Bundesinstitut für Risikobewertung
Nationales Referenzlabor für Escherichia coli
einschließlich verotoxinbildende E. coli (NRL-E. coli)

Kontakt: vtec@bfr.bund.de
Tel.: +49 30 18412-7420-4 / -8

Nachweis des

E. coli O45 *wzx*-Gens (wzxO45)

Neben den vom RKI im Erregersteckbrief des O45:H2-Ausbruchsstamms angegebenen Primern für den PCR-Nachweis von O45-wzx/wzy-Genen nach DebRoy et al. (2005) gibt es die Möglichkeit eines Nachweises des wzxO45-Gens mittels real-time PCR nach Bugarel et al. (2010) siehe folgende Informationen.

Realtime-PCR für $\boldsymbol{wzx_{O45}}$ (AccNo: AY771223.1) nach Bugarel M. et al. (2010)

Verwendete Primer/Sonde & finale Konzentration pro Reaktion:

wzx O45-f	TAC GTC TGG CTG CAG GG	final 900 nM
wzx O45-r	ACT TGC AGC AAA AAA TCC CC	final 900 nM
wzx O45Sonde	[FAM]-TTC GTT GCG TTG TGC ATG GTG GC-[BHQ1]	final 200 nM

Temperaturprofil: 95°C 10min 1x; 40x (95°C 15s, 60°C 1min*)

* Messung; Ramp-Raten (auf qTower) 3°C / s

Getestete Mastermixe: xSEPTIONAL 2x Probe Master (#7B-6848B; 7 Biosciences)

Taqman Gene Expression Mix (#4369016; Applied Biosystems)

Verwendete Geräte: qTower 3G, Analytik Jena

ABI 7500 & ABI 7500(fast), Applied Biosystems

Positivkontrolle: BfR-EC-16249; *E. coli* O45:H10

(DNA/Stamm kann zur Verfügung gestellt werden)

Die Primer und Sonde wurden *in silico* mit der Referenzsequenz (RKI 25-06685) des Ausbruchsstamms O45:H2 stx2a, eae abgeglichen. Im Labor wurden verschiedene O45-und non-O45 Stämme aus der NRL E. coli Stammsammlung getestet.

Bundesinstitut für Risikobewertung

O45-Stämme: BfR-EC-16249 (O45:H10); BfR-EC-20664 (O45:H2); BfR-EC-14642 (O45:H2); BfR-EC-14634 (O45:H2); BfR-EC-16692 (O45:H2); BfR-EC-15279 (O45:H11); BfR-EC-15284 (O45:H11);

non-O45-Stämme: BfR-EC-17831 (O111:H8); BfR-EC-17830(O86:H2); BfR-EC-16218 (O15:H4); BfR-EC-16257 (O54:H2); BfR-EC-16268 (O66:H25); BfR-EC-21060 (182:H25); BfR-EC-21061 (O171:H25); BfR-EC-19327 (O104:H4)

Ergebnis/Fazit: Es zeigten sich keine Auffälligkeiten in der Durchführung und die Ergebnisse stimmten mit den Erwartungswerten überein.

Quelle:

Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. Int J Food Microbiol. 2010 Sep 1;142(3):318-29. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.010 . Epub 2010 Jul 14. PMID: 20675003.

DebRoy C, Fratamico PM, Roberts E, Davis MA, Liu Y. Development of PCR assays targeting genes in O-antigen gene clusters for detection and identification of Escherichia coli O45 and O55 serogroups. Appl Environ Microbiol. 2005 Aug;71(8):4919-24. doi: 10.1128/AEM.71.8.4919-4924.2005. PMID: 16085897; PMCID: PMC1183307.