



Regensburg, den 21. Dezember 2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion (NEW !) of the current results after the corresponding sections in German language. As usual, tables with the results are presented 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 erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Bis auf wenige Ausnahmen waren die bisherigen Kommentare jedoch durchwegs positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. H. Wolf, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

December 22, 2008

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
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. (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.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 (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. 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. **New in 2008:** 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 QC program 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. H. Wolf, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

NOVEMBER 2008:

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: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 82002), EHEC (Proben # 82401, # 82402), MRSA (Probe # 82902), *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila pneumoniae* (Probe # 82412), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 82424). 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.

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 kommerziellen PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" 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 auch bei dem geschätzten Kollegen Herrn Dr. Christoph Schoerner, Erlangen, für seine zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

RV 533: *Helicobacter pylori*

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den beiden positiven Proben # 82301 und # 82303 ($\sim 10^4$ CFU/ml) führte beim Nachweis von *H. pylori* zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich von 2 der insgesamt 31 Teilnehmer wurde ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe # 82303 mitgeteilt. Probe # 82304 enthielt diesmal eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter mustelae* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), dessen DNA mit den NAT-Testsystemen von 25 der insgesamt 31 Teilnehmer offensichtlich keine "spezifischen" Amplifikationsprodukte erzeugte und somit auch korrekt als *H. pylori*-negativ bewertet wurde. Daher lagen die Richtigkeitsquoten der positiven und der negativen Befunde auch diesmal wieder erfreulich hoch. Bis auf 5 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (GenoType Helico DR Kit von HAIN Lifescience (2x) und je und einem Teilnehmer mit "*H. pylori*-Immundiagnostik" und dem Ingenetix ClariRes Assay) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in house* Testsysteme. Bei 30 der 31 Teilnehmer beinhalteten diese Testsysteme auch eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle und bei keiner der untersuchten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionseignisse beobachtet. Wie in der Beschreibung des Ringversuchs 533 vermerkt, konnten die Teilnehmer auf freiwilliger Basis auch die vermeintliche Clarithromycin-Resistenz der untersuchten *H. pylori* Isolate mitteilen. Diese Spezialuntersuchung zur molekularbiologischen Resistenztestung erfolgt in der Regel über die Amplifikation und Sequenzierung von charakteristischen Bereichen innerhalb der *H. pylori* 28S rDNA. Ergebnisse wurden hier von 20 der insgesamt 31 Teilnehmer mitgeteilt und mit Ausnahme von zwei Ergebnissen für die Probe # 82303 waren diese auch durchwegs korrekt (Zielwerte siehe Tabelle 1).

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained two samples with a relatively high amount of target organisms. Sample # 82301 contained approximately 10^4 CFU/ml of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain and sample # 82303 contained approximately 10^4 CFU/ml of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strain isolated from a patient. All of the 31 participants reported positive results for sample # 82301 and sample # 82303 tested positive in the specific PCR assays of 29 from the 31 participants. One sample contained a culture suspension of the related species *Helicobacter mustelae* (# 82304; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), which was reported "negative" by 25 of the 29 participants. This indicates a satisfactorily high level of assay specificity in the majority of the participating laboratories. As mentioned in the Report form, participants who are performing molecular tests for Clarithromycin resistance may indicate the corresponding results by accessory code numbers 71 or 72. Molecular resistance testing results were reported by 20 participants and, with the exception of two result, they were all correct.

PCR-/NAT *Helicobacter pylori* (RV 533) November 2008



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
82301	++	61/72	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 28S rDNA sequence)
82302	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
82303	++	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GAG mutation in 28S rDNA)
82304	∅	62	<i>Helicobacter mustelae</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)

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

n = 31	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	82301	82302	82303	82304		82301	82302	82303	82304
Befund <i>Result</i>									
Positiv	31 ¹⁾	0	29 ¹⁾	6	n.d.	1	1	1	1
Negativ	0	31	2	25	nein <i>no</i>	30	30	30	30
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>	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 22)	43	43 / 44	98	40	40 / 44	91
Commercial assay [27] (n = 5)	9	9 / 10	90	8	8 / 10	80
Ingenetix ClariRes [25] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	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⁾ Twenty of the 31 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing. With the exception of 2 results (Ingenetix ClariRes and *in house* PCR assay), the reported results were correct.



