



PCRFast[®]
Enterobacter sakazakii

Realtime (Sonde)
Realtime (probe)

IF/MR1019

Deutsch Seite 2
English Page 13

Kurzinformation

Einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum qualitativen Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in Realtime (Fam Sonde mit nicht fluoreszierendem Quencher) in Lebensmitteln (Nachweis der Übergangssequenz vom rpsU- ins dnaG Gen). Mit dem Test können 96 Reaktionen durchgeführt werden. Alle Reaktionsgefäße enthalten spezifische Primer und Sonde 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 *Enterobacter sakazakii* DNA für die Positivkontrolle (PTC).

Zeitbedarf:	Anreicherung.....ca. 24 h
(10 Proben)	DNA - Extraktion.....25 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

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 (Übergang rpsU- ins dnaG Gen) 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 **Enterobacter sakazakii - 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 Enterobacter sakazakii - 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 *Enterobacter sakazakii* 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
- Wasserbad oder Thermoblock 95 °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

- steriles deionisiertes Wasser (vorgewärmt auf 45°C)

Anreicherungslösung

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

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. Vor-Anreicherung

Zur Anreicherung von festen Lebensmitteln wird in einem sterilen Stomacher - Beutel eine 1:10 (w / v) Verdünnung mit sterilem, deionisiertem Wasser (vorgewärmt auf 45°C) hergestellt, homogenisiert 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

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
Probe	farblos	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.

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 **45 Zyklen**

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

Probe	Inhibitons- kontrolle ITC	Negativ- kontrolle NTC	Positiv- kontrolle PTC	Ergebnis
+	+			Probe positiv
keine Amplifikation	+			Probe negativ
keine Amplifikation	keine Amplifikation			Inhibition*
		keine Amplifikation		MasterMix nicht kontaminiert
			+	MasterMix funktionsf.

* extrahierte Proben - DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren
+ = Amplifikationssignal

Tab. 2: Auswertung PCRFast® Enterobacter sakazakii

8.2. Beispiele für die Auswertung der Amplifikationplots

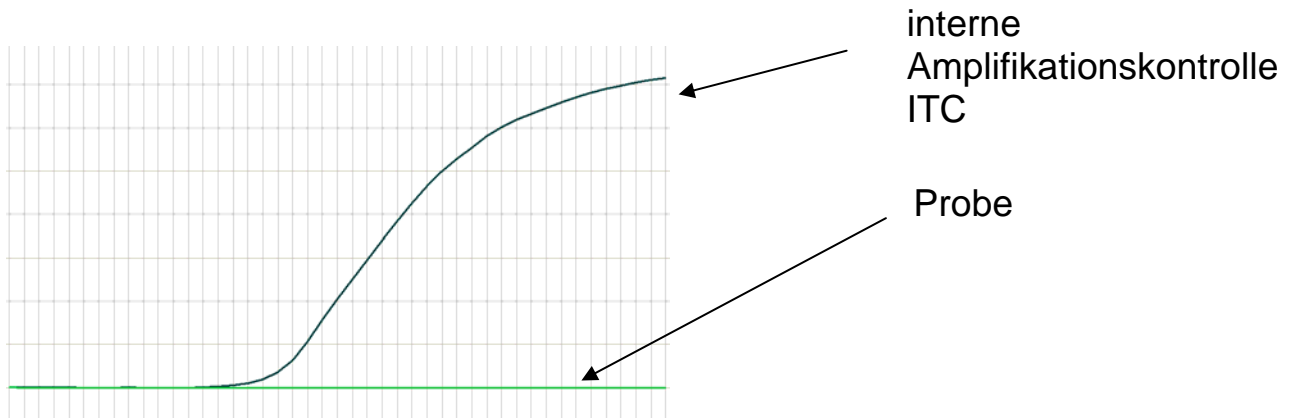


Abb. 1: Probe ist negativ (keine Amplifizierung der Probe)

