



**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", 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", 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"

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

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"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (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 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit relativ hoher Menge an *Bordetella pertussis* (# 1015322, $\sim 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 1015323; $\sim 10^4$ Organismen/mL), eine Probe mit relativ geringer Menge (# 1015324; $\sim 10^3$ Organismen/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1015321), die ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial enthielt.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis* DNA führte auch diesmal wieder zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben. Lediglich von 2 der insgesamt 104 Teilnehmer wurden falsch-positive Ergebnisse für die negative Probe # 1015321 (*E. coli*) mitgeteilt. Hierbei handelt es sich offensichtlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Unter den insgesamt 416 mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich lediglich 2 falsch-negative Ergebnisse für die Probe # 1015322 (mit einer relativ hohen Menge von 10^5 CFU/mL an Zielorganismen), 4 falsch-negative Ergebnisse für die Probe # 1015323 (mit einer 10-fach geringeren Menge an Zielorganismen), und 18 falsch-negative Ergebnisse für die schwach positive Probe # 1015323 (mit ca. 10^3 CFU/mL an Zielorganismen). Von jeweils einem der Teilnehmer wurde das Ergebnis für die Proben # 1015321 und # 1015322 als "fraglich" klassifiziert und von 3 Teilnehmern wurde für Probe # 1015324 ein fragliches Ergebnis berichtet. Inhibitionskontrollen wurden von 101 der insgesamt 104 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden dabei nur von einem Teilnehmer bei 2 Einzelproben des 4-er Sets beobachtet.

Bei einer Menge von 10^3 CFU/mL an *B. pertussis* Zielorganismen (entspricht ca. 10^2 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ l) nähern wir uns offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1015324 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Hain Lifescience GenoQuick *Bordetella* (9x), Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (8x), TibMolbiol LightMix *Bordetella* (6x), Attomol *Bordetella* DNA-LINA (2x), *B. pertussis* Primer/Probe Set von Cepheid (1x), und Minerva Onar Pertussis (1x).

ENGLISCH:

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained a sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1015322 with 10^5 CFU/mL), one with an approximately tenfold lower amount of target organisms (# 1015323 with 10^4 CFU/mL) and one with an approximately hundredfold lower amount of *Bordetella pertussis* target organisms (# 1015324 with 10^3 CFU/mL), as well as one negative sample (# 1015321), containing only non-infected human cells and *Escherichia coli*.

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. However, 18 participants reported false-negative results for the weak-positive *B. pertussis* sample # 1015324 ($\sim 10^3$ CFU/mL), and 4 participants reported a false-negative result for sample # 92202 (containing about 10^4 CFU/mL of *Bordetella parapertussis* target organisms). It seems that we have touched the analytical sensitivity (lower limit of detection) of NAT assays with the weak-positive sample # 1015324. Two participants reported false-positive results for the “negative” sample # 1015321 - this is presumably due to intralaboratory cross-contamination events. All of the remaining results reported by the 104 participants were correct. Run controls were performed by 101 participants and only two inhibition events were observed by one participant with 2 samples of the complete set.

PCR-/NAT *Bordetella pertussis*
(RV 532) April 2010



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

Gruppe A	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1015321	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1015322	+++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12748 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1015323	++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12748 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1015324	(+)	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12748 (~ 1x10 ³ CFU/mL)

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

<i>n = 104</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1015321	1015322	1015323	1015324		1015321	1015322	1015323	1015324
Befund <i>Result</i>									
Positiv	2	102	100	83	n.d.	2	2	2	2
Negativ	101	1	4	18 ¹⁾	nein <i>no</i>	101	101	102	102
Fraglich <i>Questionable</i>	1	1	0	3	ja <i>yes</i>	1	1	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>	%
Roche LightCycler Kit [20] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100
Other commercial tests [27] (n = 30)	84	84 / 88 [§]	95	28	28 / 29 [§]	97
In house PCR assay [28] (n = 68)	185	185/202 [§]	92	68	68 / 68	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 5)	13	13 / 15	87	4	4 / 5	80

[§] Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

Comments: ¹⁾ Eighteen of the 104 participants reported negative results for sample # 1015324. Due to the low number of target organisms we have not rated them as "false-negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.



532 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis*

status 04.2010

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

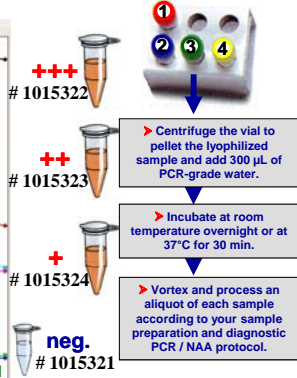
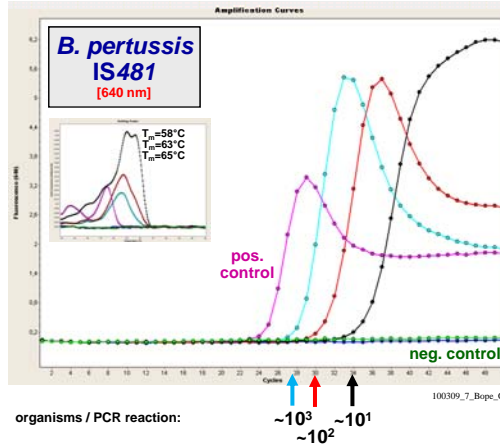
Reischl / Linde / Wolf

- 1 1015321
- 2 1015322 26,62
- 3 1015323 29,72
- 4 1015324 34,13
- 5 Pos. Ko. B. pertussis 22,68
- 6 NTC



LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., K. Kösters, B. Leppmeier, H.-J. Linde, and N. Lehn (2001) Rapid detection and simultaneous differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in clinical specimens by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Reischl, U., Wittwer, C., and Cockerill, F., eds.), ISBN 3-540-41881-4, Springer Press, Heidelberg, pp. 31-44.



INSTAND-B03_I/10



532 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis*

status 04.2010

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

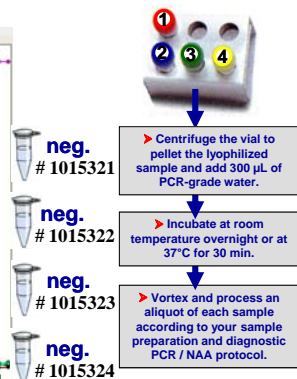
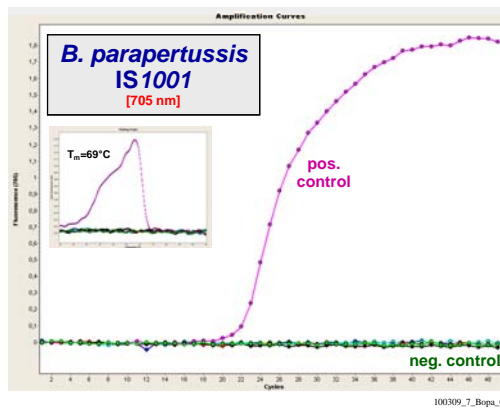
Reischl / Linde / Wolf

- 7 1015321
- 8 1015322
- 9 1015323
- 10 1015324
- 11 Pos. Ko. B. parapertussis 20,59
- 12 NTC



LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., K. Kösters, B. Leppmeier, H.-J. Linde, and N. Lehn (2001) Rapid detection and simultaneous differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in clinical specimens by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Reischl, U., Wittwer, C., and Cockerill, F., eds.), ISBN 3-540-41881-4, Springer Press, Heidelberg, pp. 31-44.



INSTAND-B04_I/10