



**PCRFast<sup>®</sup>  
VTEC**

**Realtime (Sonde)  
Realtime (probe)**

**IF/MR1004**

Deutsch ..... Seite 2  
English ..... Page 13

## Kurzinformation

Einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum qualitativen Nachweis von Shigatoxin bildenden Escherichia coli in Realtime (Fam Sonde mit nicht fluoreszierendem Quencher) in Lebensmitteln (Nachweis der Gene für stx1 und stx2). Mit dem Test können 96 Reaktionen durchgeführt werden. Alle Reaktionsgefäße enthalten spezifische Primer, Sonden für die Analyse von Proben und Negativkontrollen (NTC) und eine interne Amplifikationskontrolle (ITC; HEX Sonde mit nicht fluoreszierenden Quencher) zur Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte.

8 Reaktionsgefäße (rote Markierung) enthalten zusätzlich VTEC stx1 und VTEC stx2 DNA für die Positivkontrolle (PTC).

Zeitbedarf:	Anreicherung.....ca. 18 h
(10 Proben)	DNA - Extraktion..... 45 min
	PCR-Ansatz.....15 min
	PCR.....1,5 h

### **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](http://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](http://www.produktqualitaet.com)

## 1. Testprinzip

PCRFast<sup>®</sup> VTEC ist ein einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von Shigatoxin bildenden Escherichia coli (VTEC stx1 und sxt2) 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 Primerpaare und Sonden in optimaler Menge und eine **interne Amplifikationskontrolle ITC** zur Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte.

Die **88 nicht markierten Reaktionsgefäße (farblos)** enthalten spezifische Primer und Sonden (Fam Sonde mit nichtfluoreszierendem Quencher) für den Nachweis von **VTEC - DNA in der extrahierten Probe**, sowie für die **Negativkontrollen NTC** (Überprüfung des MasterMixes auf Kontamination) und für die **Extraktionskontrolle ETC** (Überprüfung der Extraktion auf Kontamination).

Die **8 markierten Reaktionsgefäße (rot)** enthalten neben den Primern, Sonden und der ITC zusätzlich VTEC - DNA. Diese werden für die **Positivkontrollen PTC** (Überprüfung der Funktionalität des MasterMixes) verwendet.

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. Bei korrekter Amplikonsequenz hybridisiert die Sonde auf den vervielfältigten DNA-Abschnitten. Dabei werden Reporter (Fam/HEX) und Quencher (nicht fluoreszierend) der Sonde getrennt und der Reporter (Fam/HEX) sendet ein Fluoreszenzsignal (Fam:520 nm, HEX:553 nm) aus. Die Intensität dieses Signals steigt mit der Menge an neu gebildeter DNA an, wodurch sich bei vorhandener Zielsequenz ein Anstieg der Fluoreszenz messen und darstellen läßt. Bei nicht vorhandener Zielsequenz ist kein Fluoreszenzanstieg beobachtbar.

## 2. Packungsinhalt

Der Testkit enthält:

- 11 x **Streifen (farblos)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (88 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern und Sonde (für die Probenbestimmungen, Negativkontrollen NTC und Extraktionskontrollen ETC) und einer internen Amplifikationskontrolle.
- 1 x **Streifen (rot)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (8 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern, Sonde und VTEC stx1 / 2 DNA (für die Positivkontrollen PTC) und einer internen Amplifikationskontrolle.

## 3. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

### Geräte und Labormaterialien

- Homogenisierer (Stomacher)
- Stomacher - Beutel, steril
- Inkubator 56 °C und 70 °C
- Brutschrank 37 °C
- Vortexer
- Biozentrifuge, mind. 14.000 x g (für 2,0 ml Reaktionsgefäße)
- **PCR – Thermocycler Realtime:**
  - z.B. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P
- 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 (z.B.: OXOID Novobiocin - Selektiv - Supplement Art. – Nr. SR181, BD Tryptic – Soy - Broth Art. – Nr.211824)

#### 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**

### **Realtime**

zweifach konzentrierter MasterMix (Hotstart empfohlen),  
z. B. AmpliTaq Gold® PCR MasterMix, Applied Biosystems Nr. 4318739;  
Brilliant® II QPCR MasterMix, Stratagene Nr. 600804; QuantiTect Probe  
PCR Kit, Qiagen Nr. 204343

## **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

## **5. 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 (L00.00 – 92). Bei jeder Analysenserie sollte ein Ansatz ohne Matrixzugabe als Extraktionskontrolle mitgeführt werden. Eine positive Extraktionskontrolle zeigt eine Kontamination der Reagenzien an.

