



An die Teilnehmer  
des INSTAND-Ringversuchs  
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT  
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438)

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a cover letter in English on page 9 of this document.*

**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 auf folgende Veröffentlichungen in den Zeitschriften "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.) und "Hygiene und Mikrobiologie" (Herausgeber: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., DGHM) 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) "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT": Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Hyg. Mikrobiol.* **8**:19-21.

Bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir nach wie vor für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer.

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

**Dr. Udo Reischl**

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis  
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

**Prof. Dr. Hans Wolf**

**Prof. Dr. Norbert Lehn**

**Prof. Dr. Eberhard Straube**

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

### APRIL 2004:

Nachdem in der vorhergegangenen Runde (November 2003) dieser neuen Ringversuchs-Serie einige Proben mit relativ geringer Keimzahl versandt wurden, wollten wir bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) den Versand von Proben mit relativ niedriger Keimzahl vermeiden. Es sei aber an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß noch zahlreiche Rückstell-Probensätze des letzten Ringversuchs verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets enthalten unter anderem als "grenzwertig positiv" zu bezeichnende Proben für *B. pertussis* (Probe # 32202), *H. pylori* (Probe # 32302), *B. burgdorferi* (Probe # 32503), *L. pneumophila* (Probe # 32601) und für *Salmonella enteritidis* (Probe # 32702) und können im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung beispielsweise als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

Bei den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen jedoch wieder deutlich über der "durchschnittlichen Nachweisgrenze" eingestellt, die wie folgt definiert wird: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gut evaluierte Primersequenzen). Falsch-negative Ergebnisse stellen in der aktuellen Ringversuchsrunde damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar. Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen 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. 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. Eine weitergehende Aufschlüsselung nach den einzelnen Kategorien der DNA-Extraktion, Amplifikation, Detektion sowie den jeweils verwendeten Zielsequenzen erschien bei diesem Ringversuch aufgrund der relativ hohen Richtigkeitsquote unter den positiven Proben wenig sinnvoll. Die individuellen Angaben der einzelnen Teilnehmer zur Testdurchführung werden jedoch systematisch erfasst und bleiben für retrospektive Analysen verfügbar. Erwartungsgemäß waren auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs 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 anonymisierten Ergebnisse der einzelnen Sollwertlaboratorien oder die Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR) auch unter folgender Internetadresse:  
"www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)"  
als *pdf*-Files zum freien download bereit.

### **RV 432: *Bordetella pertussis***

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt je eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 41201), mit geringerer Menge (# 41204), ohne Zielorganismen (# 41203), sowie eine Probe mit relativ hoher Menge an einer mit dem Zielorganismus eng verwandten Spezies (# 41021). Die Verfügbarkeit von gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *B. pertussis* DNA führte auch diesmal zu hohen Richtigkeitsquoten bei der relativ stark positiven und bei der negativen Probe. Die etwas geringere Menge an *B. pertussis* in der Probe # 41204 konnte zudem von 52 der insgesamt 53 Teilnehmer mit den individuell etablierten PCR-Testsystemen eindeutig nachgewiesen werden. Nur ein Teilnehmer berichtete hier ein falsch-negatives Ergebnis.

Auffällig beim aktuellen Ringversuch waren 4 falsch-positive Ergebnisse für die Probe # 41201, die diesmal nennenswerte Mengen an *Bordetella parapertussis* enthielt. Mit der Verwendung von IS481 als "*B. pertussis*-spezifische" Zielsequenz ist diese Kreuzreaktion jedoch nicht zu erklären und es dürfte sich hier vorwiegend um (vermeidbare) laborinterne Kontaminationsereignisse bei der Abarbeitung der relativ stark positiven Ringversuchsproben gehandelt haben. Inhibitionskontrollen wurden von 50 der insgesamt 53 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet. Unter den insgesamt 212 NAT-Ergebnissen wurden lediglich 1 falsch-negatives und 9 falsch-positive Ergebnisse mitgeteilt. Wie auch beim vorhergehenden Ringversuch verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. Aufgrund der derzeit noch sehr geringen Verbreitung von kommerziellen bzw. konfektionierten Testkits für den Nachweis von *B. pertussis* DNA können im Rahmen dieses Ringversuchs keine seriösen Vergleiche zwischen den einzelnen Testsystemen geführt werden.

