



**An die Teilnehmer  
der INSTAND e.V. -Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT  
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 541)**

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 20-26 of this document. As always, result tables are depicted in a bilingual style.*

**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 wie gehabt auf folgende Veröffentlichungen in den Zeitschriften "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: BÄMI, Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.) und "Hygiene und Mikrobiologie" (Herausgeber: DGHM, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.) 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) *Hyg. Mikrobiol.* **8**:19-21.

Sowohl im Zusammenhang mit einer Erweiterung unseres Ringversuchsprogramms als auch bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Erfreulicherweise waren die Kommentare in den letzten sieben Jahren überwiegend positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

**PD Dr. Udo Reischl**

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis  
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

**Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle**

June 8, 2010

To the participants of the  
INSTAND external quality assessment scheme (EQAS)  
for NAATs in Diagnostic Bacteriology  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 541)

**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., Düsseldorf, Germany (attached to this letter).

This highly desired sheme for external quality assessment (EQAS) 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.instandev.de](http://www.instandev.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 (spring and autumn), a reasonable price of less than € 150 per set, 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. But now 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 as well as the documented and analyzed results of the past rounds of our quality control and proficiency test program "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. **New since 2009:** due to the growing number of international participants, we will further include a brief discussion of the results in English (see the following pages).

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

If you should have any further questions, please do not hesitate to contact me by e-mail: "[udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de](mailto:udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de)"

With best personal regards,



**PD Dr. Udo Reischl**

Organizer of the proficiency testing program "Bacterial Genome Detection"  
Member of the Quality Assurance Board (DGHM; German Society of Hygiene and Microbiology)

**Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle**

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 11 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder zwei „highlights“: zum einen wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 531 wieder die **schwedische Chlamydienvariante (nvCT)** ausgesandt und zum anderen befand sich der **sog. Züricher Drogenstamm** in einer der 4 Proben des MRSA Ringversuchs RV 539.

Eine weitere Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir beschäftigen uns gerade mit der Konfektionierung und Herstellung eines Proberingversuchs für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis*. Eine limitierte Anzahl von entsprechenden Probensets wird voraussichtlich im Rahmen der kommenden Ringversuchsrunde im November 2010 für interessierte Teilnehmer verfügbar sein. Als Sollwertlabor fungieren hier die Kollegen Dr. D. Frangoulidis und Dr. W. Splettstösser vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen.

**Übrigens:** das **REMMDI 2011** wird vom **14.-16. April 2011** wieder in Regensburg stattfinden. Diesen Termin eventuell schon mal vormerken... Nähere Informationen finden Sie demnächst unter [www.remmdi.de](http://www.remmdi.de)

### APRIL 2010:

Entsprechend des Grundgedankens unserer Ringversuchsaktivitäten wurde auch bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum "Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)" bei einigen Zielorganismen der Versand von Proben mit relativ niedrigen Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 1015303, 1015304, sowie die schwach positive Probe des RV 531 # 1015314), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1015303), *Bordetella pertussis* (Probe # 1015324), *Helicobacter pylori* (Probe # 1015334), *Borrelia afzelii* (Probe # 1015352), *Legionella pneumophila* (Probe # 1015363), sowie *Listeria monocytogenes* (Probe # 1015381). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 1015313 dieser Ringversuchsrunde. Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten "grenzwertig positiven" Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von "durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten" eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

Bei den meisten Probenmaterialien der aktuellen Ringversuchsrunde stellen falsch-negative Ergebnisse damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar. Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel 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 (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. 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 prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum "Gelegenheitsanwender" abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden. Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder 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 graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. ([www.instandev.de](http://www.instandev.de)) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

