



Regensburg, den 5. Januar 2004

An die Teilnehmer  
des INSTAND-Ringversuchs  
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT  
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438)

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a cover letter in English on page 4 of this document.*

**Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,**

Sie erhalten hiermit die Auswertung des aktuellen INSTAND-Ringversuchs zum Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken.

Ihre individuellen Resultate und deren Bewertung können Sie der beigegeführten Teilnahmebescheinigung entnehmen.

Falls Sie an einer etwas umfangreicheren Diskussion unserer Ringversuchsaktivitäten im Bereich Bakteriengenom-Nachweis und näheren Informationen zur Konzeption der Ringversuchsproben interessiert sein sollten, sei hier auf folgende Veröffentlichung aus der Zeitschrift "Der Mikrobiologe" verwiesen (Herausgeber: Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.):

Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2003) "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT": Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologe* 13:149-156.

An dieser Stelle möchte ich mich, auch im Namen von INSTAND e.V., bei Ihnen noch einmal für die "Panne" bei der Aussendung der Ringversuchsproben entschuldigen. Bei den zukünftigen Ringversuchsrunden sollten Sie dann die Informationen zur Testdurchführung, die entsprechenden Listen mit den Code-Nummern und die Protokollbögen zur Auswertung in gewohnter Weise wieder zusammen mit dem Probenmaterial erhalten.

Bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir nach wie vor für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Auch wenn die Zahl der Anmeldungen im Vergleich zum vorherigen Ringversuch deutlich zugenommen hat, so "wachsen" Projekte wie diese erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer.

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

**Dr. Udo Reischl**

Ringversuchsleiter  
Bakteriengenomnachweis

**Prof. Dr. Hans Wolf**

**Prof. Dr. Norbert Lehn**

**Prof. Dr. Eberhard Straube**

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

### NOVEMBER 2003:

Nachdem die erste Runde dieser neuen Ringversuchs-Serie sehr erfolgreich verlaufen ist, wollten wir bei der Konzeption des zweiten Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) auch ein paar Proben mit relativ niedriger Keimzahl einschließen. Diese zum Teil sogar als "grenzwertig positiv" zu bezeichnenden Proben sollen aber lediglich orientierenden Charakter haben und wurden bei der endgültigen Ringversuchsauswertung zur Erteilung der Zertifikate nicht als "falsch negativ" bewertet. Als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt nach wie vor das 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gut evaluierte Primersequenzen). Für *B. pertussis* (Probe #32202), *H. pylori* (Probe # 32302), *B. burgdorferi* (Probe # 32503), *L. pneumophila* (Probe #32601) und für *Salmonella enteritidis* (Probe # 32702) stehen aber jetzt standardisierte Probensets zur Verfügung, die zumindest im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung in gewisser Weise als wertvolle Sensitivitätsmarker dienen können. Bei Bedarf können Sie Rückstellproben dieser Probensets gerne über den Ringversuchsleiter nachbestellen (natürlich nur solange unser Vorrat reicht).

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Tabelle 1 zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tabelle 2 nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen und in Tabelle 3 nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse sowie deren prozentualem Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt.

Eine weitergehende Aufschlüsselung nach den einzelnen Kategorien der DNA-Extraktion, Amplifikation, Detektion sowie den jeweils verwendeten Zielsequenzen erschien bei diesem Ringversuch aufgrund der relativ hohen Richtigkeitsquote unter den positiven Proben wenig sinnvoll. Die individuellen Angaben der einzelnen Teilnehmer zur Testdurchführung werden jedoch systematisch erfasst und bleiben für retrospektive Analysen verfügbar.

Erwartungsgemäß waren auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für den letzten, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die anonymisierten Ergebnisse der einzelnen Sollwertlaboratorien oder die Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR) auch unter folgender Internetadresse:

"[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)"

als *pdf*-Files zum download bereit.

### **RV 434: EHEC / STEC**

Aufgrund vielfacher Rückfragen aus dem Kreis der Ringversuchsteilnehmer hier vorab eine kurze Anmerkung zur Definition von "EHEC / STEC" von Herrn Dr. habil. Peter Gallien (Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor für *E. coli*, Dessau):

**Shigatoxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) (ältere Bezeichnung: Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC) gehören zur Gruppe intestinaler pathogener *E. coli*. Sie alle besitzen Shigatoxingene und somit die Fähigkeit, entsprechende Shigatoxine zu bilden.**

**Die enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) sind eine Untergruppe der STEC, die beim Menschen Krankheiten, wie HUS, HC oder TTP hervorrufen können.**

**Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind nicht alle Faktoren und Mechanismen bekannt, die einen STEC zum EHEC machen. Somit muss jeder STEC (z.B. isoliert aus Lebensmitteln, die vom Tier stammen oder Kot) als potentieller EHEC angesehen werden.**

Wie bei den zuvor diskutierten erregerspezifischen Ringversuchen, so führte auch beim NAT-gestützten EHEC-Nachweis die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den positiven Proben und die Verfügbarkeit gut evaluierter Analysesysteme zu hohen Richtigkeitsquoten bei allen 4 Proben. Bei diesem Ringversuch spiegelt sich in der hohen Menge an Zielorganismen jedoch gewissermaßen die Routinesituation wider, da diese NAT-Testsysteme in der Regel zur molekularbiologischen Analyse von Übernachtkulturen von Stuhl- oder Lebensmittel-Proben eingesetzt werden.

Die eigentliche Herausforderung bei diesem diagnostischen Ringversuch besteht daher nicht so sehr in dem gezielten Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen sondern vielmehr in der differenzierten Analyse unterschiedlicher Shiga-Toxin Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie Intimin oder Enterohämolysin) von EHEC / STEC Isolaten. Aus diesem Grund werden bei der Probenkonfektionierung von uns auch nicht die klassischen "Prototyp" EHEC-Stämme (wie z.B. O157:H7) sondern willkürlich 2 Routineisolate aus einer Sammlung von *stx*-positiven *E. coli* ausgewählt. Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde die eine der beiden positiven Proben (Probe #32401; O157:H-; *stx*<sub>2</sub>-positiv, *eae*- und *hlyA*-positiv) von 29 Teilnehmern und die andere positive Probe (Probe #32404; O26:H11; *stx*<sub>1</sub>-positiv, *eae*-positiv, *hlyA*-negativ) von 27 der insgesamt 30 Teilnehmer zuverlässig als EHEC identifiziert.

