



Regensburg, den 11. Dezember 2009

**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 in English on the following pages 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 beigegeführten 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, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

December 11, 2009

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. (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 in 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. H. Wolf, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Eine kurze Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir werden im Laufe des Jahres je einen sog. **Proberingversuch** für den Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis* anbieten. Als Sollwertlabor wird hier das Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart fungieren. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen. Sollten Sie Interesse an der Teilnahme an diesem "Proberingversuch" mit limitierter Anzahl von entsprechenden Probensets haben, so bitten wir Sie um kurze Mitteilung an den Ringversuchsleiter (udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de).

NOVEMBER 2009:

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 # 92001, 92004, sowie die drei schwach positiven Proben des RV 531), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 92003), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 92504), *Salmonella enterica* (Probe # 92701), sowie cMRSA (Probe # 92903). 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 prozentuaalem 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 zwei Proben mit einer sehr hohen und einer etwa 100-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 92202 mit 10^7 CFU/mL und # 92201 mit 10^5 CFU/mL an *B. pertussis*), eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella parapertussis* als verwandte Spezies (# 92203) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 92204).

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis* DNA führte diesmal sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben zu durchwegs sehr hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich die Spezifität der eingesetzten Testsysteme erwies sich im Fall der Probe # 92203 (*B. parapertussis*) bei 11 der insgesamt 84 Teilnehmer als unzureichend. Diese 11 falsch-positiven Ergebnisse lassen auf die Verwendung einer Zielsequenz schließen, die nicht hinreichend zwischen *B. pertussis* und *B. parapertussis* differenziert. In diesem Zusammenhang wurde von einem der Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei Probe # 92203 die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 3 Teilnehmern die Verwendung des Pertussis-Toxin Gens und von 2 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben. Von 4 der 11 Teilnehmer, die die Verwendung des Hain GenoQuick *Bordetella* Testsystems angegeben haben und von einem Teilnehmer mit dem Minerva Onar pertussis Testsystem wurde die nachgewiesene *Bordetella*-Spezies im Ergebnisformular nicht näher spezifiziert. Bei zwei der insgesamt 11 Teilnehmer wurde auf dem Ergebnisformular die Verwendung eines nicht näher angegebenen kommerziellen Testsystems aufgeführt oder keine Zielsequenz spezifiziert. Von einem der insgesamt 84 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 92204 (*E. coli*) mitgeteilt. Hierbei handelt es sich offensichtlich um ein laborinternes Kontaminationsereignis oder um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung. Unter den insgesamt 336 mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich zudem 8 falsch-negative Ergebnisse für die schwächer positive Probe # 92201 ($\sim 10^5$ CFU/mL an *B. pertussis*), ein falsch-negatives Ergebnis für die stärker positive Probe # 92202 ($\sim 10^7$ CFU/mL an *B. pertussis*) sowie 2 als "fraglich" klassifizierte Ergebnisse für die stärker positive Probe # 92202 und die negative Probe # 92204.

Inhibitionskontrollen wurden von 83 der insgesamt 84 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden dabei lediglich von einem Teilnehmer bei einer Probe des gesamten Probensatzes beobachtet. 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* (4x), TibMolbiol LightMix *Bordetella* (1x), Minerva Onar Pertussis (1x), Attomol *Bordetella* DNA-LINA (1x), *B. pertussis* Primer/Probe Set von Cepheid (2x), Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (6x), LCD Array Kit, und BDPD-LC Real time PCR Kit (1x).

Brief discussion of the current EQAS results in English:

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained a samples with a relatively high amount and one approximately hundred lower amount of target organisms (# 92202 with 10^7 CFU/mL and # 92201 with 10^5 CFU/mL of *Bordetella pertussis*), one sample with a clinical isolate of the closely related species *Bordetella parapertussis* (# 92203) as well as one negative sample (# 92204), 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, 9 participants reported false-negative results for the *B. pertussis* positive samples # 92201 and # 92202, one participant reported a false-negative result for sample # 92202, eleven participants reported false-positive results for the *Bordetella parapertussis* sample and one participant reported a false-positive result for the "negative" sample # 92204 (presumably a intralaboratory cross-contamination event). All of the remaining results reported by the 84 participants were correct. Run controls were performed by 83 participants and only one inhibition event was observed by one participant with one of the 4 samples within the complete set.