## RV 534: EHEC / STEC

Wie auch bereits bei den vorhergegangenen Runden dieses Ringversuchs mehrfach diskutiert, besteht die eigentliche Herausforderung bei dem Nukleinsäure-gestützten Nachweis von EHEC/STEC prinzipiell nicht so sehr in dem Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen, sondern vielmehr in der differenzierten Analyse und der Typisierung unterschiedlicher Shiga-Toxin-Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen) von entsprechenden Zielorganismen. Aus diesem Grund werden von uns bei der Probenkonfektionierung meist nicht nur klassische "Prototyp" EHEC-Stämme (wie z.B. O157:H7), sondern relativ willkürlich auch Routineisolate aus einer inzwischen sehr umfangreichen Sammlung von *stx*-positiven *E. coli* ausgewählt.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit einer relativ hohen Menge von ca.  $10^5$  CFU/ml der entsprechenden EHEC Zielorganismen (# 1015341, *E. coli*, klinisches Isolat, *stx*<sub>1</sub>-positiv, *stx*<sub>2c</sub>-positiv, *eae*-positiv und *hlyA*-positiv), eine Probe mit etwas geringerer Menge von ca.  $1 \times 10^4$  CFU/ml (# 1015342, *E. coli*, klinisches Isolat, *stx*<sub>1</sub>-positiv, *stx*<sub>2</sub>-negativ, *eae*-positiv und *hlyA*-positiv), eine Probe mit einem klinischen Isolat eines LT-positiven enterotoxischen *E. coli* (ETEC; # 1015343), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1015344), die ausschließlich *E. coli* (*eae*- und *hlyA*-negativ) und humanes Zellmaterial enthielt.

Die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC führte hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten - sowohl für positive als auch für negative Befunde. Aus Sicht des Ringversuchsleiters zeigten sich diesmal keine besonderen Auffälligkeiten hinsichtlich der Performance bestimmter Testkonzepte. Bis auf 4 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für die etwas schwächer positive Probe # 1015342 (ca. ca.  $10^4$  CFU/ml) wurden hier durchwegs richtige PCR/NAT-Befunde übermittelt.

Da in den meisten der teilnehmenden Laboratorien ein NAT-gestützter Nachweis von Shiga-Toxin Genen im Umfeld der EHEC-Diagnostik primär als Kulturbestätigungstest eingesetzt wird, werden bei zukünftigen Ringversuchen auch die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten, und der Schwerpunkt bleibt auf der Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze.

Die Mehrzahl der Teilnehmer gab die Verwendung von selbstentwickelten oder "anderen" Testsystemen mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC an, und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet. Neben den 16 Teilnehmern, die für die Testung der Ringversuchsproben den Hain GenoType EHEC Kit einsetzten, gaben weitere 3 Teilnehmer hier die Verwendung von kommerziellen NAT-Testsystemen für die Nukleinsäure-gestützte EHEC-Diagnostik an - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits nicht durchgehend spezifiziert. Es wurde lediglich von 2 Teilnehmern die Verwendung des BAG Hyplex EHEC Kits angegeben.

Zudem wurden von 65 der insgesamt 74 Teilnehmer 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 diese Angaben bei 64 Teilnehmern, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, korrekt. Lediglich von einem der Teilnehmer wurde bei der EHEC-positiven Probe # 1015342 neben *stx*-1 fälschlicherweise auch ein positives Resultat für *stx*-2 mitgeteilt.

## **ENGLISCH:**

### **RV 534: EHEC / STEC**

The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1015341 (*E. coli*,  $\sim 10^5$  CFU/ml, clinical isolate, *stx*<sub>1</sub>-positive, *stx*<sub>2c</sub>-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive) and # 1015342 (*E. coli*,  $\sim 10^4$  CFU/ml, clinical isolate, *stx*<sub>1</sub>-positive, *stx*<sub>2</sub>-negative, *eae*-positive and *hlyA*-positive). The other two EHEC-negative samples contained a LT-positive enterotoxigenic *E. coli* (ETEC; # 1015343;  $\sim 10^4$  CFU/ml), and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1015344). Overall, there was a pretty good diagnostic performance of the EHEC-specific assays used by the 74 participants and only 4 false negative results were observed for sample # 1015342, containing about  $10^4$  CFU/ml of a *stx*<sub>1</sub>-positive, *stx*<sub>2</sub>-negative, *eae*-positive and *hlyA*-positive EHEC strain. Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples.

Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 65 laboratories and, with the exception of one participant who report a false-positive *stx*-2 result for sample # 1015342, all of the reported results were correct

**PCR-/NAT EHEC / STEC  
 (RV 534) April 2010**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
1015341	+++	61 / 71,73,77,78	EHEC (~1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) ( <i>stx-1, stx-2c, eae, hlyA</i> )
1015342	++	61 / 71,77,78	EHEC (~1x10 <sup>4</sup> CFU/mL) ( <i>stx-1, eae, hlyA</i> )
1015343	Ø	62	ETEC (~1x10 <sup>4</sup> CFU/mL) (LT positive)
1015344	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i> )

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

n = 74	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1015341	1015342	1015343	1015344		1015341	1015342	1015343	1015344
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	74 <sup>1)</sup>	70 <sup>1)</sup>	0	0	n.d.	3	3	3	3
<b>Negativ</b>	0	4	74	74	nein <i>no</i>	71	71	71	71
<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>	%
GenoType EHEC (Hain) [20] (n = 16)	30	30 / 32	94	32	32 / 32	100
Other commercial tests [27] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	6 / 6	100
In house PCR assay [28] (n = 50)	98	98 / 100	98	100	100 / 100	100
Andere/ k.A. / other [29] (n = 4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	100

**Comments:** <sup>1)</sup> Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 65 laboratories. With the exception of 1 laboratory (who report a false-positive results for *stx-2* for sample 1015342), the reported results were correct.



**534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC** status 04.2010

**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

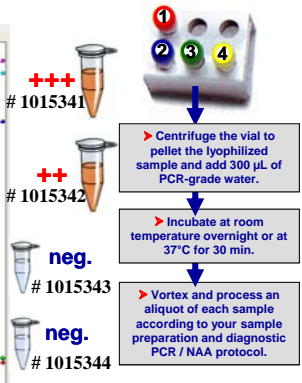
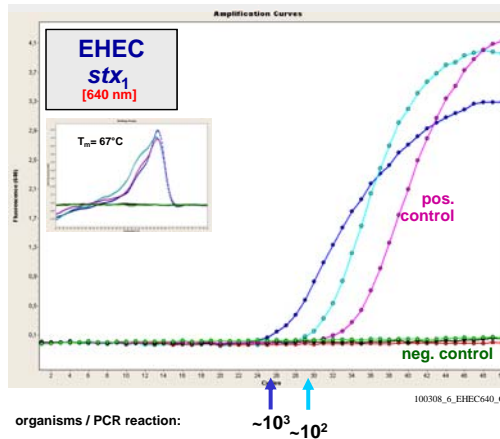
Reischl / Linde / Wolf

- 1 1015341 26,06
- 2 1015342 30,10
- 3 1015343
- 4 1015344
- 5 Pos. Ko. EHEC 33,71
- 6 NTC



**LightCycler PCR protocol:**

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Sirockbine (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.



INSTAND-D03\_I/10



**534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC** status 04.2010

**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

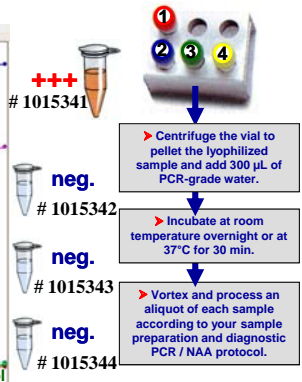
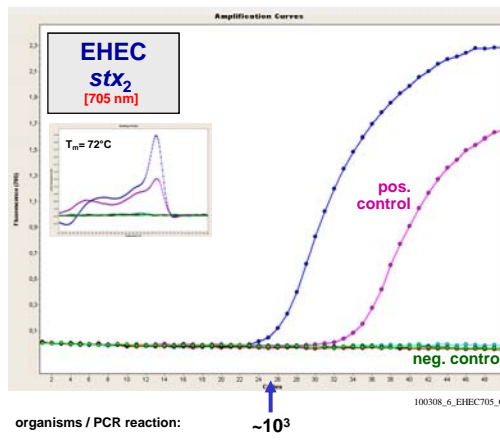
Reischl / Linde / Wolf

- 1 1015341 25,05
- 2 1015342
- 3 1015343
- 4 1015344
- 5 Pos. Ko. EHEC 33,55
- 6 NTC



**LightCycler PCR protocol:**

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Sirockbine (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.