Bis auf ein einzelnes falsch-positives Ergebnis für Probe #32403 (diese Probe enthielt lediglich *E. coli* K12) wurden erfreulicherweise von jedem Teilnehmer für die beiden negativen Proben dieses Ringversuchs auch richtig-negative Ergebnisse mitgeteilt.

Alle Teilnehmer haben dabei selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC verwendet und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet. Die Vielfalt an Kombination verschiedener *E. coli* Serotypen, Shiga-Toxin Subtypen sowie die Unterschiede in der Intimin- und Enterohämolysin-Produktion von EHEC-Isolaten garantiert auch noch für die kommenden Ringversuche Herausforderungen an die individuellen Testsysteme und eine spannende Auswertung der Ergebnisse.

Zudem wurden von 22 der 30 Teilnehmer, zumindest in gewissem Umfang, die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren doch bei 21 der 22 Teilnehmer die Angaben in dem mitgeteilten Umfang korrekt.

To the participants of the  
INSTAND-Proficiency Test in  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 430 to 438)

**Dear Participant, dear Colleague,**

Please find enclosed a brief analysis report of the recent proficiency test panel "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)". It summarizes some benchmarks and the overall assessment of results reported by all of the the participating laboratories.

The accuracy of your individual results is indicated on your personal certificate issued by INSTAND e.V. (attached to this letter).

This highly desired program for external validation was activated by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. As you can learn from "[www.instand-ev.de](http://www.instand-ev.de)", this new segment of their huge proficiency testing program is now open for diagnostic laboratories worldwide. We are aiming at two validation rounds per year (April / November), a reasonable price, and a permanently expanding coverage of relevant bacterial pathogens. Any general or specific comments on sample composition or suggestions on additional bacterial, fungal, or parasitic organisms which should be covered, are highly appreciated.

Please do not feel irritated by some strong-positive samples among the present set. To make participants and ourselves familiar with the concept and the suitability of the proprietary sample matrix, "passing" should be easy in the initial rounds of proficiency testing. But as the program continues, it is our challenge (and duty) to rise at least some of the hurdles with every round of external validation.

Further information on this proficiency test panel "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)" can be downloaded in form of pdf-files at "[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)", subsection "INSTAND Ringversuche (PCR / NAT)". Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least some key documents and the tables in a bilingual style.

Hopefully you found this kind of external validation benefitting and you will continue to join the future rounds of our QC program in bacterial genome detection (NAT/ PCR).

With best personal regards,

Udo Reischl

**PCR-/NAT EHEC / STEC  
 (RV 434) November 2003**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
32401	++	61 / 73,77,78	EHEC (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) (O157:H-; stx-2; eae; hlyA)
32402	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for eae and hlyA)
32403	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for eae and hlyA)
32404	++	61 / 71,77	EHEC (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) (O26:H11; stx-1; eae)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

n = 43	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	32401	32402	32403	32404		32401	32402	32403	32404
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	29	0	1	27	n.d.	4	4	4	4
<b>Negativ</b>	1	30	29	3	nein <i>no</i>	26	26	26	26
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

NAT-Methode [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 26)	48	48 / 52	92	51	51 / 52	98
Other commercial tests [27] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
Andere / other [29] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	6 / 6	100

\* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.  
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.

**PCR-/NAT EHEC / STEC  
 (RV 434) November 2003**



**EHEC / STEC-Nachweis mittels PCR oder anderen Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT)**

**Ergebnisse der Sollwertlaboratorien**

*Results reported by our Reference Laboratories*

**Probenversand / shipment of samples: 12. November 2003**

**(results of the QC-program reference labs; listed but not depicted in alphabetical order):**

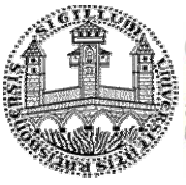
- Professor Bockemühl, Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg
- Professor Bogdan, Universität Freiburg
- Dr. habil. Gallien, Bundesinstitut für Risikobewertung (NRL-Ec), Dessau
- Professor Karch, Universität Münster
- Dr. Schoerner, Universität Erlangen-Nürnberg
- Dr. Strockbine, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
- Professor Vogel, Universität Würzburg
- Professor Wirsing von König, Klinikum Krefeld

<b>EHEC / STEC (RV 434) Nov 2003</b>	<b>Erwartetes Ergebnis Expected Result</b>	<b>Labor 1</b>	<b>Labor 2</b>	<b>Labor 3</b>	<b>Labor 4</b>	<b>Labor 5</b>	<b>Labor 6</b>	<b>Labor 7</b>	<b>Labor 8</b>
<b>Anmerkungen*</b>		[28]	[28]	[28]	[28]	[28]	[28]	[28]	[28]
<b>32401</b>	<b>++ a)</b>	<b>+<sup>1)</sup></b>	<b>+<sup>2,4)</sup></b>	<b>+<sup>7)</sup></b>	<b>+<sup>2)</sup></b>	<b>+<sup>2,4)</sup></b>	<b>+<sup>7)</sup></b>	<b>+<sup>2,4)</sup></b>	<b>+<sup>7)</sup></b>
<b>32402</b>	<b>∅ b)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>32403</b>	<b>∅ b)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>32404</b>	<b>++ c)</b>	<b>+<sup>2)</sup></b>	<b>+<sup>8)</sup></b>	<b>+<sup>8)</sup></b>	<b>+<sup>3)</sup></b>	<b>+<sup>8)</sup></b>	<b>+<sup>8)</sup></b>	<b>+<sup>8)</sup></b>	<b>+<sup>8)</sup></b>

**Anmerkungen / comments\*:** Code number [amplification system]

- a) EHEC (O157:H-; *stx-2c*; *eae*; *hlyA*)
- b) *E. coli* K12
- c) EHEC (O26:H11; *stx-1*; *eae*)

**Detailed results:** 1): *stx-2c*; 2): *stx-2*; 3): *stx-1*; 4): *eae*; 5): *hlyA*; 6): *stx*;  
 7): *stx-2c*, *eae*, *hlyA*; 8) *stx-1*, *eae*.



