



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 prozentualen 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 433: *Helicobacter pylori*

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysensysteme und die relativ große Menge an Zielorganismen in der positiven Probe # 41303 führte beim Nachweis von *H. pylori* zu relativ hohen Richtigkeitsquoten für die Proben # 41303 und # 41304. Probe # 41302 enthielt diesmal eine hohe Menge von Bakterienzellen der Spezies *Helicobacter acinonyx*, deren DNA mit den PCR-Testsystemen von 11 der insgesamt 14 Teilnehmer offensichtlich ein "spezifisches" Amplifikationsprodukt erzeugte, aber nur von 3 Teilnehmern als "Nicht-*H. pylori*" klassifiziert wurde. Die Richtigkeitsquote der negativen Befunde wurde durch diese 11 falsch-positiven Ergebnisse für Probe # 41302 sehr stark gedrückt. Sechs der 11 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 41302 gaben hier die Verwendung eines ribosomalen Gens (16S rDNA, 23S rDNA oder ITS) als Zielsequenz für Ihre *H. pylori*-spezifischen PCR-Testsysteme an. Offensichtlich weisen diese Testkonzepte gewisse Mängel hinsichtlich ihrer Spezies-Spezifität auf. Interessanterweise wurden auch bei 4 der 11 Teilnehmer, die *H. pylori*-spezifische Teile des Urease-Gens als Zielsequenz gewählt haben, falsch-positive Ergebnisse für die Probe # 41302 bzw. eine Kreuzreaktion mit *H. acinonyx* DNA beobachtet. Eine eventuelle Kontamination des ausgesandten Probenmaterials mit *H. pylori* DNA kann in diesem Zusammenhang aufgrund unseres speziellen Produktionsprozesses und entsprechend durchgeführter Prozeßkontrollen jedoch weitgehend ausgeschlossen werden.

Alle Teilnehmer verwendeten zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen und bei keiner der untersuchten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Wie in der Beschreibung des Ringversuchs 433 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. Korrekte Ergebnisse wurden hier bei 7 von 7 Teilnehmern mitgeteilt.

PCR-/NAT *Helicobacter pylori*
(RV 433) April 2004



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
41301	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
41302	∅	62	<i>Helicobacter acinonyx</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
41303	++	61 / 72	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 28S rDNA seq.)
41304	+	61 / 71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 5x10 ⁵ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GAG mutation in 28S rDNA)

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

n = 14	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	41301	41302	41303	41304		41301	41302	41303	41304
Befund <i>Result</i>									
Positiv	1	11 ¹⁾	13 ²⁾	12 ²⁾	n.d.	1	1	0	1
Negativ	13	3	1	2	nein <i>no</i>	13	13	13	13
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 = 14)	25	25 / 28	90	16	16 / 28	58 ¹⁾
Andere / other [29] (n = 0)	-	-	-	-	-	-

* 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⁾ Eleven false-positive results were observed for sample # 41302 (*H. acinonyx*) and one for sample # 41301; These participants have either used a ribosomal gene (6 x) or sections within the urease gene (4 x) as target sequence for their "*H. pylori*-specific" PCR assays.

²⁾ Seven of 14 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing; all reported results were correct (# 41303: code 72, # 41304: code 71).

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", 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", 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