INSTAND-D04\_I/10





**534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC** status 04.2010  
 Reischl / Linde / Wolf

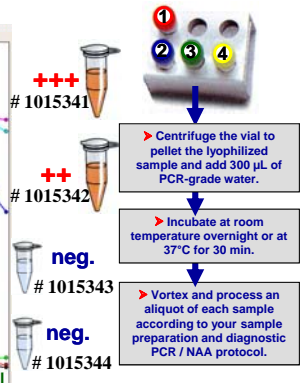
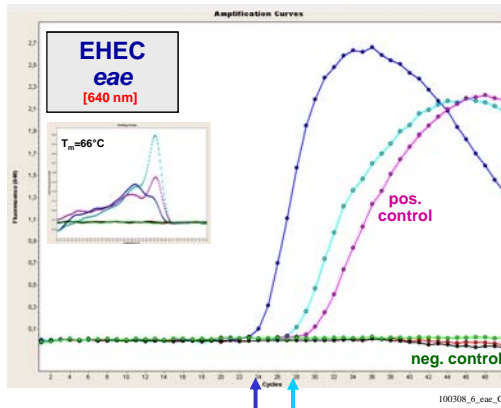
**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

7	1015341	23.01
8	1015342	26.84
9	1015343	
10	1015344	
11	Pos. Ko. eae	28.97
12	NTC	



**LightCycler PCR protocol:**

Reischl, U., M.T. Yousef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockbine (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.



INSTAND-D05\_I/10



**534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC** status 04.2010  
 Reischl / Linde / Wolf

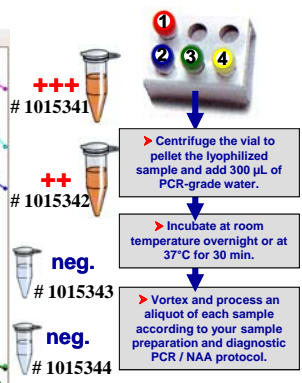
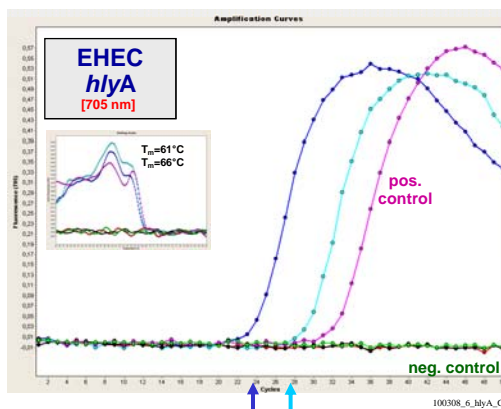
**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

13	1015341	22.70
14	1015342	28.10
15	1015343	
16	1015344	
17	Pos. Ko. hlyA	31.35
18	NTC	



**LightCycler PCR protocol:**

Reischl, U., M.T. Yousef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockbine (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.



