



Regensburg, den 13. Mai 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 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 prozentualen 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 437: *Salmonella enterica*

Die relativ hohe Menge an Zielorganismen und die Verfügbarkeit von gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte bei den beiden stark positiven Proben # 41701 (*Salmonella typhimurium*, $\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml), # 41702 (*Salmonella virchow*, $\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml) und bei der negativen Probe # 41704 zu Richtigkeitsquoten im Bereich von 100%. Probe # 41703 enthielt diesmal eine etwas geringere Menge an *S. typhimurium*, die aber zumindest mit den PCR-Testsystemen von 4 der insgesamt 6 Ringversuchsteilnehmer noch zuverlässig nachzuweisen war. Aufgrund der relativ hohen Menge an Zielorganismen kann hier der positive Nachweis von *Salmonella*-DNA in Probe # 41703 nicht unbedingt als Qualitätskriterium für hohe Sensitivität des eingesetzten PCR-Testsystems betrachtet werden.

Für eine aussagekräftige Abprüfung der unteren Nachweisgrenze von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen sollte in diesem Zusammenhang auf die Rückstellprobe # 32702 des Ringversuchs November 2003 zurückgegriffen werden, die definitiv eine "grenzwertig" geringe Menge an *S. enteritidis* Zielorganismen enthielt.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 6 Teilnehmern kein falsch-positiver und nur 1 falsch-negativer Befund mitgeteilt. Von 2 der 6 Teilnehmer wurde dabei die Verwendung eines "kommerziellen Testsystems / Kit" angegeben. Mit der zunehmenden Anzahl von Teilnehmern und einer zunehmenden Verfügbarkeit von unterschiedlichsten kommerziellen Testsystemen wird es interessant sein zu verfolgen, inwieweit sich im Laufe der nächsten Ringversuchsrunden Unterschiede in der analytischen Sensitivität von selbstentwickelten und kommerziellen Testsystemen abzeichnen werden.

Basierend auf den ersten Erfahrungen mit dieser neuen Ringversuchsserie werden wir uns bemühen, daß auch die kommenden Ringversuchsrunden eine gewisse Herausforderung an die jeweiligen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen darstellen. In enger Abstimmung mit unseren Sollwert-Laboratorien soll zukünftig zumindest eine der 4 Proben mit einer solchen Menge an Zielorganismen versetzt werden, die im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften und/oder Richtlinien der einzelnen Fachgesellschaften als untere Nachweisgrenze für den NAT-gestützten Salmonellen-Nachweis gefordert wird.

**PCR-/NAT *Salmonella enterica*
 (RV 437) April 2004**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
41701	++	61	<i>Salmonella typhimurium</i> (~ 5x10 ⁶ CFU/mL)
41702	++	61	<i>Salmonella virchow</i> (~ 5x10 ⁶ CFU/mL)
41703	+	61	<i>Salmonella typhimurium</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
41704	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 6	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	41701	41702	41703	41704		41701	41702	41703	41704
Befund Result									
Positiv	6	6	5	0	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	0	1 ¹⁾	6	nein no	6	6	6	6
Fraglich Questionable	0	0	0	0	ja yes	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 4)	11	11 / 12	92	4	4 / 4	100
Other commercial tests [27] (n = 2)	6	6 / 6	100	2	2 / 2	100
Andere / other [29] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	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⁾ One of the 6 participants reported a false-negative result for sample # 41703. Here the use of an *in house* PCR assay (phenol/chloroform extraction; agarose gel analysis; internal control plasmid) and "other" target gene was indicated.

