

Neue real time PCR Systeme für den sehr einfachen, schnellen und sensitiven Nachweis von Herpesviren und C. difficile

Dr. Johannes Kehle

Seminar Molekulare Diagnostik 2013

Hotel InterCity Wien

27. November 2013

Zu den **Besten** der Diagnostik-Branche gehören...
...durch **innovative**, **hoch qualitative** und **einfach anzuwendende** molekulare in vitro Diagnostika für eine Vielzahl humaner und veterinärmedizinischer Krankheiten und genetischer Bestimmungen



- Produkte für schwierig-zu-detektierende Parameter mit hoher Sensitivität, Spezifität und breiter Reaktivität
 - Heterogene Viren (z.B. RNA-Virusgruppen)
 - Viren und Bakterien mit niedriger Erregerlast
 - Schwierige Probenmatrices (Stuhl, Paraffin-Proben etc.)
 - Robuste und einfach anzuwendende Verfahren
 - Gebrauchsfertige oder 2-Komponenten Master-Mixe mit robusten Enzymen und Fluoreszenzsonden
 - Bakterien-, Virenisolierungsverfahren und Lysepuffer ermöglichen die einfache Auftrennung und RNA-/ DNA-Extraktion
 - Ständig wachsendes breites Produktportfolio
 - Auf Kunden abgestimmter vor-Ort technischer Support und Training und Trainingseinheiten in unserem Labor in Deutschland
-

Herpesviren

HSV1/2 – VZV – EBV – CMV – HHV6/7 – HHV8

Transplantationsparameter

HHV6/7 – BKV – JCV – CMV

Neuropathogene Viren

Enterovirus – HSV1/2 – VZV

Respirationstrakterreger

Influenza A/B – RSV – hMPV – Enterovirus – Adenovirus – Parainfluenza 1-3 – M. tuberculosis
C. pneumophila – Streptococcus A/C+G

Gastrointestinale Erreger

Norovirus – Enterovirus – Adenovirus – C. difficile – Salmonella sp. – H. pylori

Genetische Prädispositionen

Laktose-Intoleranz – Zöliakie (HLA-DQ)

Verschiedene real time PCR Plattformen und Kitkonfigurationen erhältlich



Vorteile HSV 1/2 real time PCR

- Hohe Sensitivität und Spezifität
- Gebrauchsfertiger Master-Mix
- Detektion und Differenzierung von HSV1 und HSV2
- Quantifizierung mittels 3 Standards (im Kit enthalten)
- PCR-Temperaturprofil identisch mit dem aller anderen Herpes-Virus real time Kits
- Breite Evaluierungsstudien in Europa und USA belegen hervorragende Performance des Verfahrens



Proben-Material	Anzahl der Proben	<u>AnDiaTec PCR</u>		<u>In-house PCR / Ref.-Labor PCR</u>	
		Alle HSV Positiven	HSV-1/HSV-2	Alle HSV Positiven	HSV-1/HSV-2
EDTA-Blut	41	23	15/8	23	15/8
Serum	53	22	14/8	21	13/8
Abstrich	118	67	38/29	66	37/29
Liquor	64	37	17/20	37	17/20
Total	276	149	84*/65	147	82/65

- * Amplicons wurden sequenziert um die Spezifität der PCR zu belegen. Beide Proben, welche negativ mit der in-house PCR bzw. der Referenzlabor-PCR waren, wurden als HSV-1 bestätigt.

Vorteile *C. difficile* real time Kit

- Hohe Sensitivität und Spezifität
- Lyophilisierter Master-Mix
- 8 x 12 Reaktionen Aliquots, einfache Resuspendierung
- Keine DNA-Extraktion aus Stuhl notwendig!
- Breite Evaluierungsstudien belegen hervorragende Performance des Kits



Probenvorbereitung

Direct Stool Sample Preparation

- 1**



Collect sample using supplied swab.
- 2**



Twirl to mix by rolling the handle of the swab between the index finger and thumb.
- 3**



Add 30 µL to Process Buffer 2 (Includes Process Control).
- 4**




Mix by pipetting up and down four to five times using a 1000 µL pipette set between 500 to 570 µL.


Real time PCR

Amplification and Detection Procedure


- 5**




Open Master Mix slowly. Add 135 µL of Rehydration Solution. Replace cap and allow it to sit for 1-2 minutes. Gently pipette rehydrated Master Mix up and down 2-3 times. Avoid creating bubbles.
- 6**



Add 15 µL of Master Mix to SmartCycler PCR tubes.
- 7**



Add 5 µL of Sample to SmartCycler tube and cap the tube. Centrifuge tube for 15 seconds.
- 8**



Insert tubes into SmartCycler II and select appropriate QuidelMolecular assay protocol. 46 minutes per run.

Stamm	Toxintyp	CFU/ Ansatz
ATCC BAA-1870	IIIb	4.2E-01
ATCC BAA-1872	0	4.0E-02

LoD
(in CFU/ Ansatz)

Frische Proben n = 200		C. diff. Quik Chek GeneXpert C. diff	
		+	-
Quidel C. difficile	+	79	8
	-	11	102

Testung
Patientenproben

Frische Proben n = 200		C. diff. Quik Chek GeneXpert C. diff	
		+	-
Quidel C. difficile	+	85	2
	-	5	108

Ergebnisse nach
Klärung diskrepanter
Proben

Sensitivität: 94%
Spezifität: 98%



Danke für Ihre Aufmerksamkeit!