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

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



533 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori* status 11.2008

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

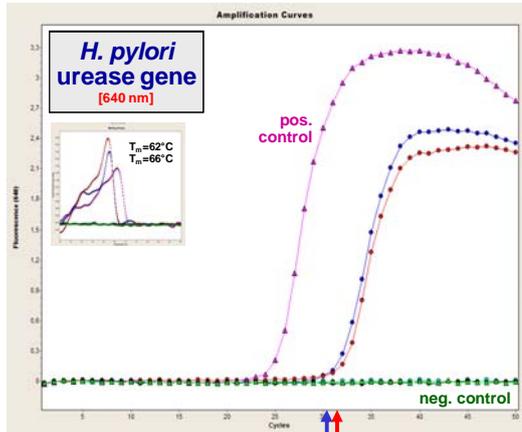
Reischl / Linde / Wolf

- 7 82301 30,27
- 8 82302
- 9 82303 30,68
- 10 82304
- 11 Pos.Contr.H.pylori 23,63
- 12 NTC

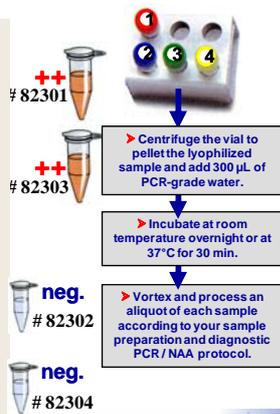


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., B. Leppmeier, M. Heep, D. Beck, and N. Lehn (2001) Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Meurer, S., Wittwer, C., and Nakagawa, K.-I., eds.), ISBN 3-540-66736-9, Springer Press, Heidelberg, pp. 323-330.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^2$



INSTAND-C03_II/08



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

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



533 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori* status 11.2008

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

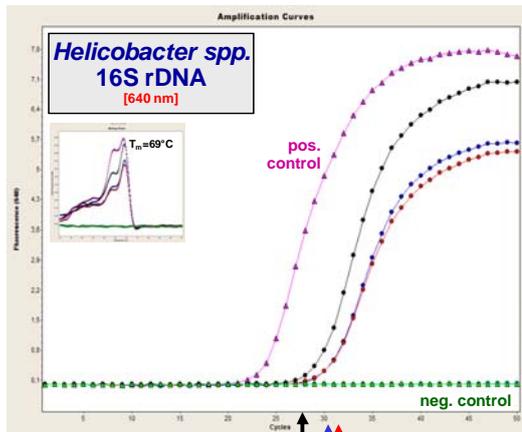
Reischl / Linde / Wolf

- 1 82301 29,54
- 2 82302
- 3 82303 29,53
- 4 82304 28,36
- 5 Pos.Contr.H.spp 22,66
- 6 NTC

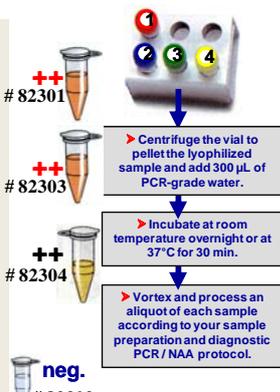


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., B. Leppmeier, M. Heep, D. Beck, and N. Lehn (2001) Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Meurer, S., Wittwer, C., and Nakagawa, K.-I., eds.), ISBN 3-540-66736-9, Springer Press, Heidelberg, pp. 323-330.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^3$ $\sim 10^2$



INSTAND-C04_II/08



533 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori* status 11.2008

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

Reischl / Linde / Wolf

***H. pylori*
Clari-Resistance
28S rDNA**

1	82301	27,61
2	82302	
3	82303	28,03
4	82304	
5	AA	19,72
6	CA	19,10
7	GA	15,46
8	AG	19,54
9	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.