Zur Anreicherung von festen Lebensmitteln wird in einem sterilen Stomacher - Beutel eine 1:10 (w / v) Verdünnung mit Verdünnungslösung (siehe 3., z.B. 25 g Probe + 225 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).

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<sup>®</sup> 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
<b>Probe</b>	farblos	12,5 µl	12,5 µl
Pro Ansatz	Reaktionsgefäß	Master-Mix	0,1 x TE - Puffer
<b>Negativ-kontrolle NTC</b>	farblos	12,5 µl	12,5 µl
<b>Positiv-kontrolle PTC</b>	rot	12,5 µl	12,5 µl

Tab. 1: Pipettieransatz PCRFast<sup>®</sup> VTEC

- die Reaktionsgefäße verschließen (abzentrifugieren empfohlen) und in den PCR - Thermocycler stellen.

## 7.4. Geräteeinstellungen

Reporter:	Fam und HEX
Quencher:	keine Fluoreszenz
Referenzfarbstoff:	ROX (abhängig vom verwendeten MasterMix)

Für die Amplifikation folgendes Temperatur - / Cyclerprofil einstellen:

### –Cyclerprofil

10 min	95 °C	
15 sec	95 °C	
60 sec	60 °C	<b>45 Zyklen</b>

### Anmerkung:

Die Validierung wurde mit Brilliant® II QPCR Master Mix von Stratagene und den unter Punkt 3 genannten Thermocyclern durchgeführt. Eventuell muss das vorgegebene Cyclerprofil an das jeweilige Gerät und den MasterMix angepasst werden.

## 7.5. Detektion

- die Auswertung der Amplifikation erfolgt über den Amplificationplot
- prinzipiell soll die Auswertung über die Software der Realtime Thermocycler erfolgen. Ergeben die Voreinstellungen der Analysesoftware keine zufriedenstellenden Ergebnisse, lassen sich die Einstellungen für den „Threshold“ und die „Basislinie“ ändern.

## 8. Auswertung

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung zusammengefasst. Bei einer positiven Probe liegt der Fluoreszenzendwert der Amplifikationskurve deutlich über dem Threshold.

## 8.1. Auswertematrix

<b>Probe</b>	<b>Inhibitions- kontrolle ITC</b>	<b>Negativ- kontrolle NTC</b>	<b>Positiv- kontrolle PTC</b>	<b>Ergebnis</b>
<b>+</b>	<b>+</b>			Probe positiv
keine Amplifikation	<b>+</b>			Probe negativ
keine Amplifikation	keine Amplifikation			Inhibition*
		keine Amplifikation		MasterMix nicht kontaminiert
			<b>+</b>	MasterMix funktionsf.