## PCR-/NAT *Bordetella pertussis* (RV 432) April 2004



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
41201	∅	62	<i>Bordetella parapertussis</i> ATCC15237 (~ 5x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
41202	+++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12742 (~ 5x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
41203	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
41204	++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12742 (~ 5x10 <sup>5</sup> CFU/mL)

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

n = 53	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	41201	41202	41203	41204		41201	41202	41203	41204
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	4	53	5	52	n.d.	3	3	3	3
<b>Negativ</b>	48	0	48	1	nein <i>no</i>	50	50	50	50
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	1	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwenden 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 = 47)	93	93 / 94	99	86	86 / 94	91 <sup>1)</sup>
<i>ampIWell</i> Pertussis [21] (n = 4)	8	8 / 8	100	6	6 / 7	86 <sup>1)</sup>
Other commercial tests [27] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
Andere / other [29] (n = 2)	4	4 / 4	100	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.*

**Comments:** <sup>1)</sup> Four of the 53 participants reported false-positive results for sample # 41201 (*B. parapertussis*) and 5 participants reported false-positive results for sample # 41203 (*E. coli*). Since 6 of these participants have used *B. pertussis* insertion sequence IS481 and 2 the pertussis toxin gene as target for their PCR assays, most of the false-positive results are probably due to cross-contamination events during DNA extraction and/or master mix preparation.

To the participants of the  
INSTAND-Proficiency Test in  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 430 to 438)

**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.instand-ev.de](http://www.instand-ev.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 around \$ 150 per set of 4 samples, 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 of proficiency testing. But 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 on this proficiency test panel "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.

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).

Yours sincerely,



Udo Reischl



# 432 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis*

status 04.2004

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

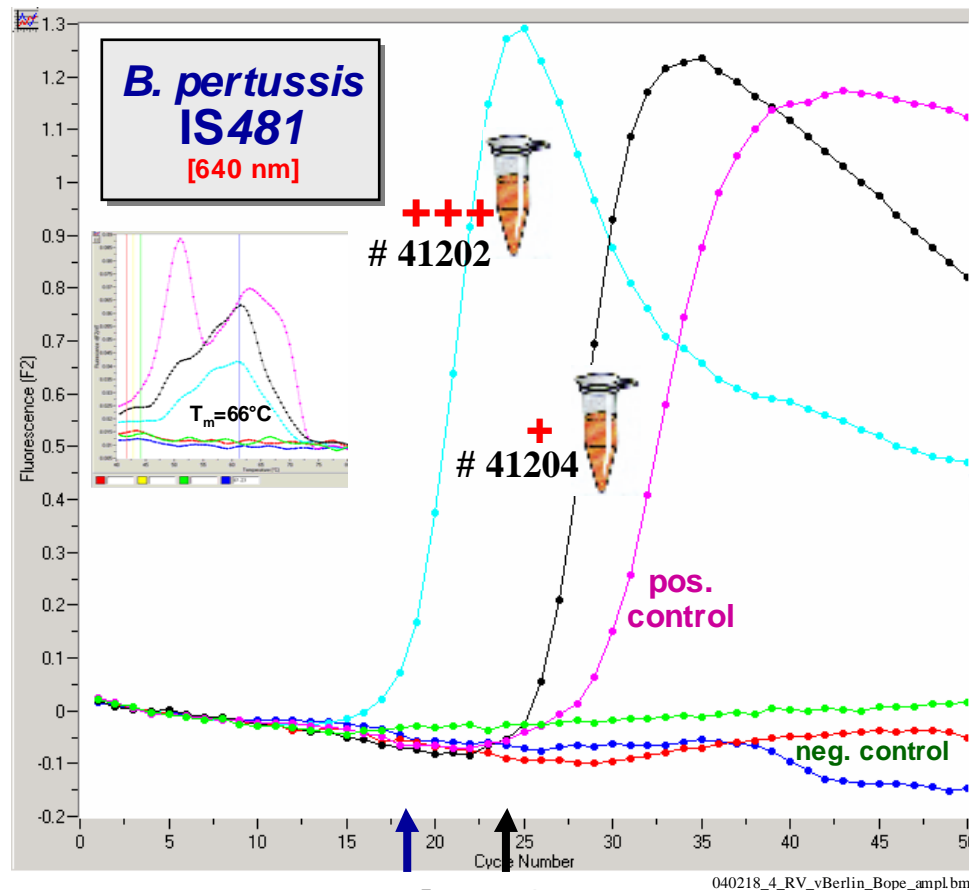
Reischl / Lehn / Wolf

1	Bope 41201	
2	Bope 41202	16.46
3	Bope 41203	
4	Bope 41204	24.89
5	poKo Bope/Bopa	27.90
6	negKo	

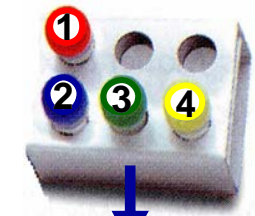


### LightCycler PCR protocol:

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:  $\sim 10^5$   $\sim 10^4$