# 434 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 11.2003

Reischl / Lehn / Wolf

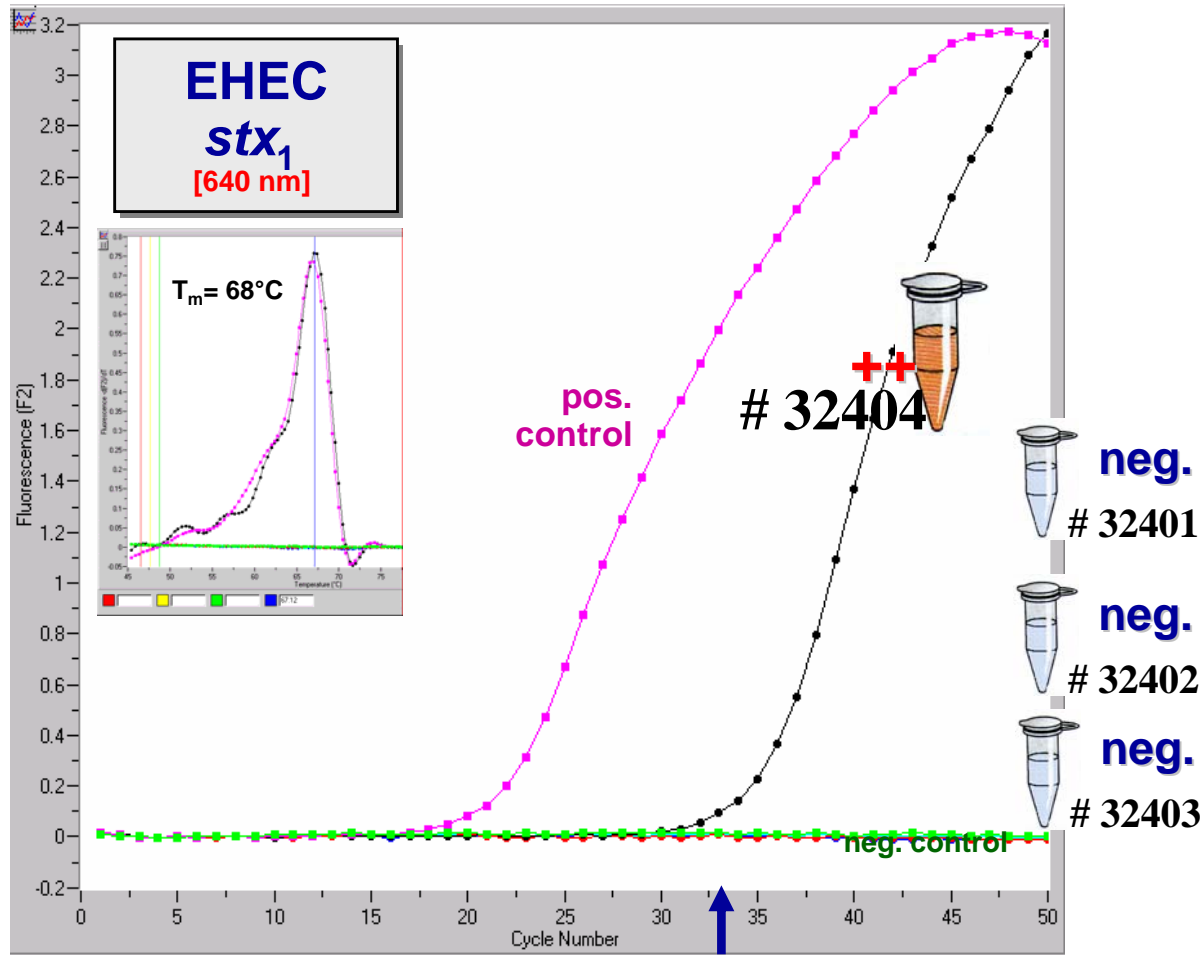
## Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

- 1 EHEC 32401
  - 2 EHEC 32402
  - 3 EHEC 32403
  - 4 EHEC 32404
  - 5 poKo EHEC 347
  - 6 neg. MM H2O
- 35.68  
22.06



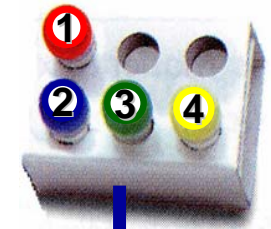
### LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Strockbine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction: ~10<sup>3</sup>