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

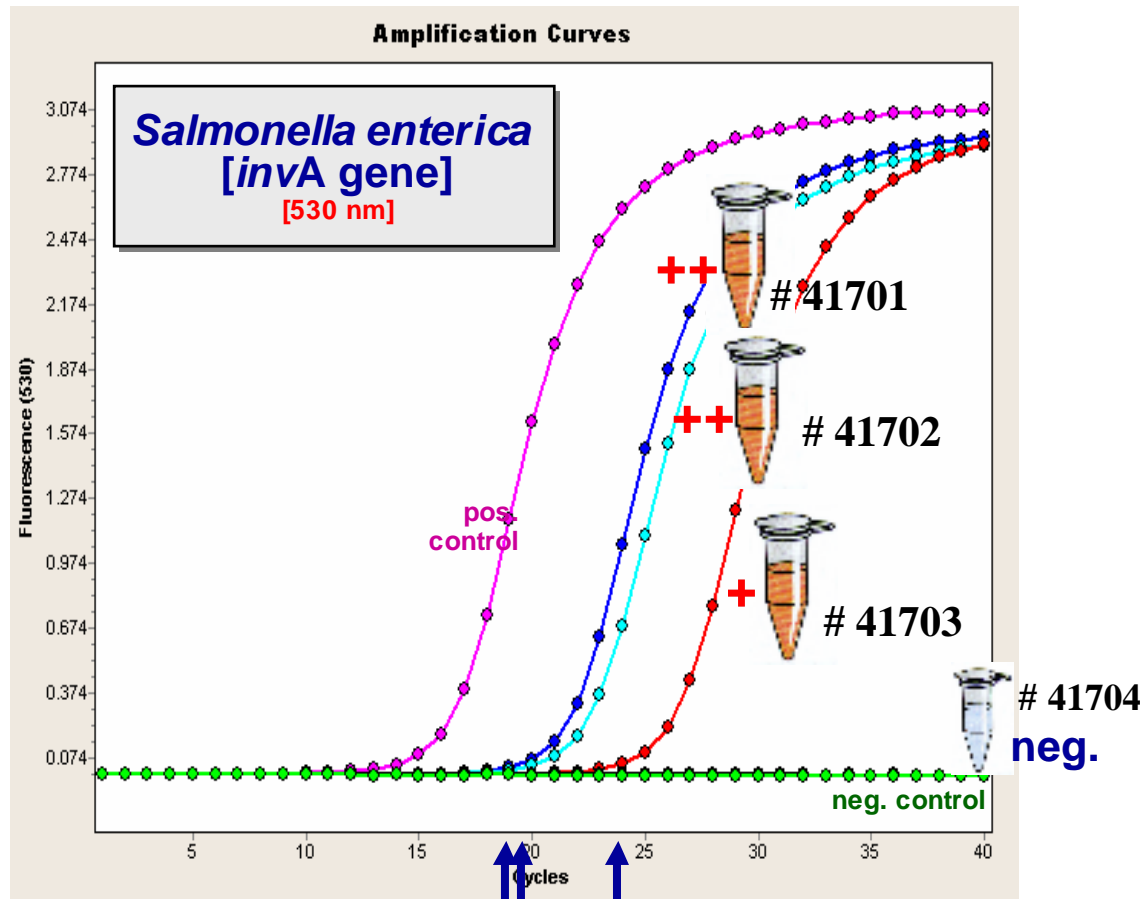


437 Bakteriengenom-Nachweis *Salmonella enterica* status 04.2004

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

In...	C...	P...	Name	CP
<input checked="" type="checkbox"/>	1	Saen	41701	20.17
<input checked="" type="checkbox"/>	2	Saen	41702	21.02
<input checked="" type="checkbox"/>	3	Saen	41703	24.87
<input checked="" type="checkbox"/>	4	Saen	41704	
<input checked="" type="checkbox"/>	5	poKo	Saen	15.00
<input checked="" type="checkbox"/>	6	negKo		

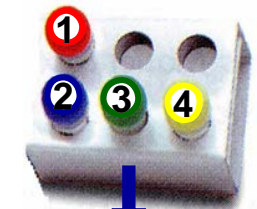


organisms / PCR reaction: $\sim 10^5$ $\sim 10^4$

040218_5_RV_Berlin_Salm_ampl.bmp



LightCycler PCR protocol:
 Daum et al. (2002), *J. Clin. Microbiol.*
 40: 3050-3052.
 (TaqMan assay format)



➤ 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/RIMMH/02.2004