\* extrahierte Proben - DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

+ = Amplifikationssignal

Tab. 2: Auswertung PCRFast® VTEC

## 8.2. Beispiele für die Auswertung der Amplifikationplots

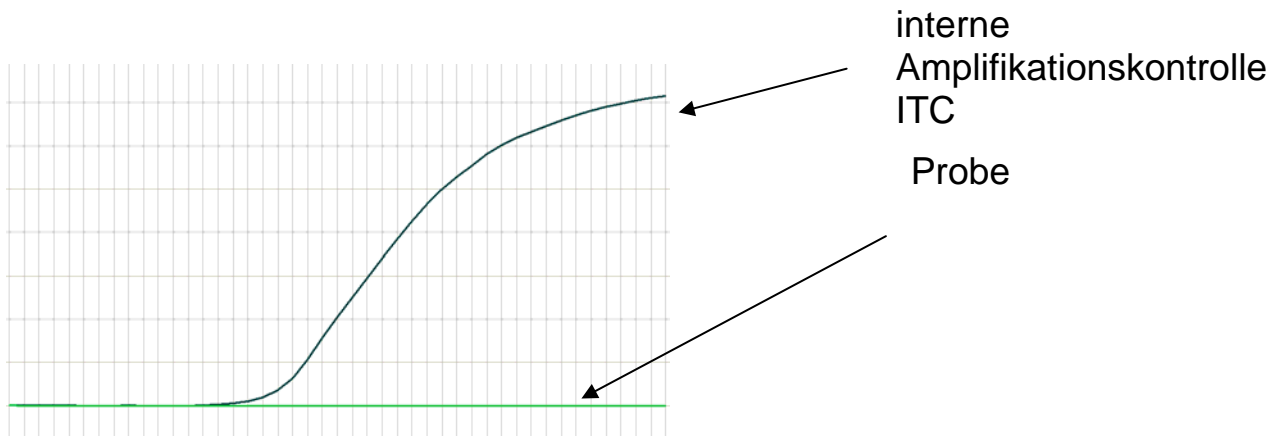


Abb. 1: Probe ist negativ (keine Amplifizierung der Probe)

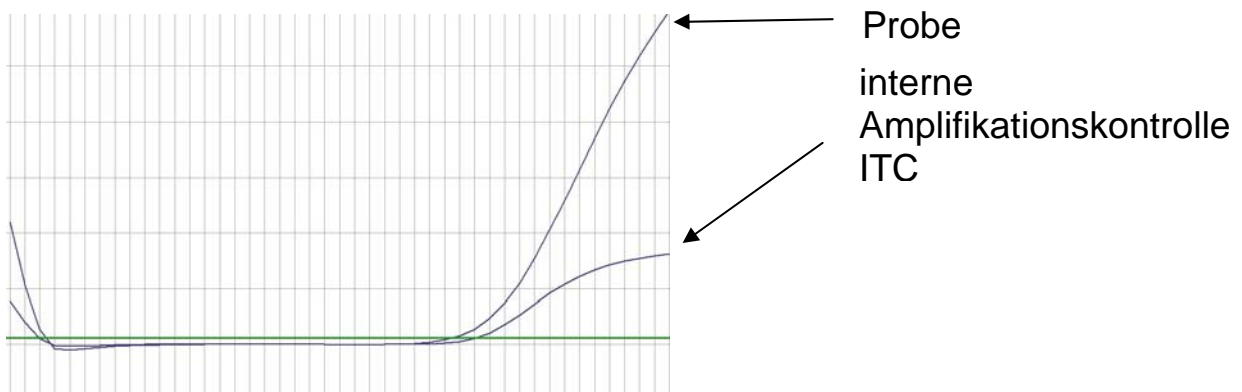


Abb. 2: Probe ist positiv

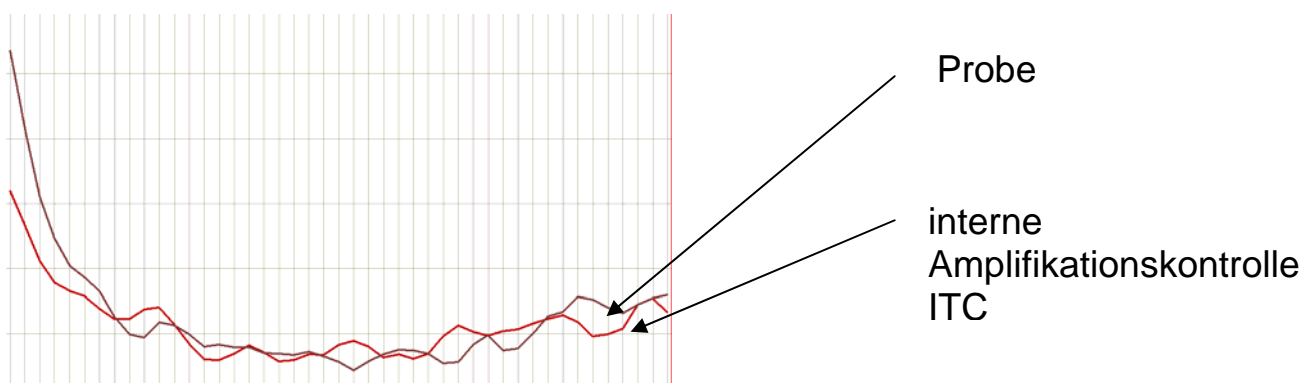


Abb. 3: Inhibition der Reaktion, isolierte DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