031030\_2\_RV\_EHEC-F2\_ampl.bmp



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

U. Reischl/RIMMH/11.2003





# 434 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 11.2003

Reischl / Lehn / Wolf

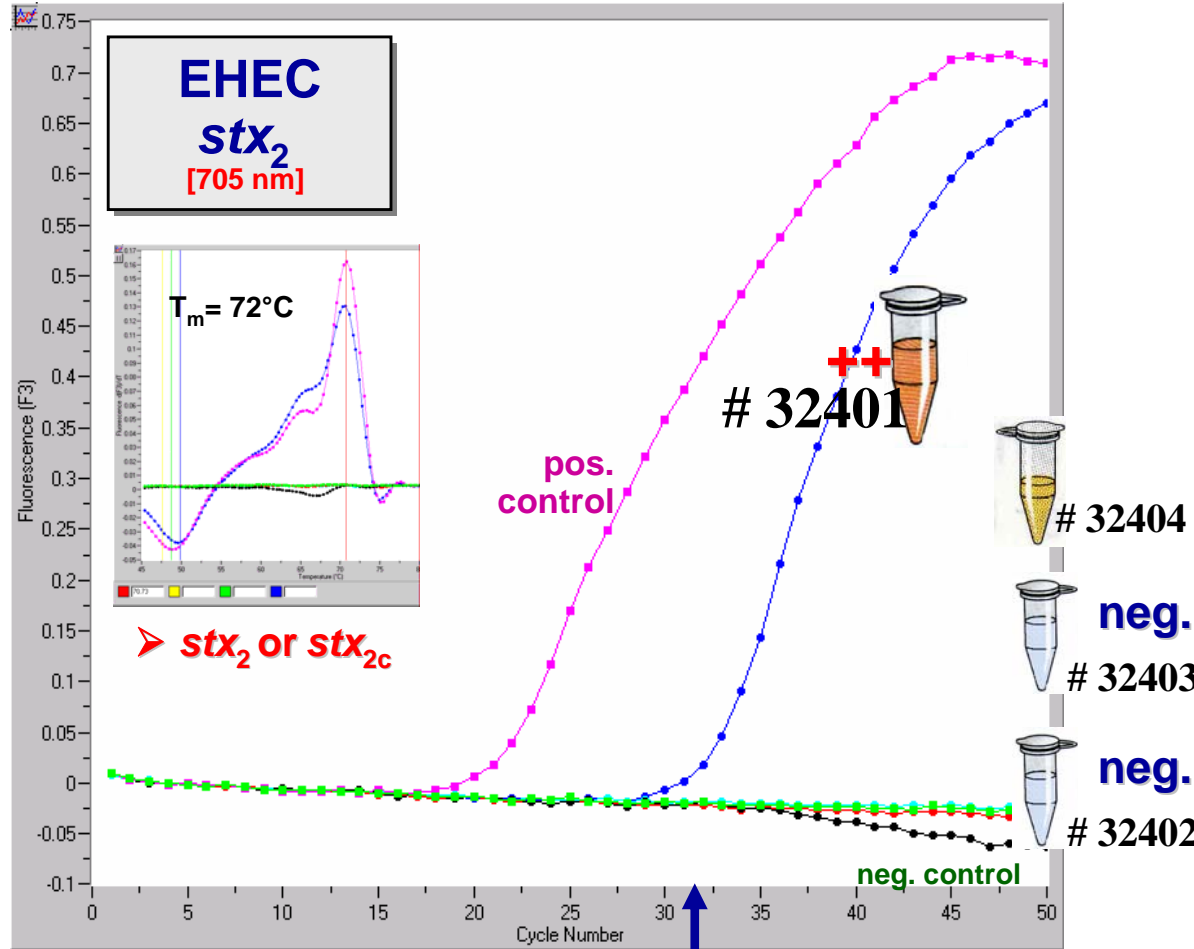
## Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

1	EHEC 32401	32.52
2	EHEC 32402	
3	EHEC 32403	
4	EHEC 32404	
5	poKo EHEC 347	21.25
6	neg. MM H2O	



### LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Strockbine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction:  $\sim 10^3$

031030\_2\_RV\_EHEC-F3\_ampl.bmp



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

U. Reischl/RIMMH/11.2003





# 434 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 11.2003

Reischl / Lehn / Wolf

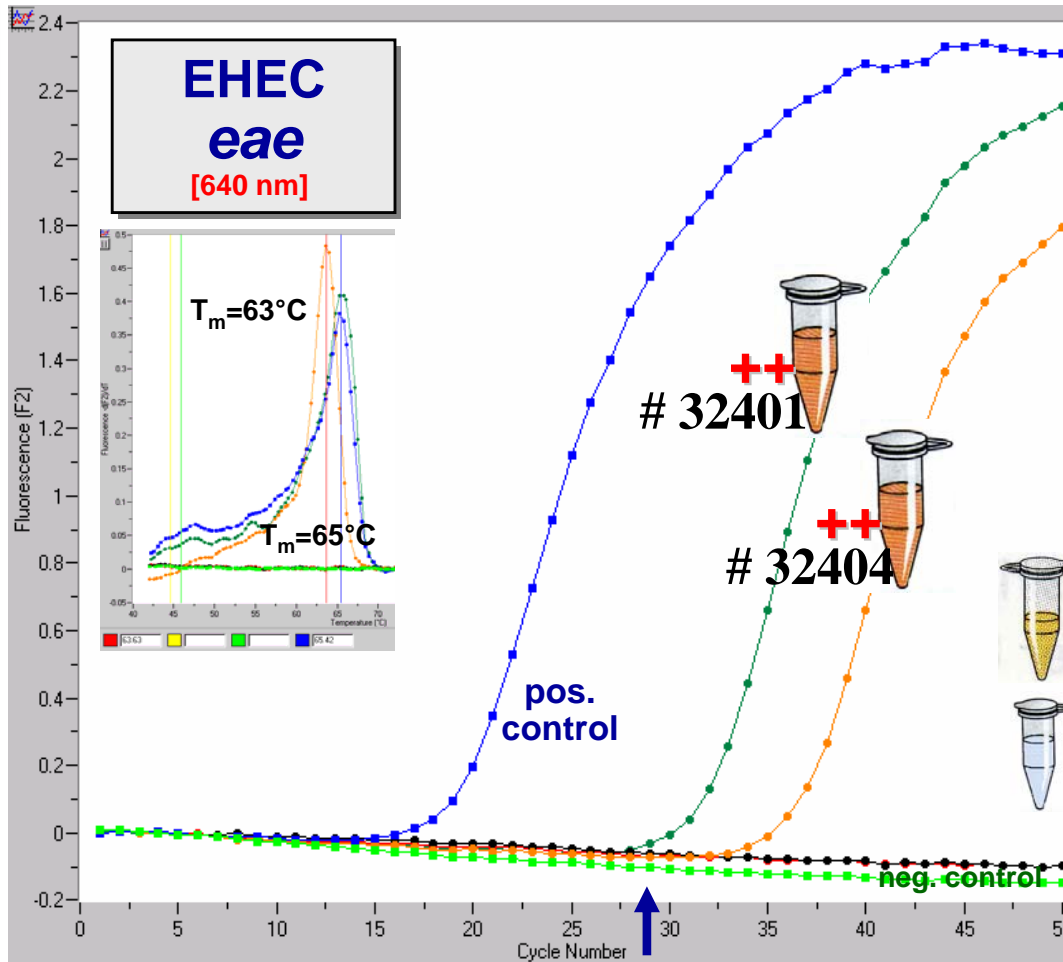
## Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

7	EHEC 32401	31.85
8	EHEC 32402	
9	EHEC 32403	
10	EHEC 32404	36.56
11	Pos eae 347	19.34
12	Neg Ko	27.03



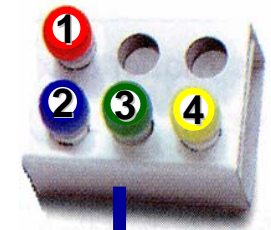
### LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Strockbine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction:  $\sim 10^4$

