



**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 540)**

Dear Participant, dear Colleague,
Please find a cover letter in English on page 15 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: 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 erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer.

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl
Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. H. Wolf Prof. Dr. N. Lehn Prof. Dr. E. Straube Prof. Dr. M. Maaß

AKTUELLE HINWEISE:

Nach dem sehr erfolgreichen Verlauf der initialen "Probe-Ringversuche" wurden RV 539 "MRSA bzw. cMRSA" (sog. *community-associated* Methicillin-resistente *S. aureus*) und RV 540 "*Chlamydia pneumoniae*" nun als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen. Die Konzeption und Auswertung der *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen Ringversuche erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Maaß vom Universitätsklinikum Salzburg, der hier auch als Ringversuchsleiter fungiert.

Ab der aktuellen Ringversuchsreihe zum "Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken" werden die einzelnen Ringversuche bei INSTAND e.V. aus organisatorischen Gründen jetzt der 500er-Nummerngruppe zugeordnet. Die entsprechenden Ringversuchsnummern (ehemals RV 430 bis RV 438) ändern sich dann wie folgt: RV 430 > RV 530; RV 431 > RV 531; u.s.w. Wir bitten dies bei der Anmeldung zu beachten.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2006:

Nachdem in einigen der vorhergegangenen Runden dieser Ringversuchs-Serie vorwiegend Proben mit relativ hoher Keimzahl versandt wurden, wird bei der Konzeption des aktuellen und der zukünftigen Ringversuche zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) bei einigen Zielorganismen auch der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets an Rückstellproben enthalten u.a. 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).

Auch in den aktuellen Ringversuchssets befinden sich wieder einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 52101), *B. pertussis* (Probe # 52204), EHEC (Probe # 52401), *L. pneumophila* (Probe # 52603), *L. monocytogenes* (Probe # 52801), MRSA (Probe # 52903), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 52411). 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.

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 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, 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). 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. 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 auch immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

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

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 kommerziellen PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 534: EHEC / STEC

Wie 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 gezielten 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 codierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin codierende *hlyA*-Gen) von entsprechenden Zielorganismen. Aus diesem Grund werden bei der Probenkonfektionierung von uns meist nicht nur die klassischen "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.

Da wir uns innerhalb des gesamten Ringversuchsprogramms jedoch nur gelegentlich und nicht regelmäßig auch mit einzelnen Proben an die derzeit technisch machbare untere Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns dabei sehr wohl bewusst, daß bei vielen Fragestellungen das "technisch machbare" nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem "diagnostisch sinnvollen" ist), wurden die beiden positiven Proben des aktuellen Probensets (# 61402; *E. coli* O103:H2, *stx*₁-positiv, *eae*- und *hlyA*-positiv; sowie # 61403; *E. coli* O146:H28, *stx*₁-negativ, *stx*₂-positiv, *eae*- und *hlyA*-negativ) diesmal mit "nicht so ganz geringen" Mengen der entsprechenden Zielorganismen versetzt.

Offensichtlich stellte vor allem der gezielte Nachweis des ausschließlich *stx*₂-positiven *E. coli* O146:H28 aus der Probe # 61403 eine gewisse Herausforderung an die analytische Sensitivität und auch Spezifität der individuellen NAT-gestützten Testsysteme dar. Obwohl sie sogar noch um eine Zehnerpotenz mehr Zielorganismen als die Probe # 61402 enthielt, wurde sie von 5 der insgesamt 60 Teilnehmer als negativ befundet. Dies spiegelt sich bei der statistischen Auswertung natürlich unmittelbar in den entsprechend niedrigen Richtigkeitsquoten für die positiven Ergebnisse wider.

Die beiden falsch-positiven Ergebnisse bei Probe # 61404 sind wohl am ehesten mit laborinternen Kontaminationsereignissen vereinbar.

