



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](http://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](http://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](mailto: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](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. ([www.instandev.de](http://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 533: *Helicobacter pylori***

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den beiden hochpositiven Proben # 92302 ( $\sim 10^7$  CFU/ml an *H. pylori*) und # 92304 ( $\sim 10^6$  CFU/ml) führte beim Nachweis von *H. pylori* DNA zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich von 5 der insgesamt 26 Teilnehmer wurden falsch-negative Ergebnisse für die positiven Proben # 92302 und # 92304 mitgeteilt. Probe # 92301 enthielt diesmal eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter salomonis* ( $\sim 1 \times 10^6$  CFU/ml), dessen DNA mit den NAT-Testsystemen von 21 der insgesamt 26 Teilnehmer offensichtlich keine "spezifischen" Amplifikationsprodukte erzeugte und somit auch korrekt als *H. pylori*-negativ bewertet wurde. Von einem Teilnehmer wurde für diese Probe ein als "fraglich" klassifiziertes Ergebnis mitgeteilt. Daher lagen die Richtigkeitsquoten der positiven und der negativen Befunde auch diesmal wieder erfreulich hoch. Bis auf 8 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (u.a. 4 x GenoType Helico Kit von Hain Lifescience) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in house* Testsysteme. Bei 25 der 26 Teilnehmer beinhalteten diese Testsysteme auch eine Inhibitionskontrolle, und lediglich von einem Teilnehmer wurden bei einer Probe des gesamten Probensatzes Inhibitionsereignisse 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* 23S rDNA bzw. der Sequenzanalyse dieses Genombereichs mittels Hybridisierungssonden. Ergebnisse wurden hier von 20 der insgesamt 26 Teilnehmer mitgeteilt, und diese waren durchwegs korrekt (Zielwerte siehe Tabelle 1).

### **Brief discussion of the current EQAS results in English:**

### **RV 533: *Helicobacter pylori***

The current set of QC samples contained two samples with a relatively high amount of target organisms. Sample # 92302 contained approximately  $10^7$  CFU/ml of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolated from a patient in the course of a antibiotic therapy failure study and sample # 92304 contained approximately  $10^6$  CFU/ml of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain. Twenty three of the 26 participants reported positive results for sample # 92302 and sample # 92304 tested positive in the specific PCR assays of 24 from the 26 participants. One sample contained a culture suspension of the related species *Helicobacter salomonis* (# 92301;  $\sim 1 \times 10^6$  CFU/ml), which was reported "negative" by 20 of the 26 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 – they were all correct.

**PCR-/NAT *Helicobacter pylori***  
**(RV 533) November 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
92301	∅	62	<i>Helicobacter salomonis</i> (~ 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
92302	+++	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 <sup>7</sup> CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA mutation in 28S rDNA)
92303	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
92304	++	61/72	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 28S rDNA sequence)

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

n = 26	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	92301	92302	92303	92304	92301	92302	92303	92304	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	5	23 <sup>1)</sup>	2	24 <sup>1)</sup>	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	20	3	24	2	nein <i>no</i>	24	25	25	25
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	1	0	0	0	ja <i>yes</i>	1	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>	%
Commercial assay [27] (n = 8)	13	13 / 16	81	12	12 / 16	75
In house PCR assay [28] (n = 16)	30	30 / 32	94	28	28 / 31 <sup>§</sup>	90
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	4	4 / 4	100	4	4 / 4	100

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

**Comments:** <sup>1)</sup> Twenty of the 26 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing. All 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.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>