031027\_3\_eae\_ampl.bmp



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300  $\mu\text{L}$  of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

U. Reischl/RIMMH/11.2003



# 434 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 11.2003

Reischl / Lehn / Wolf

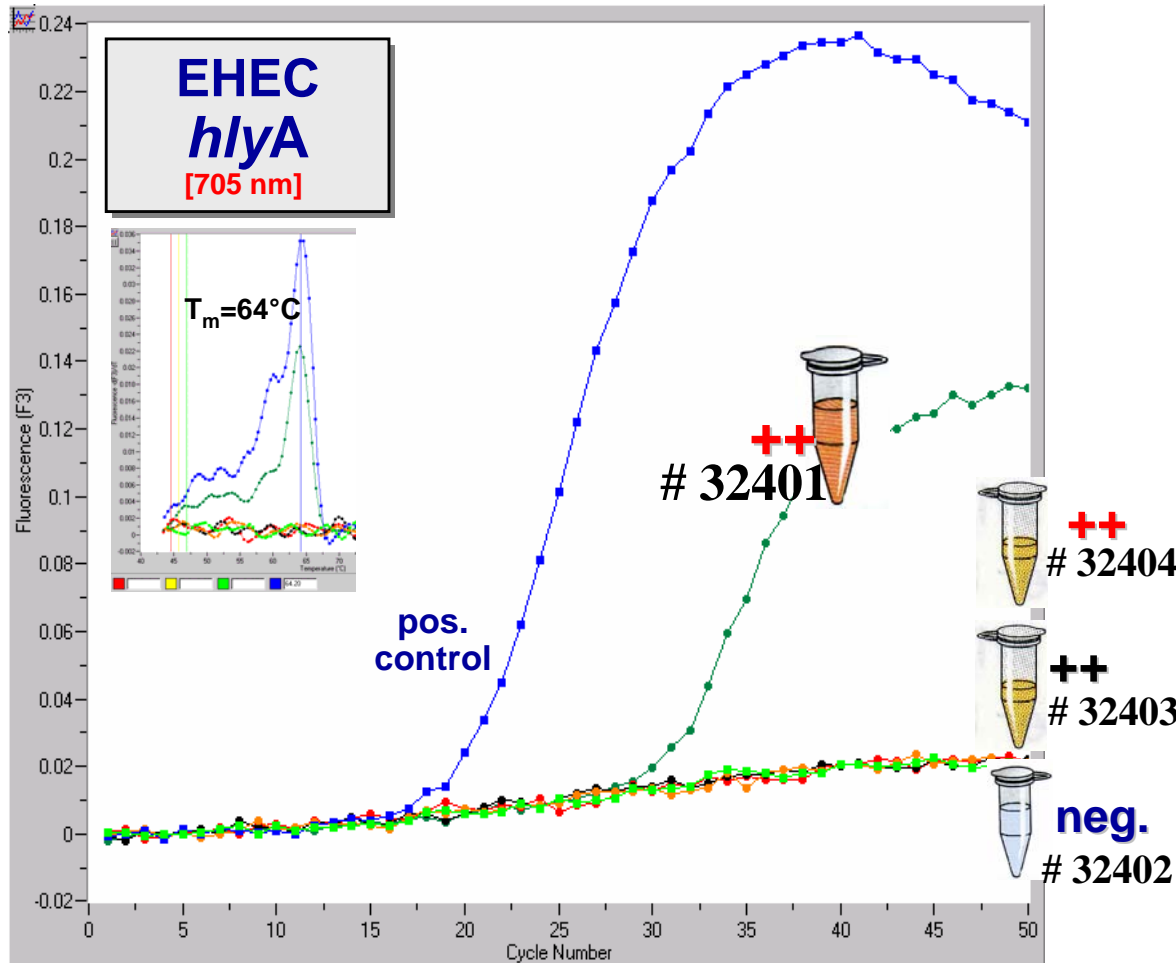
## Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

- 13 EHEC 32401
- 14 EHEC 32402
- 15 EHEC 32403
- 16 EHEC 32404
- 17 Pos hlyA 347
- 18 Neg Ko

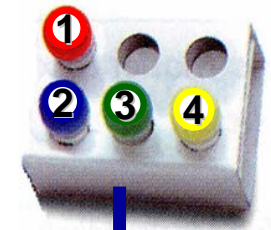


### LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Strockbine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



031027\_3\_hlyA\_ampl.bmp



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300  $\mu\text{L}$  of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

