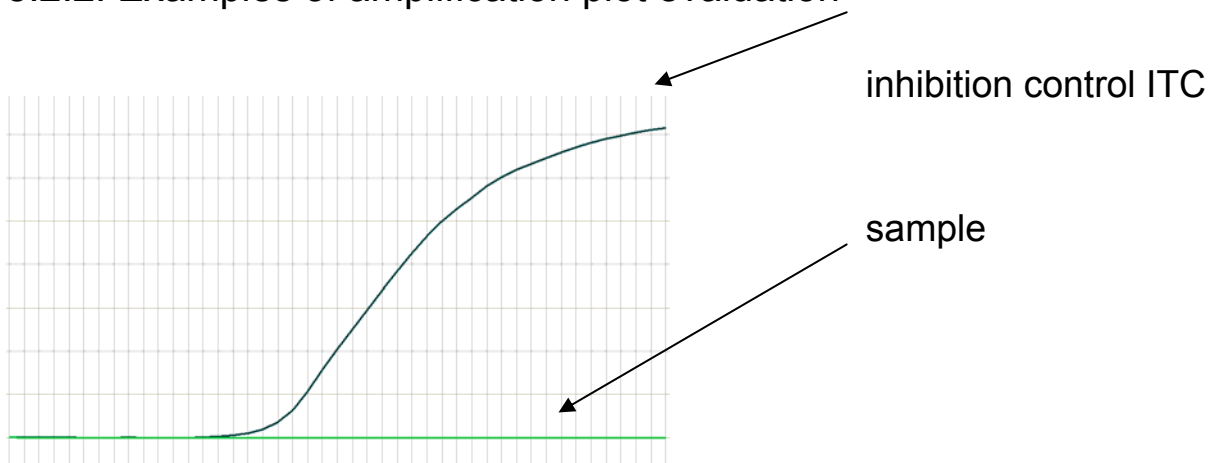


Fig. 2: sample negative; sample without amplification plot

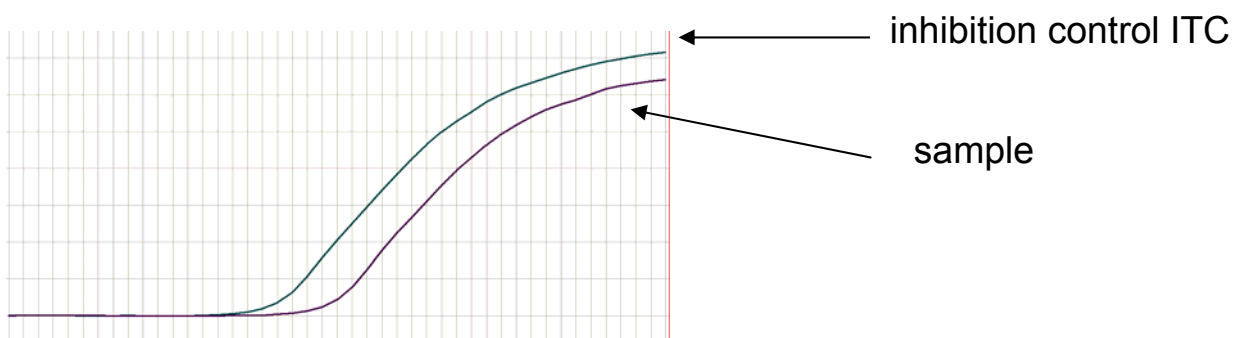


Fig. 3: sample positive, but result verification via melting curve analysis

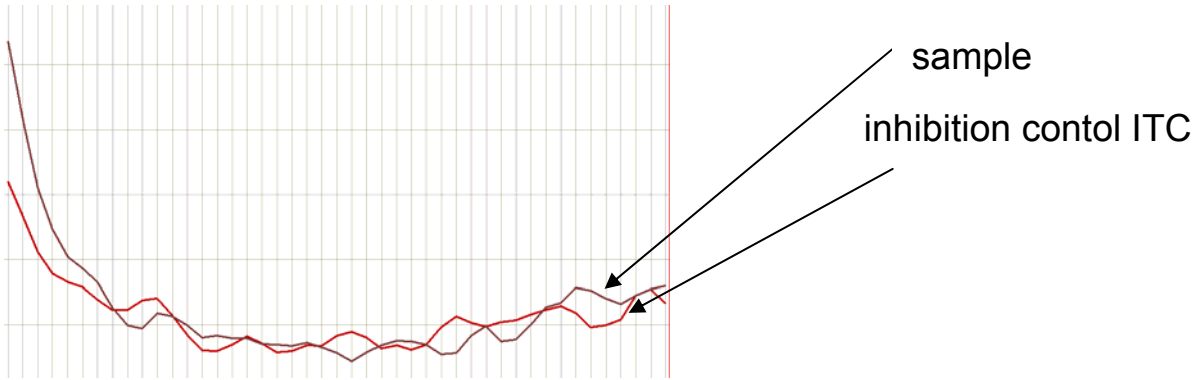


Fig. 4: reaction inhibition

8.2.3. Examples of melting curve evaluation

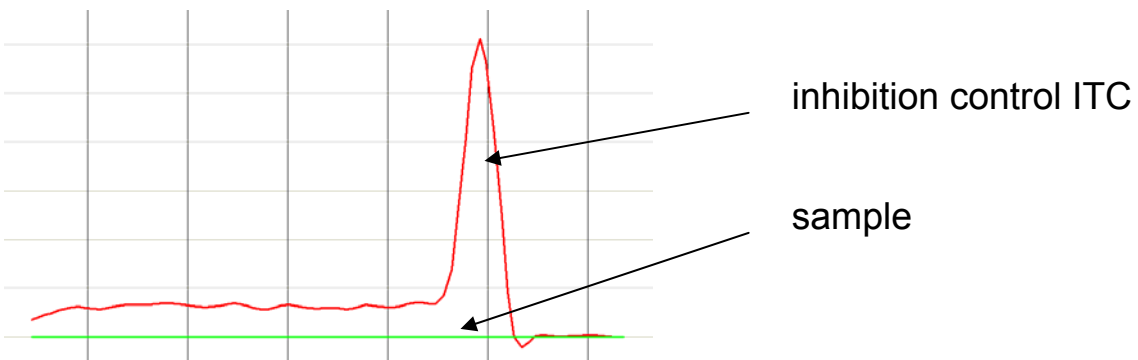


Fig. 5: sample negative; sample without melting curve

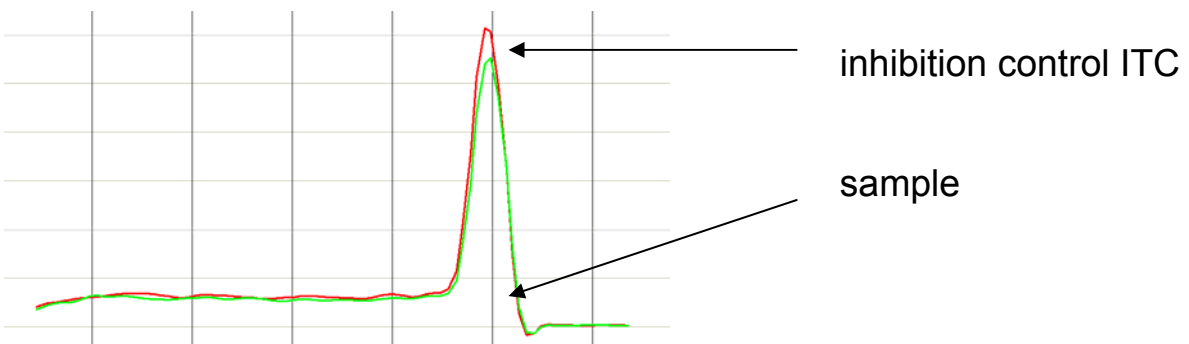


Fig. 6: sample positive; sample and inhibition control ITC with same melting curve

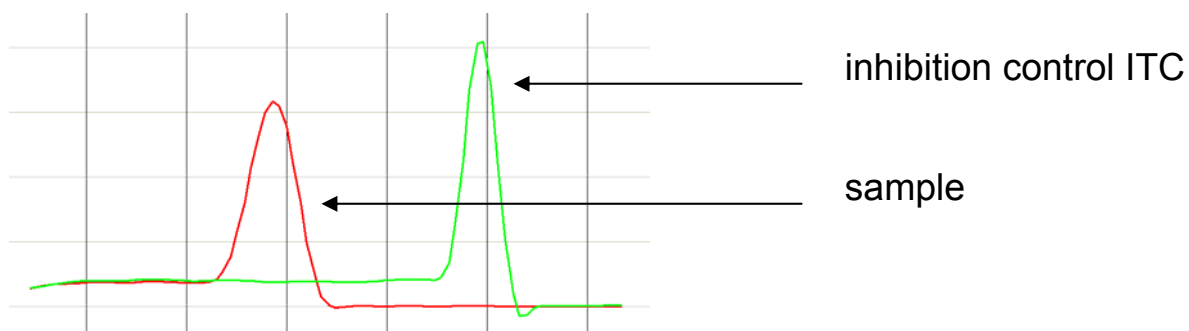


Fig. 7: sample negative; sample and inhibition control ITC with different melting curves

9. Sensitivity

Limit of detection: less than 1 *Enterobacter sakazakii* in 25 g sample.

10. Specificity

PCRFast[®] *Enterobacter sakazakii* is specific for *Enterobacter sakazakii* and *Shigella*. The following species have each been tested for cross-reactivity with at least 2500 copies:

species		species		species	
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	<i>Legionella pneumophila</i>	
Salmonellen	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Legionella erythra</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
VTEC stx1	-	VTEC stx2	-		

Tab. 4: Specificity of PCRFast[®] *Enterobacter sakazakii*

+ band with 78 bp

- no band with 78 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. References

Seo, K. H. et al.

“Rapid, Specific Detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula Using a Real – Time PCR Assay” *Journal of Food Protection*, 68 No.1, 59-63

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