433 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 04.2004

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

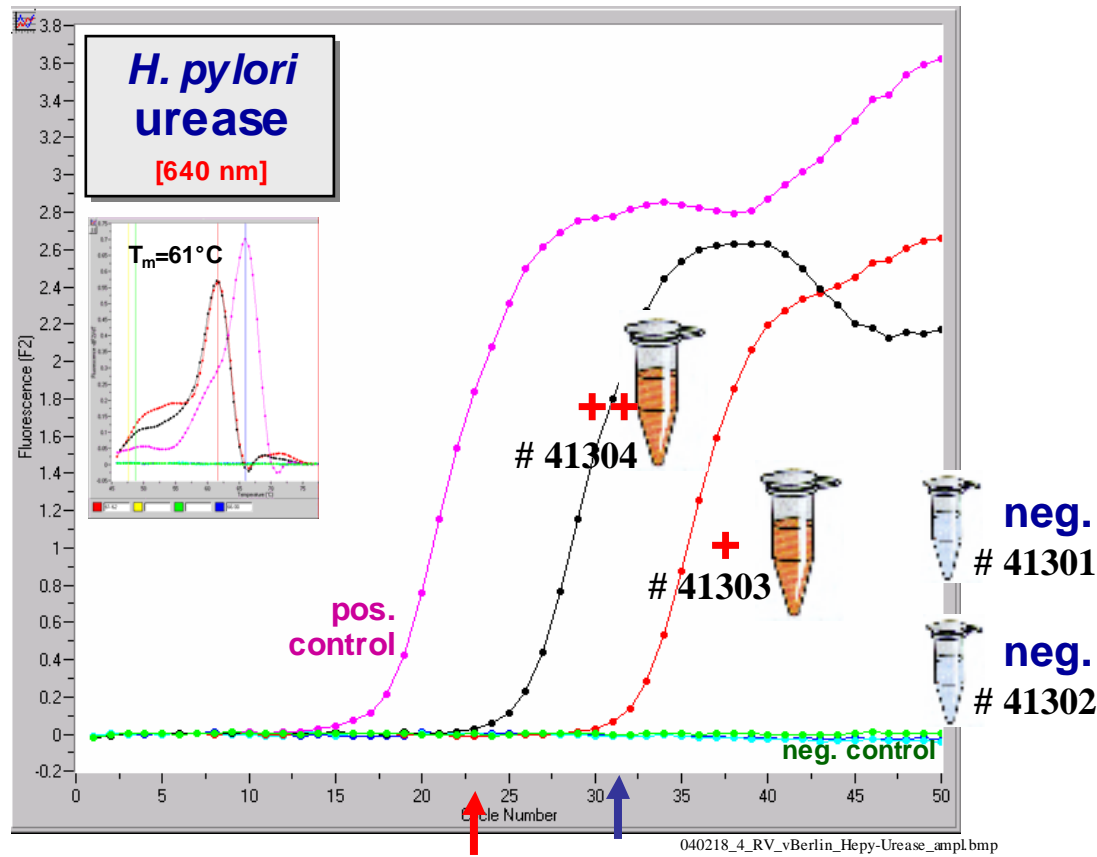
Reischl / Lehn / Wolf

19	Hepy 41301	
20	Hepy 41302	
21	Hepy 41303	32.34
22	Hepy 41304	25.74
23	poKo Hepy/Urease	17.87
24	negKo	

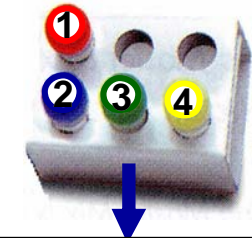


LightCycler PCR protocol:

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: $\sim 10^4$ $\sim 10^2$



➤ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 μ 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