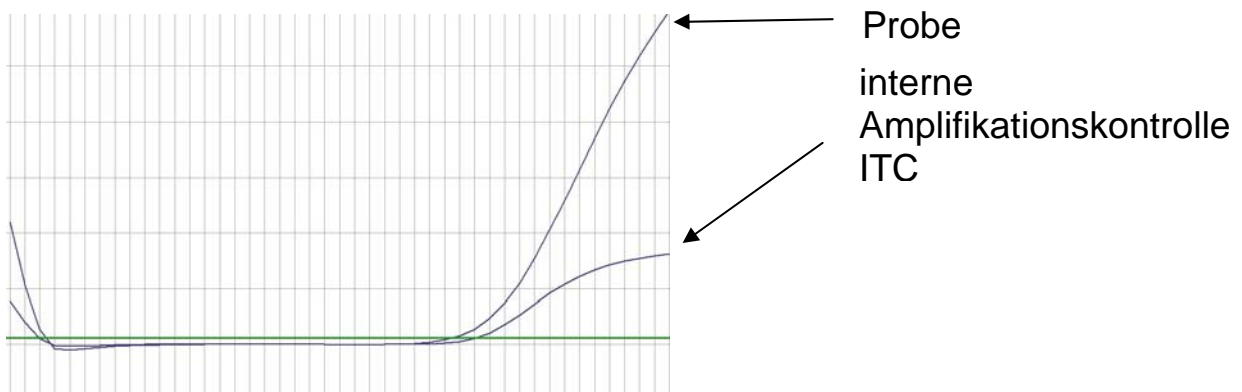


Abb. 2: Probe ist positiv

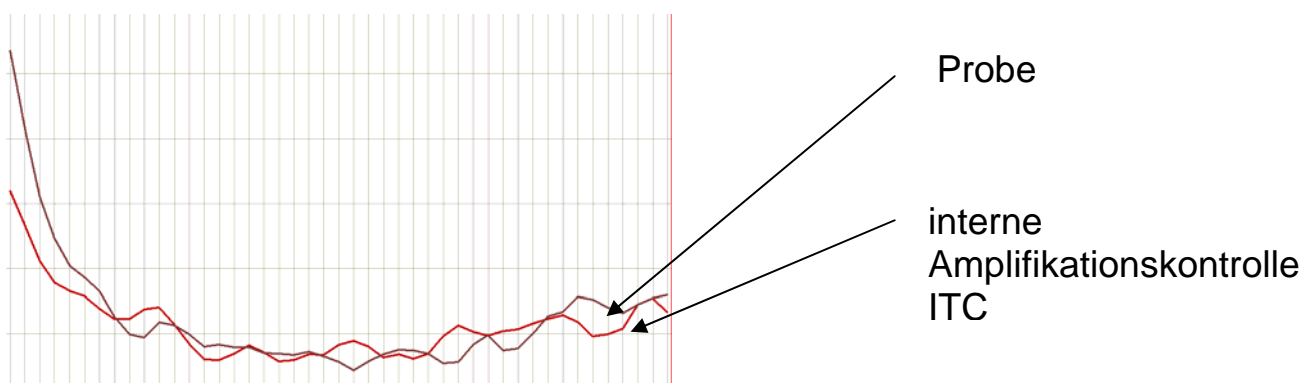


Abb. 3: Inhibition der Reaktion, isolierte DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

9. Sensitivität

Die Nachweisgrenze des Systems liegt bei < 10 Kopien pro Reaktionsansatz. Bezogen auf *Enterobacter sakazakii* in Lebensmittel liegt die Nachweisgrenze bei unter 1 *Enterobacter sakazakii* in 25 g Probe.

10. Spezifität

PCRFast[®] *Enterobacter sakazakii* ist 100 % spezifisch auf *Enterobacter sakazakii*. Folgende Spezies wurden mit mind. 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. 3: Spezifität PCRFast[®] *Enterobacter sakazakii*

- + 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[®] 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 (probe)

Brief information

Simple, molecular biological test (PCR) for detecting Enterobacter sakazakii in realtime (probe with Fam reporter and non fluorescence quencher) in foodstuffs (detection of the intergenic sequenz from rpsU - dnaG gene). The test kit has 96 reaction vials, each reaction vial contains a specific primer pair, the probe and an internal amplification control (probe with HEX reporter and non fluorescence quencher) for investigating possible inhibiting effects (ITC).