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300  $\mu\text{L}$  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.

neg. # 41201  
 neg. # 41203

U. Reischl/RIMM/02.2004





# 432 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis* status 04.2004

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

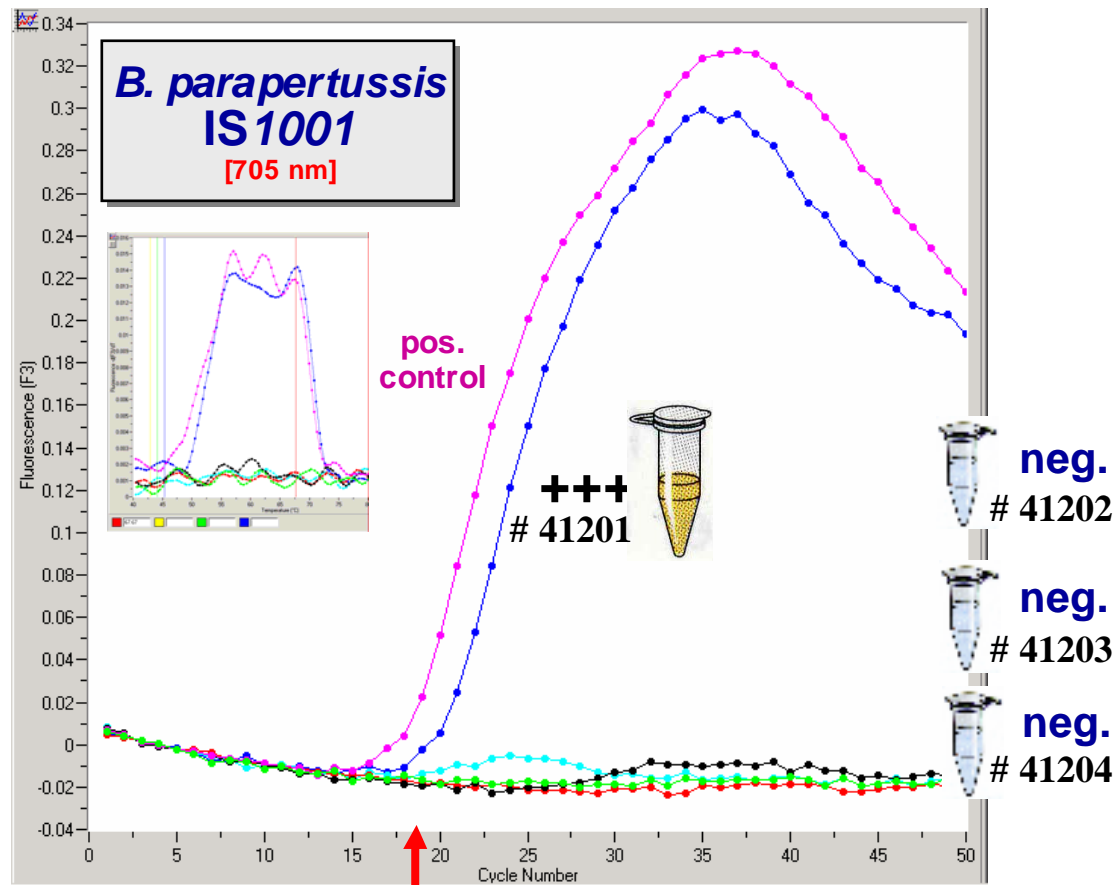
Reischl / Lehn / Wolf

1	Bope 41201	19.68
2	Bope 41202	
3	Bope 41203	
4	Bope 41204	
5	poKo Bope/Bopa	17.88
6	negKo	



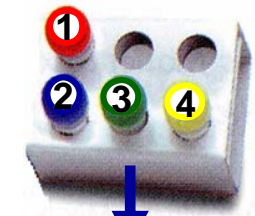
### LightCycler PCR protocol:

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:  $\sim 10^5$

040218\_4\_RV\_vBerlin\_Bope\_amp1\_F3.bmp



➤ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300  $\mu$ L 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.

U. Reischl/RIMM/02.2004