## 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 Shigatoxin bildende Escherichia coli in 25g Probe.

## 10. Spezifität

PCRFast<sup>®</sup> VTEC ist 100 % spezifisch auf VTEC stx1 und stx2. Folgende Spezies wurden mit mind. 2500 Kopien auf Kreuzreaktivität getestet:

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

Tab. 3: Spezifität PCRFast<sup>®</sup> VTEC

- + Amplifikation
- keine Amplifikation

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<sup>®</sup> finden Sie auch unter [www.produktqualitaet.com](http://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

**Schmidt H., Geitz C., Tarr P.I., Frosch M., Karch H.,**

“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**

L 00.00 - 92 „Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von Verotoxin-bildenden *Escherichia (E.) coli*-Stämmen (VTEC) in Lebensmitteln tierischer Herkunft“

### **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<sup>®</sup> VTEC Realtime (probe)

## Brief information

Simple, molecular biological test (PCR) for the qualitative detection of shigatoxin producing Escherichia coli in realtime (probe with Fam reporter and non fluorescence quencher) in foodstuffs (detection of the genes for stx1 and stx2). The test kit has 96 reaction vials, each reaction vial contains specific primers, probes for the analysis of the sample and the negative control (NTC) and an internal amplification control (ITC, probe with a HEX reporter and non fluorescence quencher) for investigating possible inhibiting effects (ITC).

8 reaction vials (red marking) contain additionally VTEC stx1 and VTEC stx2 DNA for PCR positive controls (PTC).

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

### PCRFast<sup>®</sup>

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](http://www.produktqualitaet.com)

### PCRFast<sup>®</sup>

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](http://www.produktqualitaet.com)

## 1. Principle of the test

PCRFast<sup>®</sup> VTEC is a simple, molecular biological test (PCR) for the qualitative detection of shigatoxin producing Escherichia coli (detection of the genes for 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 for the PCR reaction necessary specific primers and probes in an optimum amount and an **internal amplification control ITC** for investigating inhibitory effects.

The **88 colourless reaction vials** contain specific primers and probes (Fam reporter with non fluorescence quencher) are used for the detection of the **VTEC - DNA** in the extracted sample, for the **negative controls NTC** (checking the MasterMix for contamination) and for the **extraction control ETC** (check on extraction for contamination).

The **8 red coloured reaction vials** contain in addition to the primers, probes and the ITC **VTEC stx1/2 DNA**. These reaction vials are used for the **positive control PTC** (check on functionality of MasterMix).

**12.5 µl of double concentrated MasterMix** and, subsequently, **12.5 µl of the extracted DNA sample** is added into the reaction vial. The MasterMix contains an optimum concentration of polymerase, nucleotides and magnesium chloride. The target sequence is then amplified in a PCR thermocycler. Is the target present the probe hybridises on the built up DNA fragments. Thereby the reporter (Fam/HEX) and the quencher (non fluorescence) of the probe will be seperated and the reporter radiates a fluorescence signal (Fam: 520 nm, HEX: 553 nm). The intensity of the signal increases with the amount of synthesised DNA which could be measured and displayed. If the target sequence is not present no increase in the fluorecence is detectable.