8 reaction vials (red marking) contain additionally Enterobacter sakazakii DNA for the PCR positive controls (PTC).

Time required:	enrichment.....	approx. 24 h
	extraction.....	25 min
(10 samples)	PCR setup.....	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

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 sequenz from rpsU - dnaG gene). 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 reaction vials contain the for the PCR reaction necessary specific primers and probe in an optimum amount and an internal amplification control for investigating inhibitory effects.

The **88 colourless reaction vials** contain specific primers and probe (Fam reporter and non fluorescence quencher) and are used for the detection of **Enterobacter sakazakii DNA in the sample extract**, for the **negative control NTC** (check on MasterMix for contamination) and for the **extraction control ETC** (check on extraction for contamination).

The **8 red - coloured reaction vials** contain beside the primers, probe and ITC additionally Enterobacter sakazakii 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: 553nm). 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 fluorescence 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 (for sample determinations, the negative controls NTC and for the extraction control ETC) 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 *Enterobacter sakazakii* 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) and 42 °C (107.6 °F) incubator
- water bath or heating block 95 °C (203 °F)
- 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

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

Realtime

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended),
e.g. AmpliTaq Gold[®] PCR MasterMix, Applied Biosystems No. 4318739;
Brilliant[®] 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. 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 to 45 °C (113 °F)) 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 6.2. 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

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).

Also conventional extraction system 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
sample	colourless	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.

7.4. 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)	45 cycles

Note:

Validation was performed using Brilliant® II QPCR Master Mix by Stratagene and the thermocyclers 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

Sample	Inhibition control (ITC)	Negative control NTC	Positive control PTC	Result
+	+			sample positive
no amplification	+			sample negative
no amplification	no amplification			inhibition*
		no amplification		MasterMix not contaminated
			+	MasterMix functional

