



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 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 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 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.

Die drei positiven Proben des aktuellen Probensets # 82401 (*E. coli*, klinisches Isolat, nur *stx*₁-positiv), # 82402 (*E. coli*, klinisches Isolat, *stx*₁-positiv, *stx*₂-positiv, *eae*-positiv und *hlyA*-positiv), sowie # 82403 (*E. coli*, klinisches Isolat, *stx*₁-positiv, *stx*₂-positiv, *eae*-negativ und *hlyA*-positiv) waren diesmal mit ca. 1×10^3 , 1×10^3 bzw. 1×10^5 CFU/ml der entsprechenden Zielorganismen versetzt. Die EHEC-negative Probe # 82404 enthielt diesmal ein *eae*- und *hlyA*-negatives *E. coli* K12 Isolat.

Offensichtlich stellte der gezielte Nachweis des in einer Menge von ca. 1×10^3 CFU/ml in Probe # 82401 anwesenden und isoliert *stx*₁-positiven EHEC hier dennoch eine gewisse Herausforderung an die analytische Sensitivität der individuellen NAT-gestützten Testsysteme dar. Im Gegensatz zur Probe # 82402, bei der von 64 Teilnehmern richtig positive Ergebnisse mitgeteilt werden konnten, wurde die Probe # 82401 lediglich von 57 der insgesamt 67 Teilnehmer als positiv befundet. 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. Werden in bestimmten Laboratorien solche Nachweisverfahren jedoch auch zum gezielten Direktnachweis von EHEC in klinischem Untersuchungsmaterial oder in Lebensmittelproben eingesetzt, so sollten falsch-negative Ergebnisse bei der Probe # 82401 Anlaß zur Überprüfung und Optimierung des jeweiligen Testsystems geben.

Das isoliert falsch-positive Ergebnis bei Probe # 82404 ist wohl am ehesten mit laborinternen Kontaminationsereignissen vereinbar. Abgesehen von den insgesamt erfreulich wenigen falsch-positiven oder -negativen Ergebnissen wurden bei den übrigen Proben hohe Richtigkeitsquoten erzielt. Die Mehrzahl der Teilnehmer verwendete dabei selbstentwickelte 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 17 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. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Hain Lifescience GenoType EHEC Kit (9x).

Zudem wurden von 62 der insgesamt 67 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 53 Teilnehmern, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, korrekt.

RV 534: EHEC / STEC

The current set of QC samples contained three samples which were positive for EHEC: # 82401 (1×10^3 CFU/ml of *E. coli*, clinical isolate, only *stx*₁-positive), # 82402 (1×10^3 CFU/ml of *E. coli*, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive), and # 82403 (1×10^5 CFU/ml of *E. coli*, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-negative and *hlyA*-positive).

The remaining sample # 82404 contained an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain. Only the NAT-based detection of EHEC from the weak positive sample # 82401 (1×10^3 CFU/ml of an only *stx*₁-positive EHEC strain) seemed to be a challenge - and 10 of the 67 participating laboratories reported false-negative results for this particular sample. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 62 laboratories. With the exception of 16 results, the reported results were correct.

PCR-/NAT EHEC / STEC (RV 534) November 2008



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

Gruppe A	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
82401	(+)	61 / 71	EHEC (~1x10 ³ CFU/mL) (<i>stx-1</i>)
82402	(+)	61 / 71,72,77,78	EHEC (~1x10 ³ CFU/mL) (<i>stx-1, stx-2, hlyA, eae</i>)
82403	++	61 / 71, 72, 78	EHEC (~1x10 ⁵ CFU/mL) (<i>stx-1, stx-2, hlyA</i>)
82404	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.

<i>n = 67</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	82401	82402	82403	82404		82401	82402	82403	82404
Befund Result									
Positiv	57 ¹⁾	64 ¹⁾	67 ¹⁾	1	n.d.	4	4	4	4
Negativ	10	2	0	66	nein no	63	63	63	63
Fraglich Questionable	0	1	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 = 46)	129	129 / 138	93	45	45 / 46	98
Other commercial tests [27] (n = 17)	49	49 / 51	96	17	17 / 17	100
Andere/ k.A. / other [29] (n = 4)	10	10 / 11 [§]	91	4	4 / 4	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.

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

Comments:¹⁾ Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 62 laboratories. With the exception of 16 results, the reported results were correct.



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 11.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

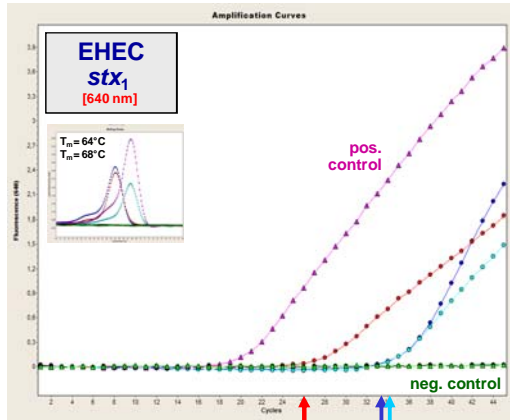
Reischl / Linde / Wolf

1	82401	35.31
2	82402	33.97
3	82403	27.06
4	82404	
5	pos. Ko. EHEC	19.72
6	NTC	

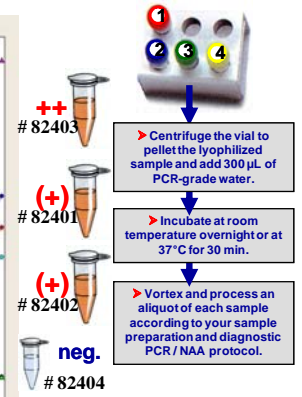


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Yousef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhine (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: $\sim 10^3$ $\sim 10^1$ 080513_6_EHEC040_G