U. Reischl/RIMMH/11.2003



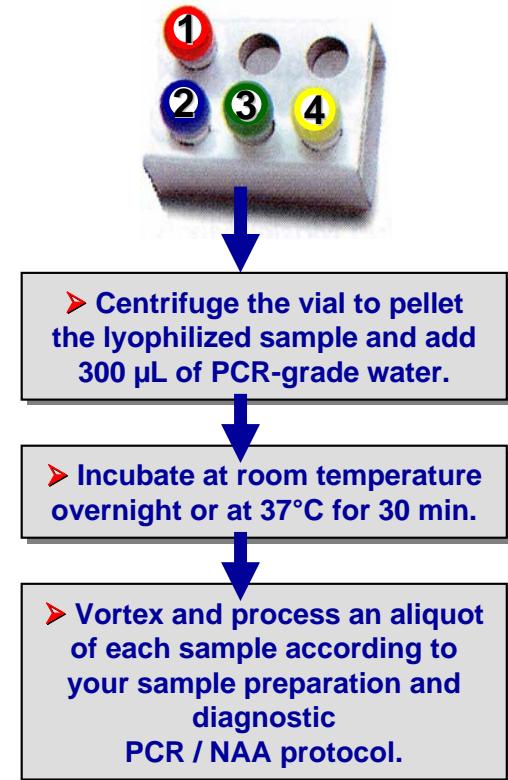
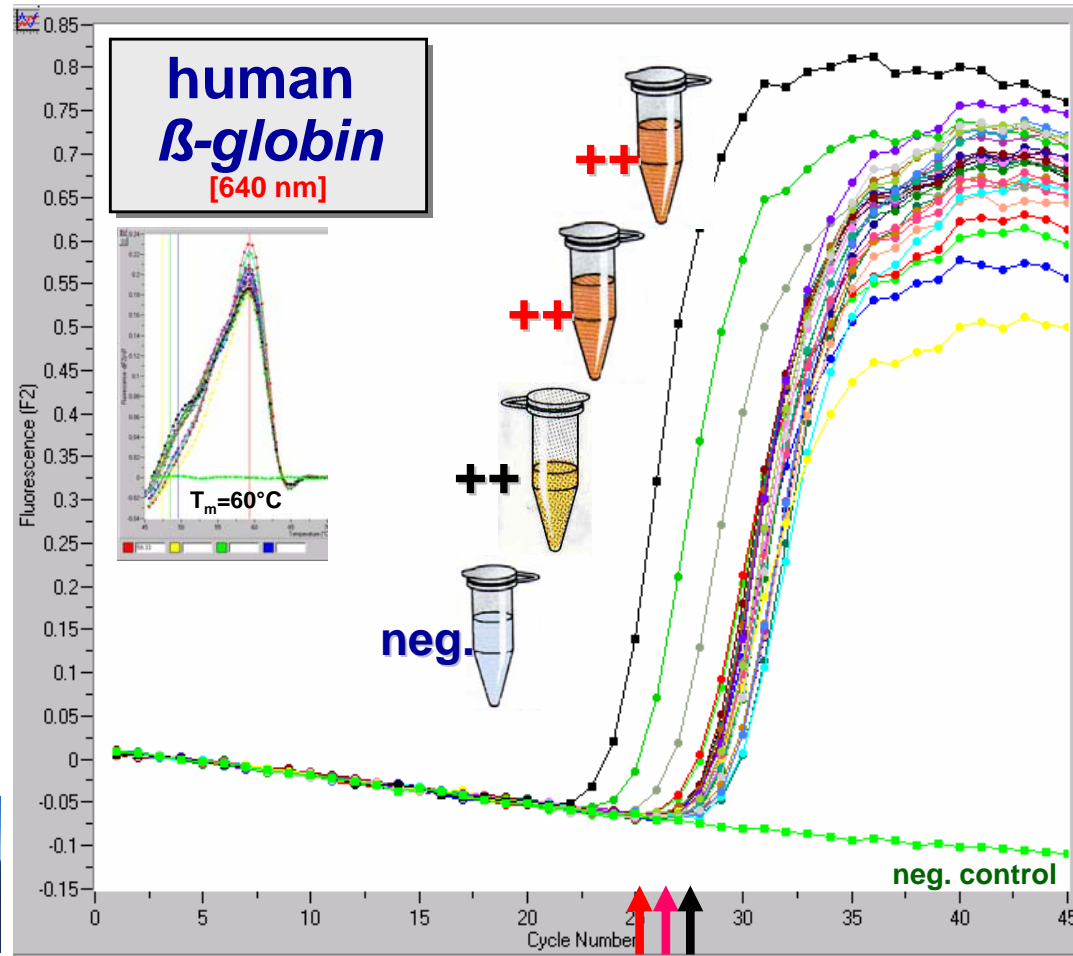
# 432- 438 Bakteriengenom-Nachweis *all sets*

status 11.2003

## Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

1	RV-Bope 32201	27.68
2	RV-Bope 32202	27.04
3	RV-Bope 32203	26.95
4	RV-Bope 32204	27.71
5	RV-Hepy 32301	28.17
6	RV-Hepy 32302	29.03
7	RV-Hepy 32303	28.84
8	RV-Hepy 32304	25.88
9	RV-EHEC 32401	28.74
10	RV-EHEC 32402	28.85
11	RV-EHEC 32403	28.70
12	RV-EHEC 32404	27.72
13	RV-Bobu 32501	27.84
14	RV-Bobu 32502	28.04
15	RV-Bobu 32503	28.14
16	RV-Bobu 32504	28.43
17	RV-Lepn 32601	27.85
18	RV-Lepn 32602	27.58
19	RV-Lepn 32603	28.29
20	RV-Lepn 32604	27.79
21	RV-Salspp. 32701	28.98
22	RV-Salspp. 32702	28.82
23	RV-Salspp. 32703	27.88
24	RV-Salspp. 32704	28.08
25	RV-Lisp 32801	27.97
26	RV-Lisp 32802	24.56
27	RV-Lisp 32803	28.10
28	RV-Lisp 32804	28.50
29	poKo $\beta$ -Globin 75ng	23.12
30	neg. MM H2O	37.42



LightCycler PCR protocol:  
 LightCycler Control Kit DNA  
 Roche Cat. No. 2 158 833