* dilute extracted sample DNA once more and amplify again

Tab. 3: Evaluation of PCRFast® Enterobacter sakazakii

8.2.2. Examples of amplification plot evaluation

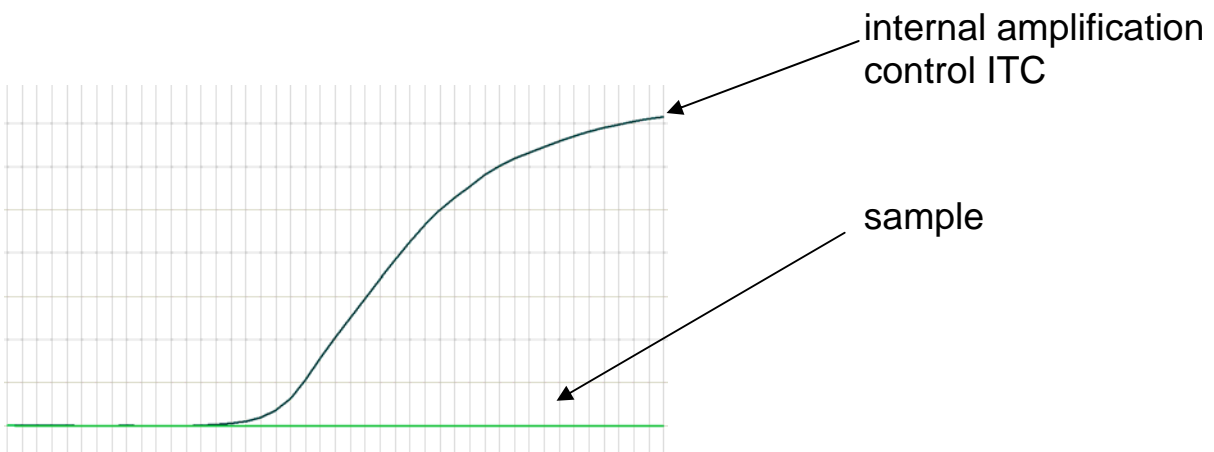


Fig. 1: sample negative; sample without amplification plot

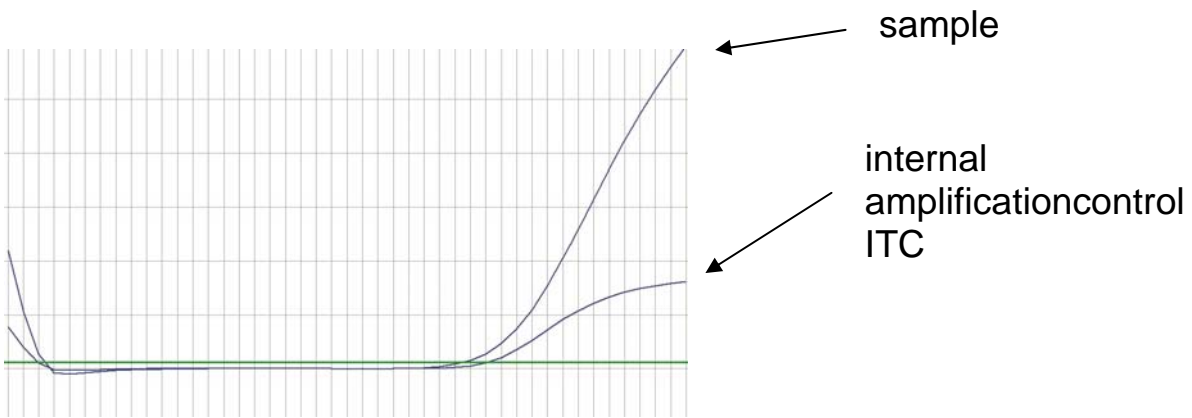


Fig. 2: sample positive

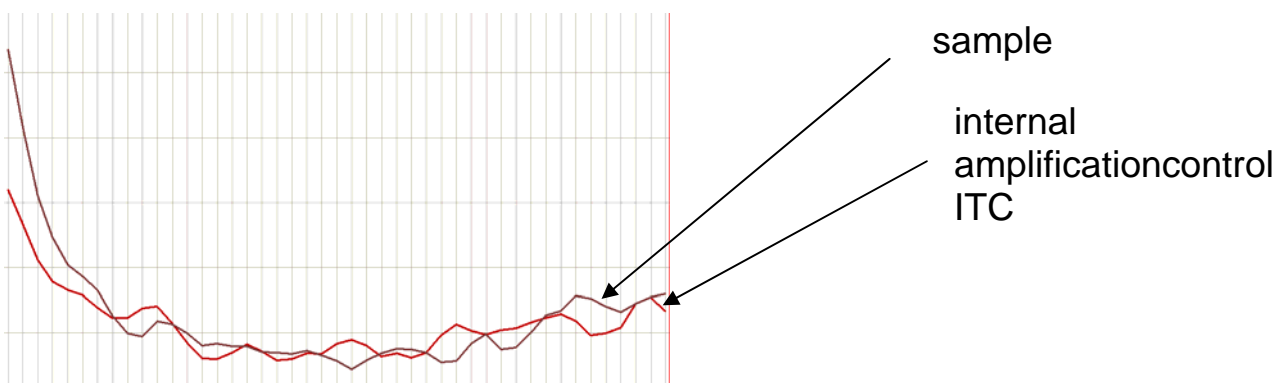


Fig. 3: reaction inhibition, further diluting the isolated DNA

9. Sensitivity

The Limit of detection is < 10 copies per reaction. Regarding Enterobacter sakazakii in food the detection limit is less than 1 Enterobacter sakazakii in 25 g sample.

10. Specificity

PCRFast[®] Enterobacter sakazakii is 100% specific. The following species have each been tested for cross-reactivity with 100 ng DNA:

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

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

+ 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[®] 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