



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 9 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 in gewohnter Weise der beigefügten 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 Veröffentlichungen in den Zeitschriften "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.) und "Hygiene und Mikrobiologie" (Herausgeber: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., DGHM) verwiesen:

> 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.

> Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2004) "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT": Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Hyg. Mikrobiol.* **8**:19-21.

Bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir nach wie vor für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer.

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. Hans Wolf

Prof. Dr. Norbert Lehn

Prof. Dr. Eberhard Straube

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2004:

Nachdem in der vorhergegangenen Runde (November 2003) dieser neuen Ringversuchs-Serie einige Proben mit relativ geringer Keimzahl versandt wurden, wollten wir bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) den Versand von Proben mit relativ niedriger Keimzahl vermeiden. Es sei aber an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß noch zahlreiche Rückstell-Probensätze des letzten Ringversuchs verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets enthalten unter anderem als "grenzwertig positiv" zu bezeichnende Proben für *B. pertussis* (Probe # 32202), *H. pylori* (Probe # 32302), *B. burgdorferi* (Probe # 32503), *L. pneumophila* (Probe # 32601) und für *Salmonella enteritidis* (Probe # 32702) und können im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung beispielsweise als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

Bei den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen jedoch wieder deutlich über der "durchschnittlichen Nachweisgrenze" eingestellt, die wie folgt definiert wird: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gut evaluierte Primersequenzen). Falsch-negative Ergebnisse stellen in der aktuellen Ringversuchsrunde damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar. Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung und/oder auf mangelnde Spezifität der eingesetzten Testsysteme zu betrachten.

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 dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, 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"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)"
als *pdf*-Files zum freien 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 Shigatoxine 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 Übernachtskulturen von entsprechenden 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 das für Intimin codierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin codierende *hlyA*-Gen) 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 inzwischen sehr umfangreichen Sammlung von *stx*-positiven *E. coli* ausgewählt. Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde die eine der beiden positiven Proben (# 41403; *E. coli* O103:2, *stx*₁-positiv, *eae*- und *hlyA*-positiv) von allen 52 Teilnehmern und die andere positive Probe (# 41404; *E. coli* O146:H28, *stx*₂-positiv, *eae*- und *hlyA*-negativ) von 45 der insgesamt 52 Teilnehmer zuverlässig als EHEC identifiziert.

Bis auf 7 falsch-negative Ergebnisse für Probe # 41404 (diese Probe enthielt ein EHEC-Isolat, das nur positiv für *stx*-2 aber negativ für *eae* und *hlyA* war) wurden erfreulicherweise von jedem Teilnehmer für die drei übrigen Proben dieses Ringversuchs durchwegs korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Die Mehrzahl der Teilnehmer verwendete dabei selbstentwickelte (*in house*) oder "andere" Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet. Lediglich 6 Teilnehmer gaben die Verwendung von kommerziellen NAT-Testsystemen für die Nukleinsäure-gestützte EHEC-Diagnostik an.

Die vielfältigen 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 37 der 52 Teilnehmer, zumindest in gewissem Umfang, die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren doch bei 34 Teilnehmern die Angaben in dem mitgeteilten Umfang korrekt.

**PCR-/NAT EHEC / STEC
 (RV 434) April 2004**

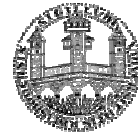


Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.
Sample composition and expected results.

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
41401	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i>)
41402	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i>)
41403	++	61 / 71,77,78	EHEC (~ 5x10 ⁵ CFU/mL) (O103:H2; <i>stx</i> -1; <i>eae</i> ; <i>hlyA</i>)
41404	++	61 / 72	EHEC (~ 5x10 ⁵ CFU/mL) (O146:H28; <i>stx</i> -2)

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

n = 52	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	41401	41402	41403	41404		41401	41402	41403	41404
Befund <i>Result</i>									
Positiv	0	0	52	45	n.d.	3	3	3	3
Negativ	52	52	0	7	nein <i>no</i>	49	49	49	49
Fraglich <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>	%
In house PCR assay [28] (n = 46)	85 ^{1) 2)}	85 / 92	92	92	92 / 92	92
Other commercial tests [27] (n = 6)	12	12 / 12	100	12	12 / 12	100
Andere / other [29] (n = 2)	4	4 / 4	100	4	4 / 4	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.

Comments:
 1) Seven false-negative results were reported for sample # 41404 (*stx*-2 pos; *eae* neg.; *hlyA* neg.).
 2) Shiga-toxin subtyping was performed by 37 laboratories. Correct results for sample # 41403 were reported by 34 laboratories and for sample # 41404 by 33 laboratories, respectively.

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 in 2002 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", 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 / September), a reasonable price around \$ 150 per set of 4 samples, 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", 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).