## 2. Package contents

The test kit contains:

- 11 x **strips (colourless)** with 8 x 0.2 ml reaction vials each (88 reaction vials), coated with specific primers, probes (for sample determinations and for the negative controls NTC) and an internal amplification control
- 1 x **strips (red)** with 8 x 0.2 ml reaction vials each (8 reaction vials), coated with specific primers, probe and additionally VTEC DNA (for the positive controls PTC) and an internal amplification control

## 3. Additionally required instruments and reagents

### Lab material and instruments

- homogenizer (Stomacher)
- stomacher bag, 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:**
  - e.g. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P
- microliter pipettes 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl, e.g. Gilson Pipetman P, each 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 (e.g.: OXOID Novobiocin - Selektiv - Supplement Art. – Nr. SR181, BD Tryptic – Soy - Broth Art. – Nr.211824)

#### 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<sup>®</sup> Microbe Extraction

#### PCR

##### Realtime

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended),  
e.g. AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR MasterMix, Applied Biosystems No. 4318739;  
Brilliant<sup>®</sup> II QPCR MasterMix, Stratagene No. 600804; QuantiTect Probe  
PCR Kit, Qiagen No. 204343

## 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

## 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, L00.00 - 92).

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.

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. 25 g sample + 225 ml dilution buffer). Incubate 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<sup>®</sup> 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
sample	colourless	12.5 µl	12.5 µl
per analysis run	reaction vial	Master-Mix	0.1 x TE buffer
<b>negative control NTC</b>	colourless	12,5 µl	12.5 µl
<b>positive control PTC</b>	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.

### 7.3. Instrument settings

Reporter: Fam and HEX  
Quencher: non fluorescence  
Reference dye: ROX (depending on used master mix)

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	60 °C (140 °F)	<b>45 cycles</b>

#### **Note:**

Validation was performed using Brilliant® II QCR MasterMix by Stratagene and the thermocycler specified in section 3. The specified cycler profile may need to be adjusted to the respective instrument and the MasterMix.

### 7.5. Detection

- assessment of the amplification in realtime is done via the amplification plot
- in principle the evaluation should be done using the software of the realtime thermocycler. Are the results not satisfactory using the instrument presettings, the “threshold” and the “baseline” settings could be changed.

## **8. Evaluation**

The following table summarizes the evaluation. With a positive sample the final point of the fluorescence curve lies clearly above the threshold

## 8.1. Evaluation matrix

<b>Sample</b>	<b>Inhibition control (ITC)</b>	<b>Negative control NTC</b>	<b>Positive control PTC</b>	<b>Result</b>
+	+			sample positive
no amplification	+			sample negative
no amplification	no amplification			inhibition*
		no amplification		MasterMix not contaminateded
			+	MasterMix functional