human cells / PCR reaction:  $\sim 10^3$

030923\_3\_RV\_β-Globin-ampl.bmp

U. Reischl/RIMMH/11.2003



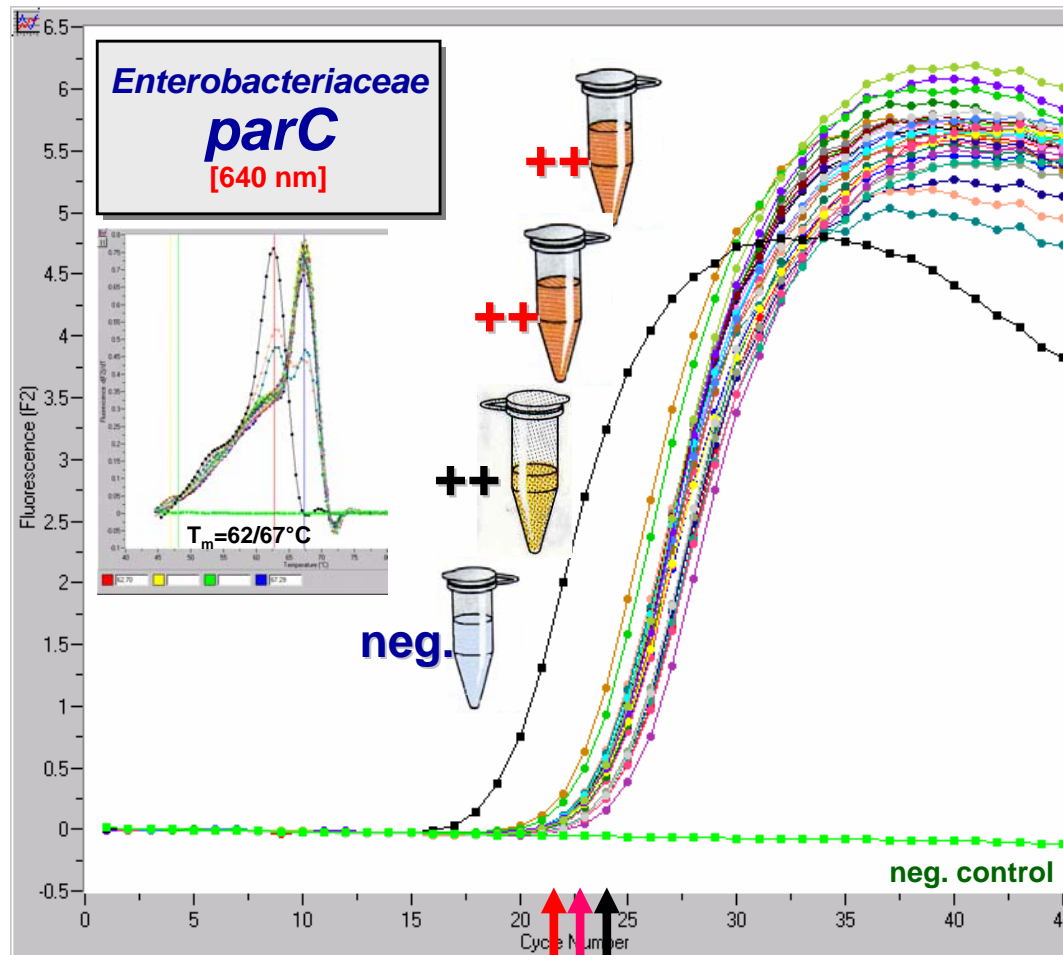
# 432- 438 Bakteriengenom-Nachweis *all sets*

status 11.2003

## ➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

1	RV-Bope 32201	23.73
2	RV-Bope 32202	23.57
3	RV-Bope 32203	24.50
4	RV-Bope 32204	23.50
5	RV-Hepy 32301	23.87
6	RV-Hepy 32302	24.30
7	RV-Hepy 32303	24.21
8	RV-Hepy 32304	24.10
9	RV-EHEC 32401	23.05
10	RV-EHEC 32402	24.88
11	RV-EHEC 32403	22.33
12	RV-EHEC 32404	23.07
13	RV-Bobu 32501	23.66
14	RV-Bobu 32502	23.50
15	RV-Bobu 32503	23.81
16	RV-Bobu 32504	23.90
17	RV-Lepn 32601	23.56
18	RV-Lepn 32602	23.45
19	RV-Lepn 32603	24.24
20	RV-Lepn 32604	23.65
21	RV-Sal spp. 32701	23.32
22	RV-Sal spp. 32702	23.60
23	RV-Sal spp. 32703	23.62
24	RV-Sal spp. 32704	24.47
25	RV-Lisp 32801	23.75
26	RV-Lisp 32802	22.72
27	RV-Lisp 32803	23.68
28	RV-Lisp 32804	24.32
29	poKo parC (E.coli)	18.76
30	neg. MM H2O	



LightCycler PCR protocol:  
 -unpublished-



Enterobact. / PCR reaction: ~10<sup>5</sup>

030924\_3\_RV\_parC-ampl.bmp



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

U. Reischl/RIMMH/11.2003



## BAKTERIENGENOM-NACHWEIS

### PCR-/NAT EHEC / STEC (RV 434)

**EHEC / STEC DNA-Nachweis mittels PCR oder anderen Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT)**

**Information zur Testdurchführung und Code-Nummern (2 Seiten)**



#### Vorsichtsmaßnahmen

Die Probenmaterialien wurden einer speziellen Inaktivierungsmaßnahme unterzogen und sind daher **nicht** mehr als potentiell infektiös zu betrachten.

#### Probenvorbereitung

Die Proben sind nach Erhalt bei 4°C zu lagern.

Als lyophilisiertes Untersuchungsmaterial sind die Proben unmittelbar vor der Testung kurz zu zentrifugieren und dann je in **300 µl** sterilem Wasser (PCR-grade) aufzunehmen.

Die Proben sollten für 20 min. bei Raumtemperatur in einem Thermoschüttler resuspendiert und/oder mehrfach gut gevortext werden. Anschließend sind 100 µl-Aliquots der Proben wie natives klinisches Probenmaterial mit der in Ihrem Labor angewandten Prozedur für die DNA-Extraktion und dem EHEC/STEC-PCR/NAT Nachweis zu untersuchen.

#### Testdurchführung und Ergebnisinterpretation

Das Konzept dieses Ringversuchs ist auf die Bestimmung von EHEC/STEC DNA im Probenmaterial ausgelegt. Da das Probenmaterial auch Proteine, div. Bakterien und menschliche Zellen beinhaltet, ist die Durchführung und Interpretation von optionalen Inhibitionskontrollen, die auf dem Nachweis humaner Gensequenzen (wie z.B.  $\beta$ -Globin) im Untersuchungsgut beruhen, möglich.

Benutzen Sie bitte die in Ihrem Labor routinemäßig angewendeten Methoden und geben Sie alle Informationen entsprechend der Code-Nummern an. Primär werden in diesem Ringversuch nur qualitative Angaben abgefragt. Die Ergebnisse bitte anhand der Code-Nummern als "positiv", "unterhalb der Nachweisgrenze", "inhibiert" oder "fraglich" angeben.

Die zusätzliche Angabe von quantitativen oder semiquantitativen Ergebnissen (+, +++, etc.) im Bemerkungsfeld ist für die genaue Analyse der Ringversuche sehr hilfreich und daher, wie alle anderen Kommentare, stets willkommen.

#### Rücksendung des Protokollbogens

Das ausgefüllte Protokoll bitte zurücksenden an:

Institut für Standardisierung und Dokumentation  
im Medizinischen Laboratorium e.V. (INSTAND)  
Abt. Qualitätssicherung  
Postfach 250211  
40093 Düsseldorf.

## BACTERIAL GENOME DETECTION

### PCR-/NAA EHEC / STEC (RV 434)

**Detection of EHEC / STEC DNA by PCR or other procedures for nucleic acid amplification & detection (NAA)**

**Instructions for testing and Code numbers (2 pages)**



#### Precautions

The samples in this panel were subjected to inactivation and they are **not** considered hazardous or capable of transmitting infection.