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 die meisten der positiven Proben auch wieder deutlich höhere Mengen an Zielorganismen enthalten und der Schwerpunkt wird wieder auf der Abprüfung der Spezifität der eingesetzten Testsysteme und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze liegen. Werden in bestimmten Laboratorien solche Nachweisverfahren jedoch auch zum gezielten Direktnachweis von EHEC in klinischem Untersuchungsmaterial oder in Lebensmittelproben eingesetzt und ist deren Spezifität auch für das *stx*₂-Gen von EHEC / STEC gezeigt, so sollten falsch-negative Ergebnisse bei den Proben # 61402 und # 61403 Anlaß zur Überprüfung und Optimierung des jeweiligen Testsystems geben. Abgesehen von den zuvor diskutierten 7 falsch-negativen Ergebnissen wurden bei den übrigen Proben erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquoten erzielt. 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 13 Teilnehmer gaben hier die Verwendung von kommerziellen NAT-Testsystemen für die Nukleinsäure-gestützte EHEC-Diagnostik an - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits nicht durchgehend spezifiziert.

Zudem wurden von 48 Teilnehmern 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 der Mehrzahl der Teilnehmer, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, korrekt.

**PCR-/NAT EHEC / STEC
 (RV 534) April 2006**



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

Gruppe A	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
61401	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i>)
61402	+	61 /71,77, 78	EHEC (~1x10 ⁴ CFU/mL) (O103:H2; <i>stx-1</i> , <i>eae</i> , <i>hlyA</i>)
61403	++	61 /72	EHEC (~1x10 ⁵ CFU/mL) (O146:H28; <i>stx-2</i>)
61404	∅	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.

<i>n = 60</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	61401	61402	61403	61404	61401	61402	61403	61404	
Befund Result									
Positiv	0	58 ¹⁾	55 ¹⁾	2	n.d.	2	2	2	2
Negativ	60	2	5	58	nein no	58	58	58	58
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 <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 = 44)	81	81 / 88	92	86	86 / 88	98
Other commercial tests [27] (n = 13)	26	26 / 26	100	26	26 / 26	100
Andere/ k.A. / 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.

Comments: ¹⁾ Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by **48 laboratories**. With the exception of 2 results for sample 61402 and 1 result for sample 61403, the reported results were correct.

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 540)

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 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 of proficiency testing. 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 proficiency test program "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).

With best personal regards,



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. H. Wolf Prof. Dr. N. Lehn Prof. Dr. E. Straube Prof. Dr. M. Maaß



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

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 04.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

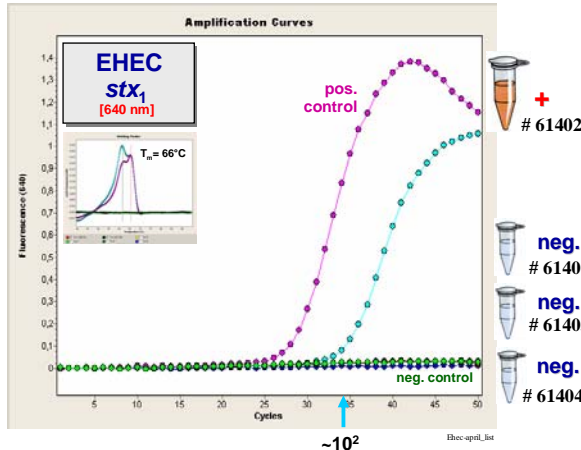
Reischl / Lehn / Wolf

1	61401 Appl EHEC	
2	61402	34,94
3	61403	
4	61404	
5	pos.Kon. EHEC (347)	28,79
6	neg.Kon.	