INSTAND-D06\_I/10





Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg  
<http://www.udo-reischl.de>

INSTAND e. V.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>



**534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC** status 04.2010

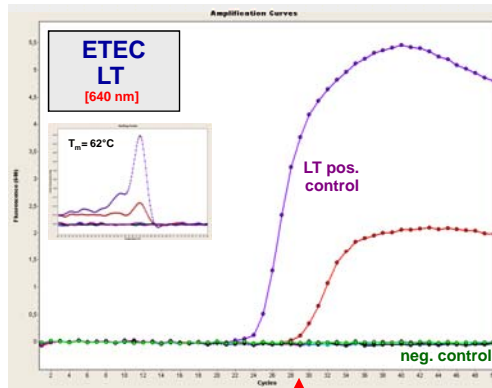
**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf

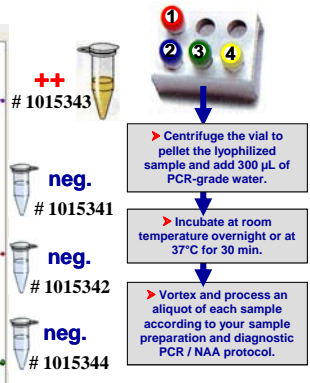
- 19 1015341
- 20 1015342
- 21 1015343 27,64
- 22 1015344
- 23 Pos. Ko. ETEC ST
- 24 Pos. Ko. ETEC LT 22,92
- 25 NTC



**LightCycler PCR protocol:**  
 Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski,  
 N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A.  
 Stroockbine (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>2</sup>



INSTAND-D07\_I/10



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg  
<http://www.udo-reischl.de>

INSTAND e. V.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>



**534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC** status 04.2010

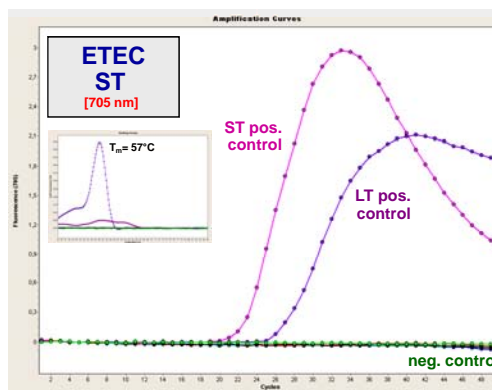
**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf

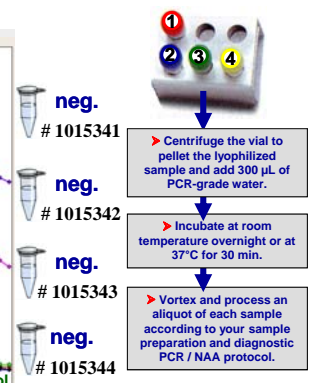
- 19 1015341
- 20 1015342
- 21 1015343
- 22 1015344
- 23 Pos. Ko. ETEC ST 21,54
- 24 Pos. Ko. ETEC LT 25,83
- 25 NTC



**LightCycler PCR protocol:**  
 Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski,  
 N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A.  
 Stroockbine (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:



INSTAND-D08\_I/10



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg  
<http://www.udo-reischl.de>

IN STAND e. V.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>

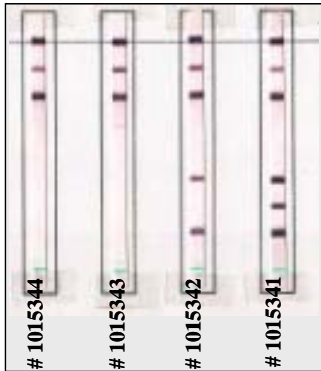


**534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC** status 04.2010

➤ **Evaluation (commercial PCR assay):** Reischl / Linde / Wolf

**GenoType EHEC  
 VER 2.0**

GenoType EHEC  
 Molekulargenetisches Testsystem zur Bestimmung der  
 Shiga-Toxin-Gene *stx1* und *stx2*, des Intimin-Gens *eae*  
 Sowie des *ipaH*-Gens



- ← Konjugatkontrolle (CC)
- ← Universalkontrolle (UC)
- ← *E. coli* / *Shigella* ssp.
- ← *ipaH* / EIEC
- ← *stx1*
- ← *stx2*
- ← *eae*

Genotyp\_EHEC



- 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.



**Hain Lifescience GmbH**  
 Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany  
<http://www.hain-lifescience.de>



IN STAND-D09\_I/10