#### Specimen preparation

Samples should be stored at 4°C upon receipt.

The closed tubes should be briefly centrifuged to pellet the lyophilized material. Immediately before testing, renature the samples by adding **300 µl** of sterile water (PCR-grade) and incubate at room temperature for 20 min. on an orbital shaker and/or occasional vortexing.

When the pellets are completely dissolved, the resulting suspensions should be considered as native clinical specimens and 100 µl aliquots processed as such using typical protocols for DNA extraction and EHEC/STEC-PCR/NAA established in your routine diagnostic setting.

#### Testing and reporting of results

The concept of this proficiency panel is designed for determination of EHEC/STEC DNA in the sample material. The sophisticated composition of the sample matrix comprises of proteins, bacteria, and human cells next to the target organisms, thereby allowing for the application of optional inhibition controls targeting human genes (like  $\beta$ -globin, etc.).

Please apply the same methods for DNA extraction and amplification like you are using for the workup of routine clinical samples. Protocol and workflow characteristics should be specified in the Report Form according to the provided code numbers.

Although only reporting of qualitative results is requested, you are free to provide quantitative or semiquantitative data (e.g., +, +++) in the Comments column. The latter information is voluntary, but very helpful for the final evaluation of this proficiency testing program.

#### Completing of Report Form

Please return the completed Report Form no later than the requested date (postmark date) to:

INSTAND e.V.  
Abt. Qualitätssicherung  
Postfach 250211  
40093 Düsseldorf, GERMANY.

## BAKTERIENGENOM-NACHWEIS

### CODE-Nummern PCR-/NAT EHEC / STEC (434)

Die Code Nummern für die Verschlüsselung sind in 7 Gruppen aufgeteilt.

Angaben unter den technischen Kategorien [I] bis [IV] sowie [VII] erfolgen auf freiwilliger Basis. Sie werden vertraulich behandelt und dienen vor allem zu statistischen Zwecken.

Angaben unter [VI] sind verpflichtend.

#### Gruppe [I] (DNA Extraktion)

11: Proteinase K / Zentrifugensäulchen  
12: Kommerzieller DNA Extraktionskit \*\*  
13: Phenol / Chloroform Extraktion      19: Andere \*\*

#### Gruppe [II] (Amplifikation)

27: Kommerzielles Testsystem / Kit \*\*  
28: *In house* PCR Protokoll      29: Andere \*\*

#### Gruppe [III] (Detektion / Identifizierung)

31: Kommerzielles Testsystem (Codes 21-27)  
32: Agarosegel Elektrophorese  
33: Hybridisierung mit markierten Sonden  
34: Nested PCR  
35: Real-Time PCR (TaqMan-Format)  
36: Real-Time PCR (LightCycler)  
37: DNA Sequenzierung      39: Andere \*\*

#### Gruppe [IV] (Positiv u/o Inhibitionskontrollen)

41: Kommerzielles Testsystem (Codes 21-27)  
42: Interne Kontrolle (rekombinantes Plasmid o.ä.)  
43: Externe Kontrollen (Plasmid,  $\beta$ -Globin Gen, etc.)  
44: Genomische DNA d. entsprechenden Erregers  
48: Andere \*\*      49: Keine Kontrollen durchgeführt

#### Gruppe [V] (Zielsequenz)

51: Kommerzielles Testsystem (Codes 21-27)  
52: Shiga-Toxin Gene (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>)      59: Andere \*\*

#### Gruppe [VI] (Ergebnisse)

61: **Positiv**      63: **Fraglich**  
62: **Negativ**      64: **Inhibition**

#### Gruppe [VII] (Molekulare Subtypisierung)

71: *stx*<sub>1</sub>  
72: *stx*<sub>2</sub>    73: *stx*<sub>2c</sub>    74: *stx*<sub>2d</sub>    75: *stx*<sub>2e</sub>    76: *stx*<sub>2f</sub>  
77: *eae*    78: *E-hly* (*hlyA*)      79: Andere \*\*

\*\* (bitte unter **Bemerkungen** kurz erläutern)

## BACTERIAL GENOME DETECTION

### CODE Numbers PCR-/NAA EHEC / STEC (434)

Code numbers are subdivided into seven groups. Although providing technical specifications of the applied assays is highly desired for statistical purposes (individual data will be kept confidential), completing groups [I] to [V], and [VII], is voluntary.

Completing of group [VI] is mandatory.

#### Group [I] (Sample preparation)

11: Proteinase K / spin column  
12: Commercial DNA extraction kit \*\*  
13: Phenol / chloroform extraction      19: Other \*\*

#### Group [II] (Amplification)

27: Commercial assay system / kit \*\*  
28: *In house* PCR assay      29: Other \*\*

#### Group [III] (Detection / identification)

31: Commercial assay system (codes 21-27)  
32: Agarose gel electrophoresis  
33: Hybridization with labelled probe  
34: Nested PCR  
35: Real-Time PCR (TaqMan format)  
36: Real-Time PCR (LightCycler)  
37: DNA sequencing      39: Other \*\*

#### Group [IV] (Positive and/or inhibition control)

41: Commercial assay system (codes 21-27)  
42: Internal control (recombinant plasmid etc.)  
43: External controls (plasmid,  $\beta$ -globin gene, etc.)  
44: Genomic DNA of the corresponding pathogen  
48: Other \*\*      49: No inhibition control applied

#### Group [V] (Target gene)

51: Commercial assay system (codes 21-27)  
52: Shiga toxin genes (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>)      59: Other \*\*

#### Group [VI] (Results)

61: **Positive**      63: **Questionable**  
62: **Negative**      64: **Inhibition**

#### Group [VII] (Molecular subtyping)

71: *stx*<sub>1</sub>  
72: *stx*<sub>2</sub>    73: *stx*<sub>2c</sub>    74: *stx*<sub>2d</sub>    75: *stx*<sub>2e</sub>    76: *stx*<sub>2f</sub>  
77: *eae*    78: *E-hly* (*hlyA*)      79: Other \*\*

\*\* (please specify in the **Comments** section)