**PCR-/NAT *Bordetella pertussis*
 (RV 532) November 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
92201	++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12742 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
92202	+++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12742 (~ 1x10 ⁷ CFU/mL)
92203	∅	62	<i>Bordetella parapertussis</i> (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
92204	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 84	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	92201	92202	92203	92204	92201	92202	92203	92204	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	76	82	11 ¹⁾	1	n.d.	1	1	1	1
Negativ	8	1	73	82	nein <i>no</i>	83	83	83	82
Fraglich <i>Questionable</i>	0	1	0	1	ja <i>yes</i>	0	0	0	1

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>	%
Other commercial tests [27] (n = 20)	38	38 / 40	95	35	35 / 40	88
In house PCR assay [28] (n = 62)	117	117/123 [§]	95	117	117 / 123 [§]	95
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	3	3 / 4	75	3	3 / 4	75

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

Comments: ¹⁾ Detailed analysis of the 11 false positive results: 2 of them indicated the use of pertussis toxin gene (Code 54), all 4 labs using the Hain test reported false positive results for the B. parapertussis sample, the lab using a LCD Array Kit reported a false-positive result for the B. parapertussis sample, one lab wrote: "our assay also detects B. parapertussis", one lab wrote: "no differentiation between pertussis and parapertussis possible with our assay", and the remaining two participants made no comments in the report form.



532 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis* status 11.2009

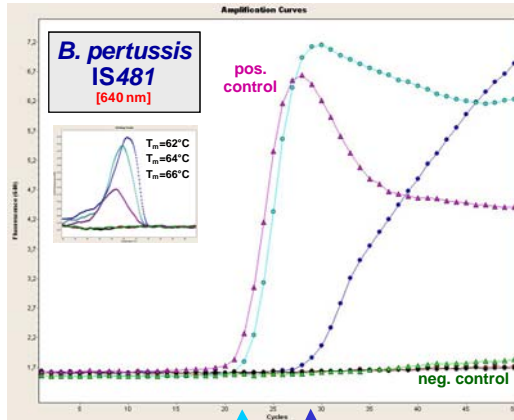
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

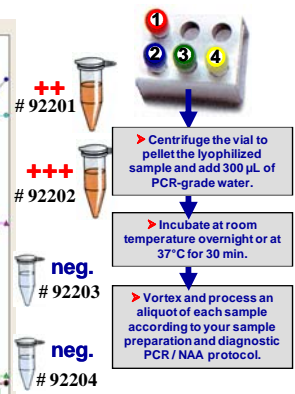
- 1 92201 27,50
- 2 92202 21,73
- 3 92203
- 4 92204
- 5 Pos. Ko. *B. pertussis* 20,79
- 6 NTC



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.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^5$ $\sim 10^3$



INSTAND-B03_II/09



532 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis* status 11.2009

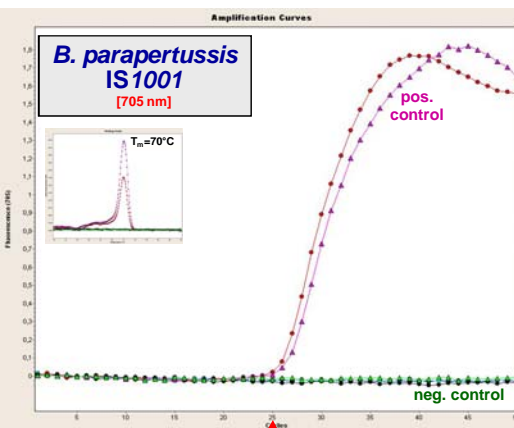
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

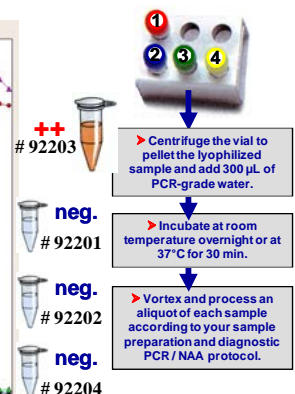
- 1 92201 24,74
- 2 92202
- 3 92203
- 4 92204
- 5 pos. Ko. *B. parapertussis* 25,24
- 6 NTC



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.



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



INSTAND-B04_II/09