## 533 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 11.2009

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

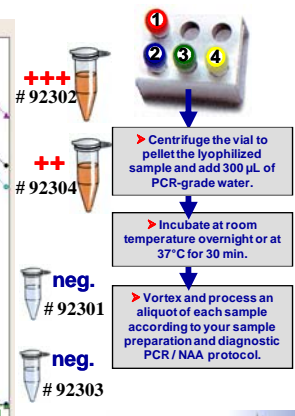
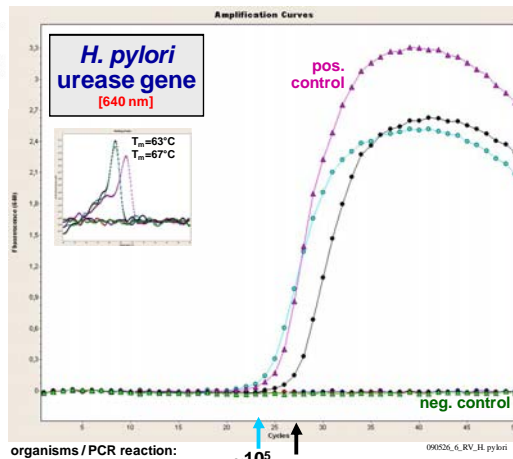
Reischl / Linde / Wolf

7	92301	23,07
8	92302	
9	92303	
10	92304	25,96
11	Pos. Ko. H. pylori	23,87
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.



INSTAND-C03\_II/09



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

INSTAND e. V.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>



## 533 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 11.2009

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

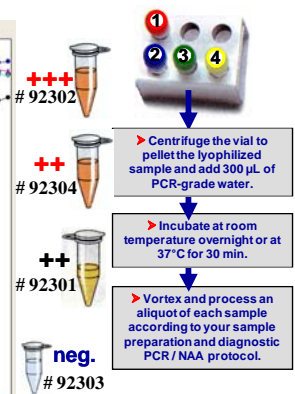
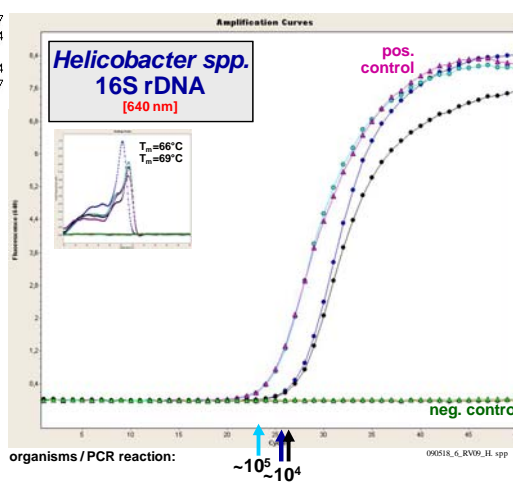
Reischl / Linde / Wolf

1	92301	26,47
2	92302	23,64
3	92303	
4	92304	26,44
5	Pos. Ko. Helico. spp	23,37
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.



INSTAND-C04\_II/09



**533 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*** status 11.2009

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

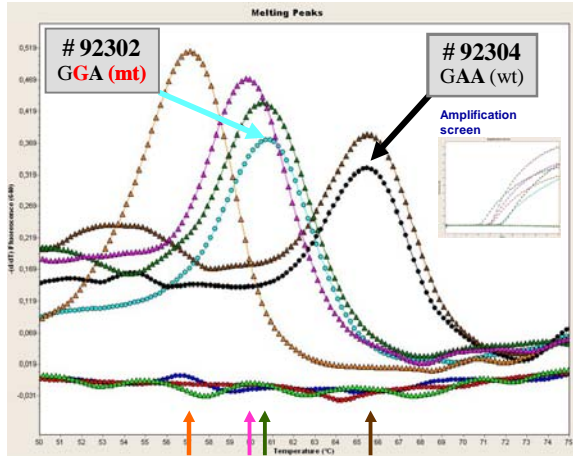
Reischl / Linde / Wolf

***H. pylori*  
Clari-Resistance  
23S rDNA**

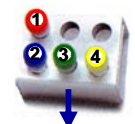
1	92301	
2	92302	23,36
3	92303	
4	92304	24,77
5	AA	19,16
6	CA	19,32
7	GA	14,99
8	AG	19,12
9	NTC	



LightCycler PCR protocol:  
 unpublished *in house* protocol.



IN STAND-C05\_II/09



- 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.