Yours sincerely,



Udo Reischl



434 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 04.2004

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

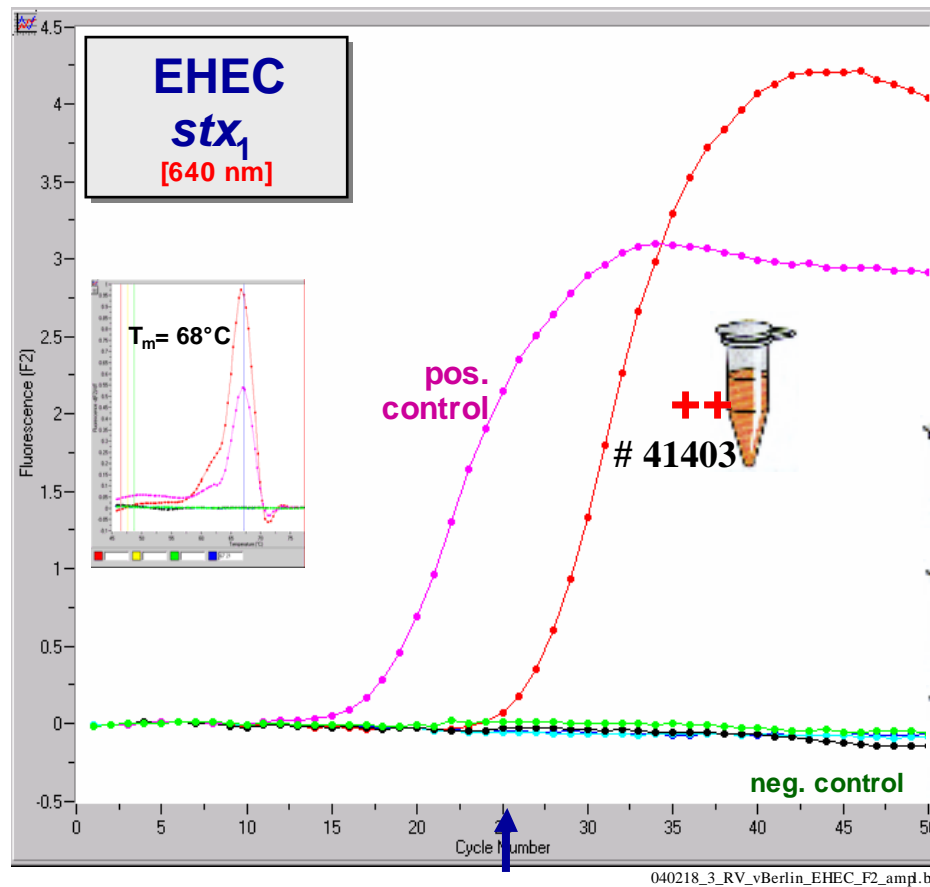
Reischl / Lehn / Wolf

- 13 EHEC 41401
- 14 EHEC 41402
- 15 EHEC 41403 23.34
- 16 EHEC 41404
- 17 poKo EHEC 347 11.10
- 18 negKo

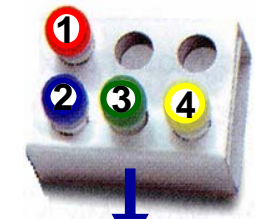


LightCycler PCR protocol:

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: ~10⁴



- 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/RIMM/02.2004





434 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 04.2004

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

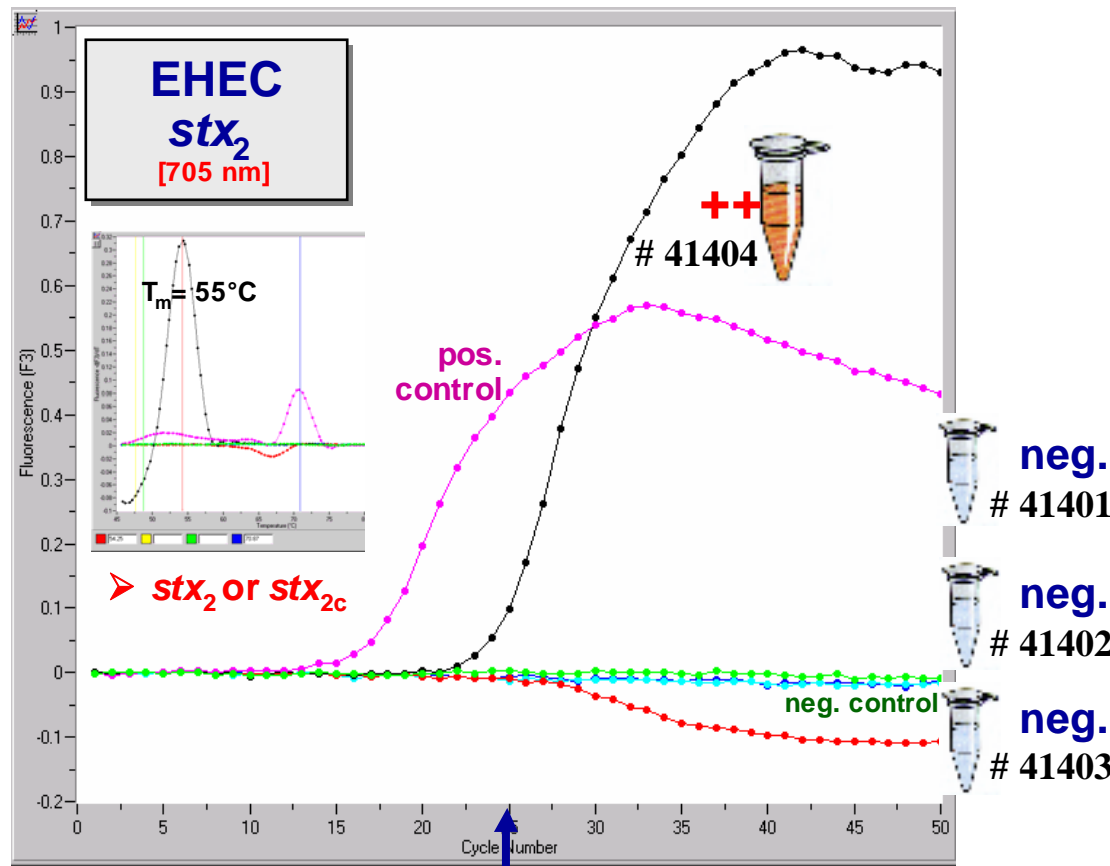
Reischl / Lehn / Wolf

- 13 EHEC 41401
- 14 EHEC 41402
- 15 EHEC 41403
- 16 EHEC 41404 24.23
- 17 poKo EHEC 347 16.97
- 18 negKo



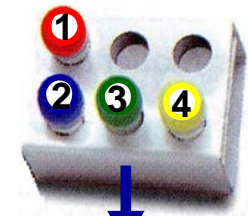
LightCycler PCR protocol:

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: $\sim 10^4$

040218_3_RV_vBerlin_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/RIMM/02.2004