IN STAND-D03_II/08



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 11.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

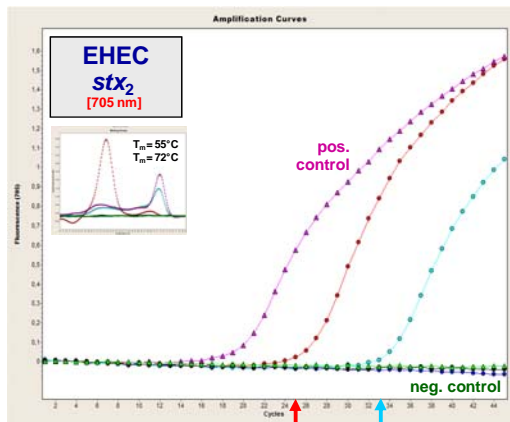
Reischl / Linde / Wolf

1	82401	
2	82402	33.03
3	82403	25.49
4	82404	
5	pos. Ko. EHEC	18.95
6	NTC	

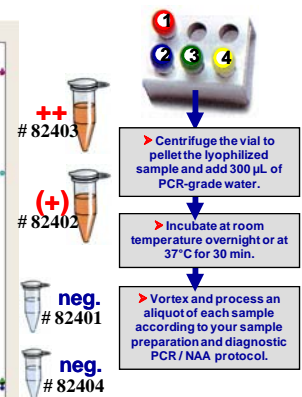


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Yousef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhine (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: $\sim 10^3$ $\sim 10^1$ 080513_6_EHEC705_G



IN STAND-D04_II/08



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 11.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

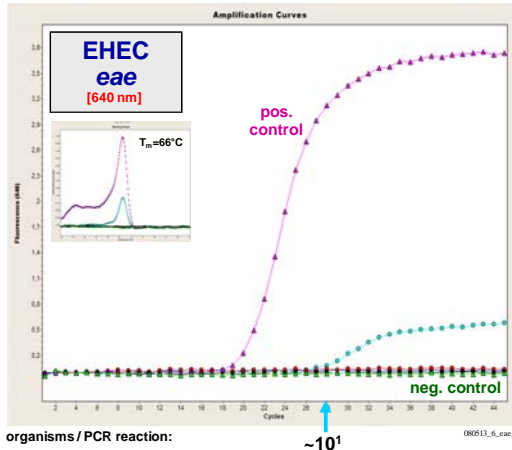
Reischl / Linde / Wolf

- 7 82401
- 8 82402 26,17
- 9 82403
- 10 82404
- 11 pos. Ko. eae 19,01
- 12 NTC



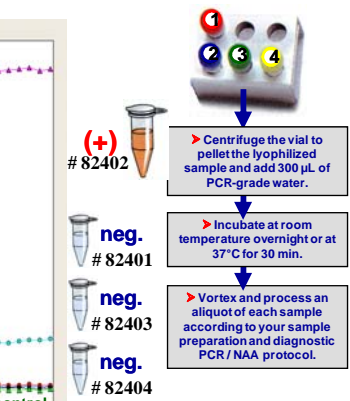
LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Yousef, 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.



organisms / PCR reaction:

$\sim 10^1$



INSTAND-D05_II/08



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 11.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

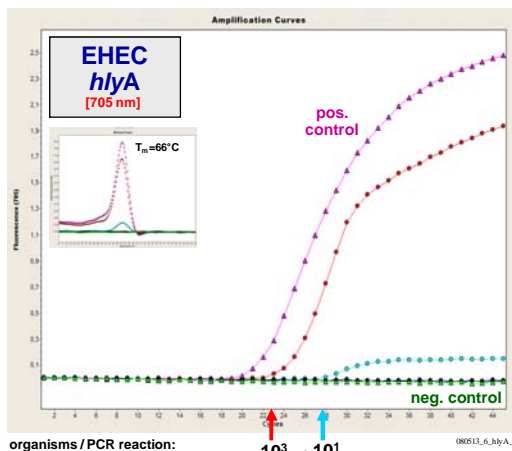
Reischl / Linde / Wolf

- 13 82401
- 14 82402 25,89
- 15 82403 23,67
- 16 82404
- 17 pos. Ko. hlyA 20,70
- 18 NTC



LightCycler PCR protocol:

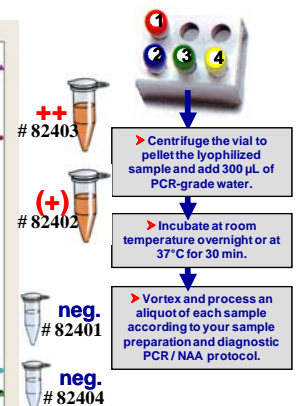
Reischl, U., M.T. Yousef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhne (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction:

$\sim 10^3$

$\sim 10^1$



INSTAND-D06_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>



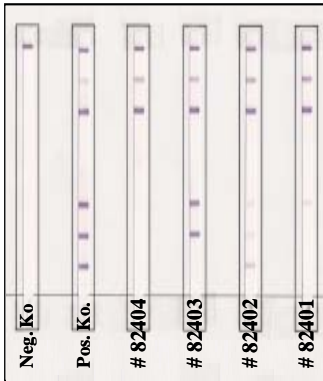
534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 11.2008

➤ **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*

BEC HAIN



- 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-D07_II/08