\* dilute extracted sample DNA once more and amplify again

Tab. 2: Evaluation of PCRFast® VTEC

## 8.2. Examples of amplification plot evaluation

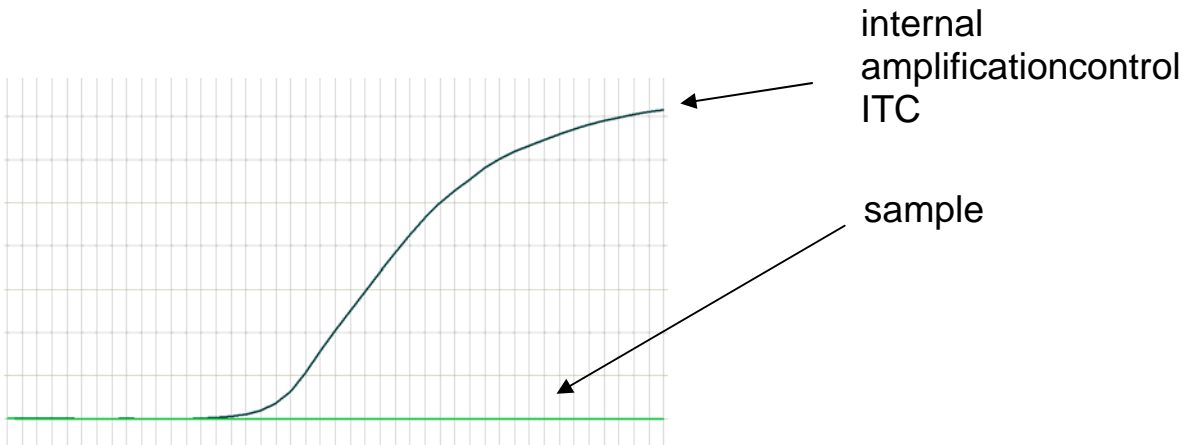


Fig. 1: sample negative; sample without amplification plot

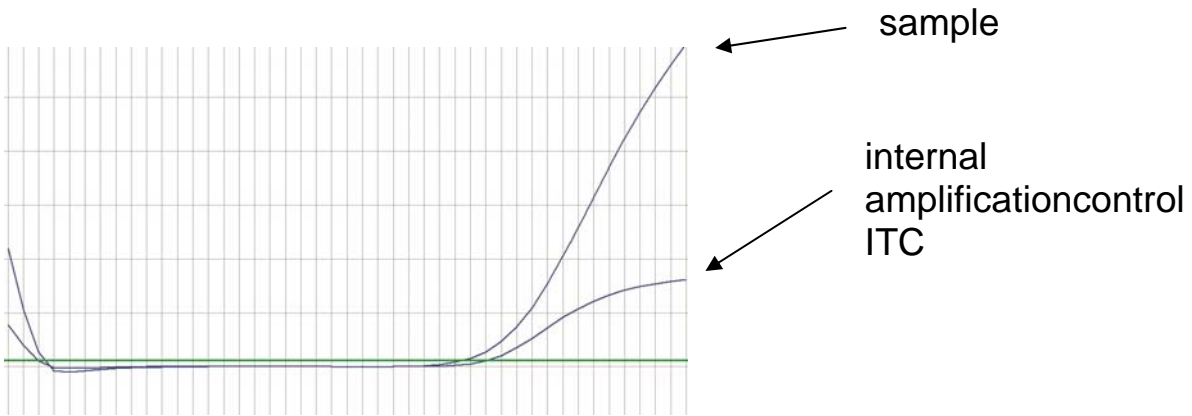


Fig. 2: sample positive

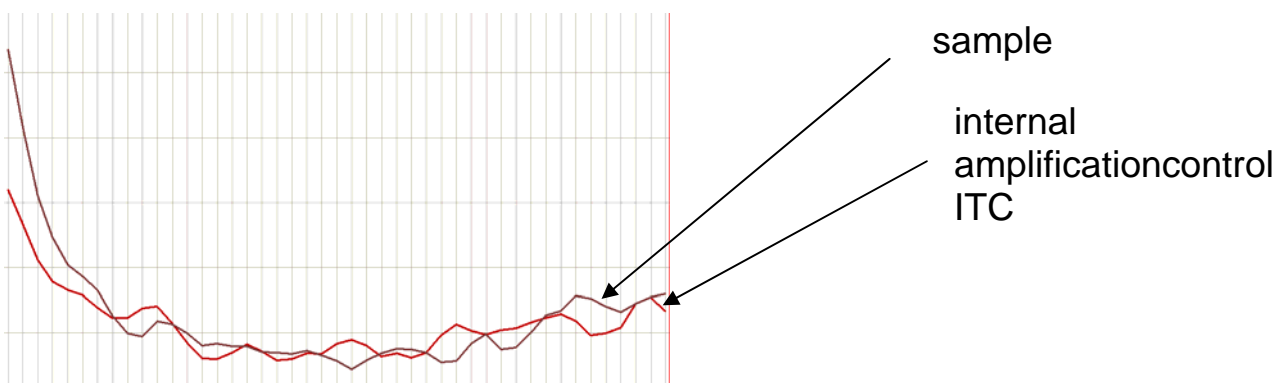


Fig. 3: reaction inhibition, further diluting the isolated DNA

## 9. Sensitivity

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

## 10. Specificity

PCRFast<sup>®</sup> VTEC is 100 % specific for 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<sup>®</sup> VTEC

+ amplification

+ no amplification

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<sup>®</sup> at [www.produktqualitaet.com](http://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

**Schmidt H., Geitz C., Tarr P.I., Frosch M., Karch H.,**

“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

### **Official collection of analysis methods after §64 LFGB**

L 00.00 - 92 „Method for detection verotoxin producing *Escherichia coli* strains in food“

### **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