434 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 04.2004

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

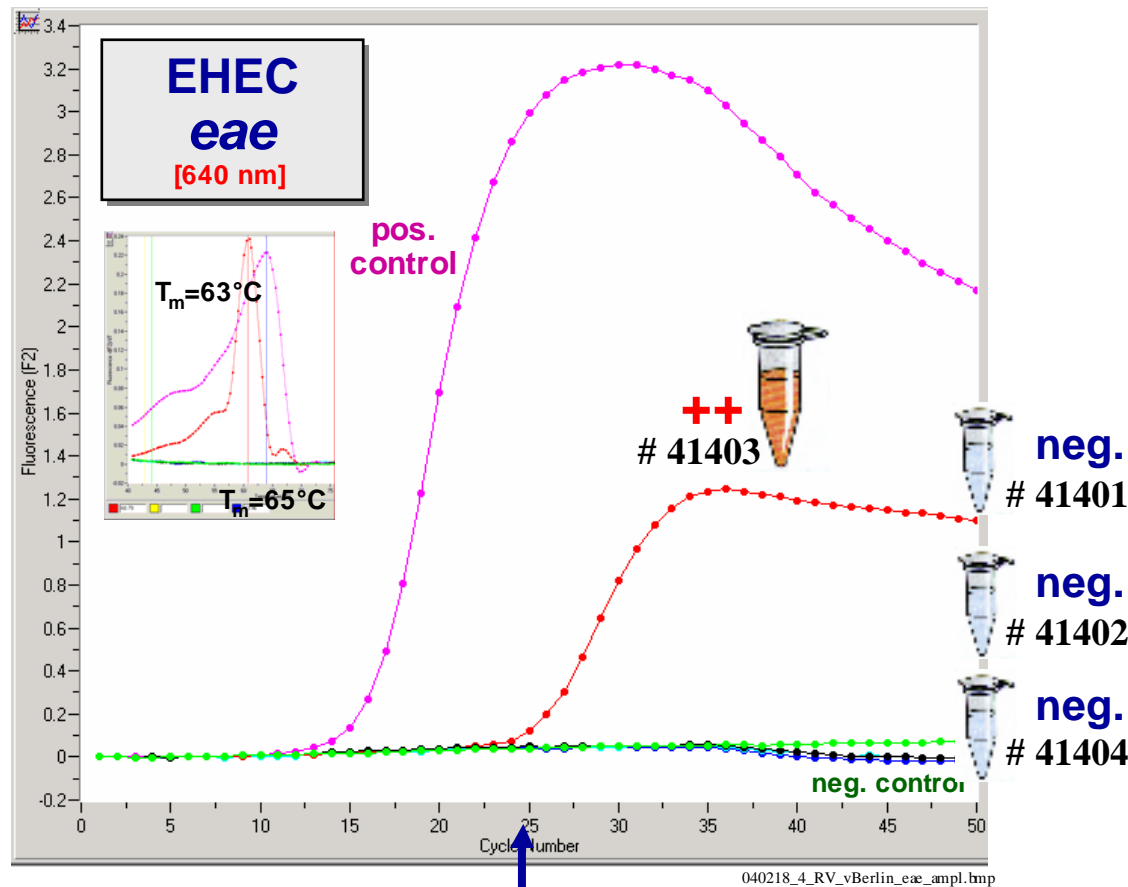
Reischl / Lehn / Wolf

- 23 EHEC 41401
- 24 EHEC 41402
- 25 EHEC 41403 25.52
- 26 EHEC 41404
- 27 poKo eae 347 16.08
- 28 negKo

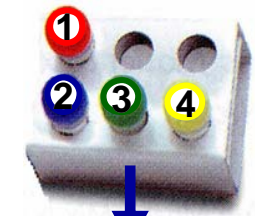


LightCycler PCR protocol:

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: $\sim 10^4$



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 μ 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/RIMM/02.2004





434 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 04.2004

Reischl / Lehn / Wolf

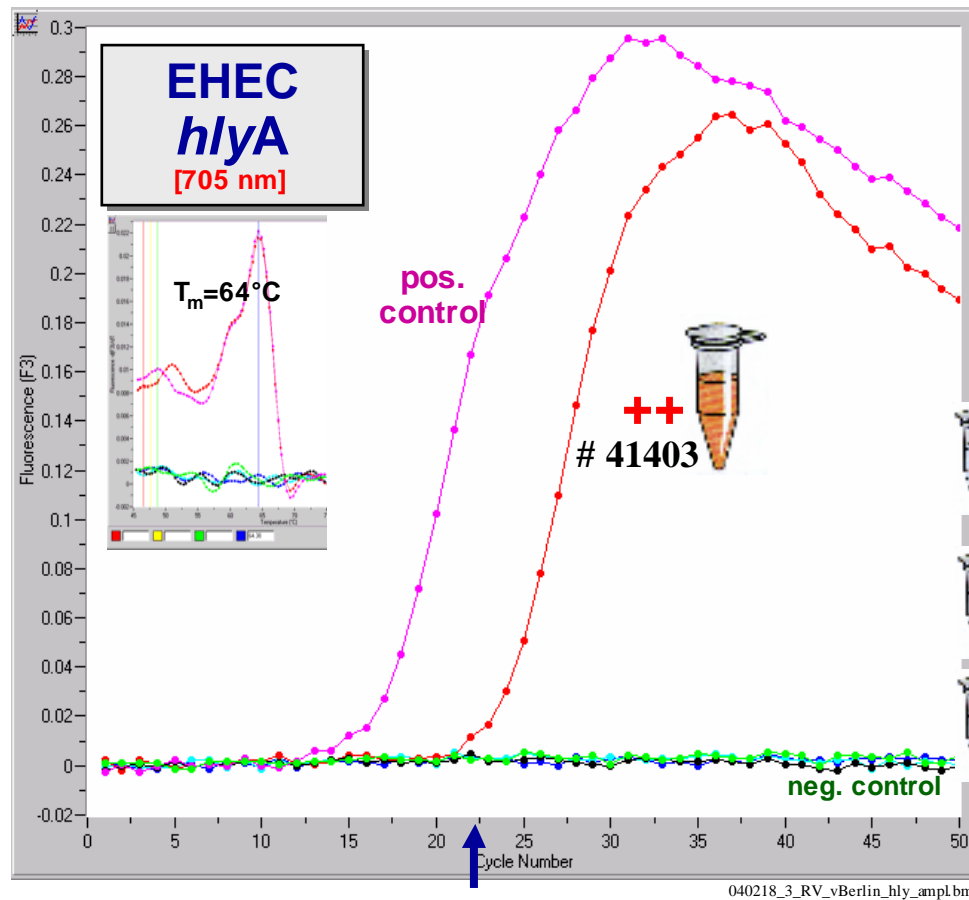
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

- 1 EHEC 41401
- 2 EHEC 41402
- 3 EHEC 41403 23.78
- 4 EHEC 41404
- 5 poKo hlyA 347 16.94
- 6 negKo

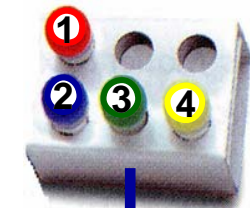


LightCycler PCR protocol:

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: $\sim 10^4$



- 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/02.2004