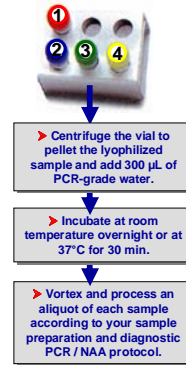


LightCycler PCR protocol:

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



U. Reischl/RMMH#04.2006



INSTAND-D03_I/06



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

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 04.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

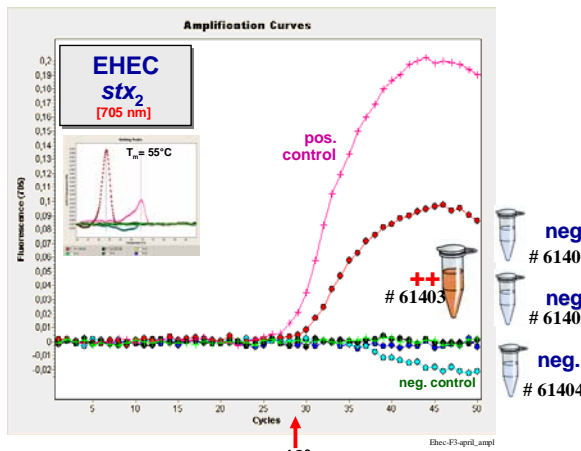
Reischl / Lehn / Wolf

1	61401 Appl EHEC	
2	61402	29,78
3	61403	
4	61404	
5	pos.Kon. EHEC (347)	28,54
6	neg.Kon.	

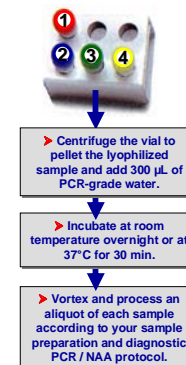


LightCycler PCR protocol:

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



U. Reischl/RMMH#04.2006



INSTAND-D04_I/06



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 04.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

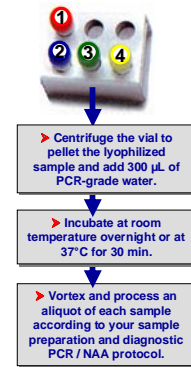
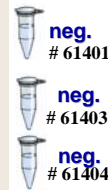
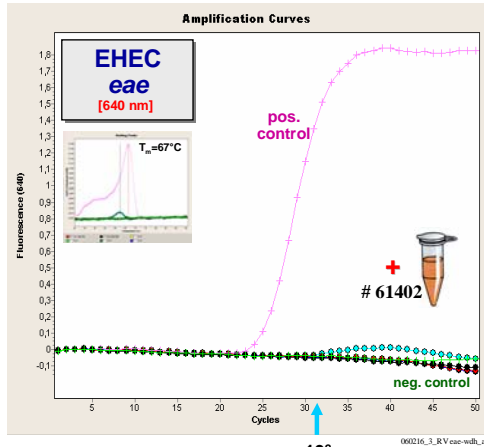
Reischl / Lehn / Wolf

11	61401 eae April	
12	61402	[28,52]
13	61403	
14	61404	
15	pos.Kon. eae	25,05
16	neg.Kon.	



LightCycler PCR protocol:

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



U. Reischl/RMMH#04.2006



INSTAND-D05_I/06



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 04.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

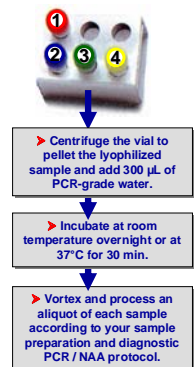
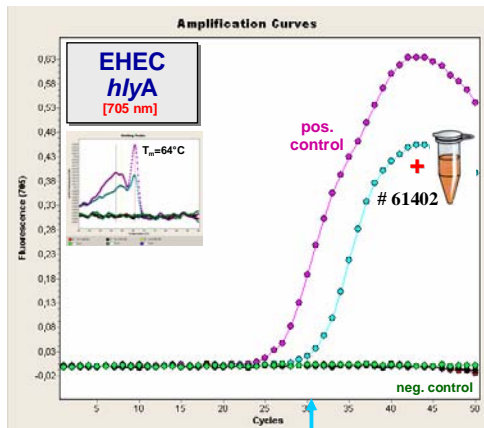
Reischl / Lehn / Wolf

21	61401 April hlyA	
22	61402	31,61
23	61403	
24	61404	
25	pos.Kon. hlyA (347)	26,97
26	neg.Kon.	



LightCycler PCR protocol:

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



U. Reischl/RMMH#04.2006



INSTAND-D06_I/06