433 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 04.2004

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

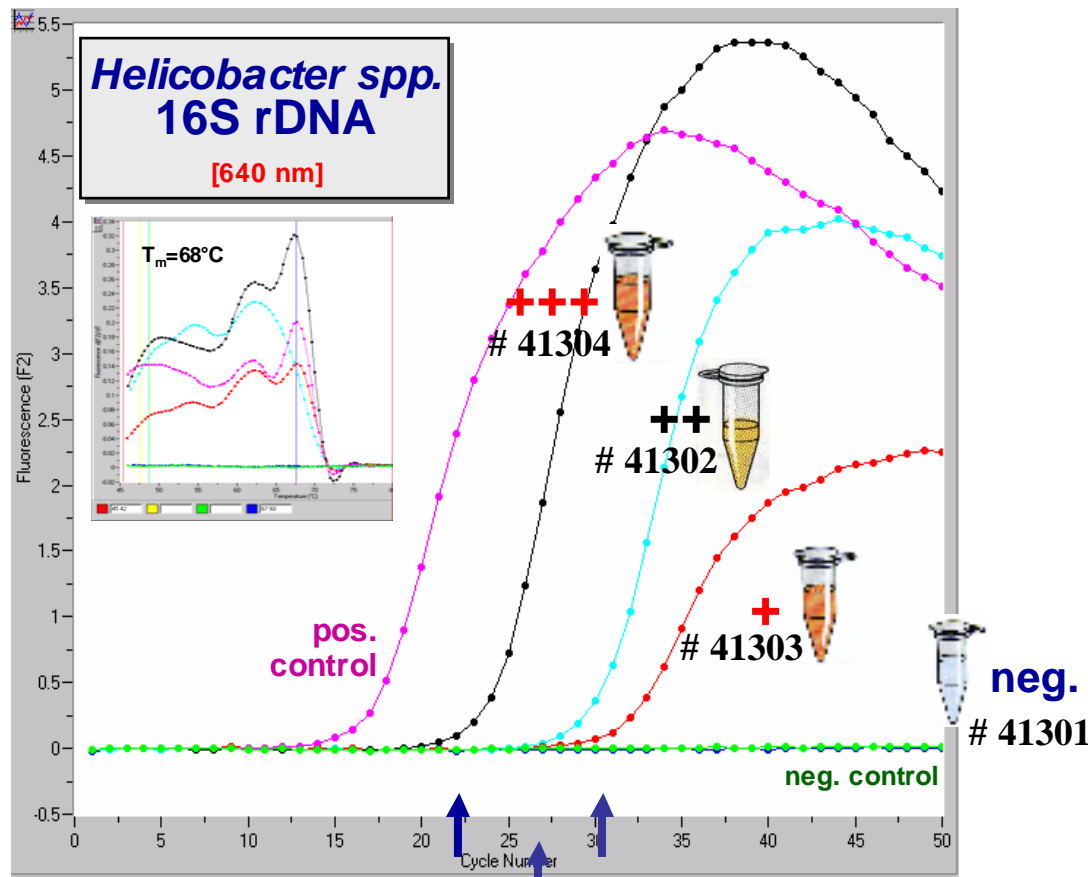
Reischl / Lehn / Wolf

25	Hepy 41301	
26	Hepy 41302	30.10
27	Hepy 41303	31.74
28	Hepy 41304	24.01
29	poKo Hepy/16S	17.20
30	negKo	



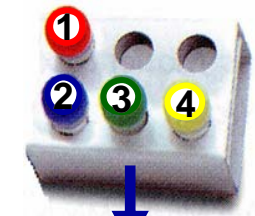
LightCycler PCR protocol:

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: $\sim 10^4$ $\sim 10^3$ $\sim 10^2$

040218_4_RV_vBerlin_Hepy-16s_ampl.bmp



➤ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 μ 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





433 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 04.2004

Reischl / Lehn / Wolf

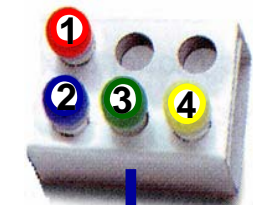
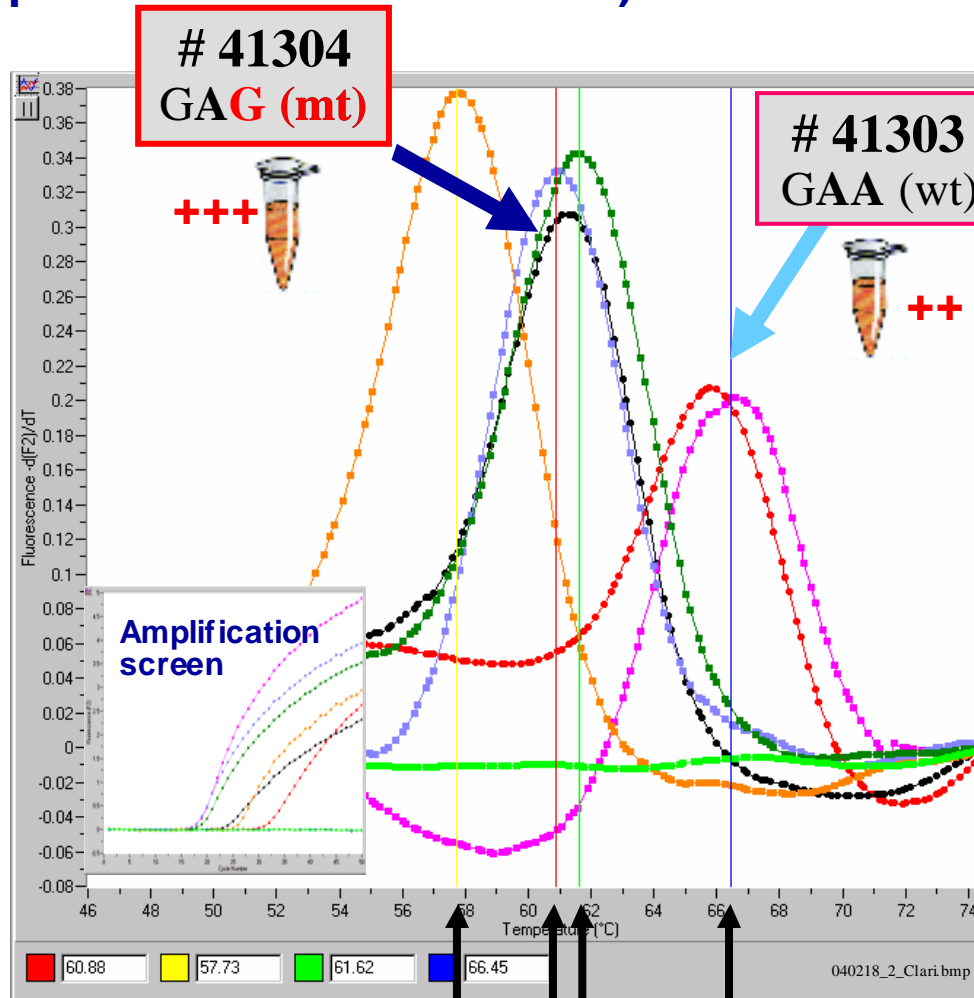
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

H. pylori
 Clari-Resistance
 28S rDNA

- 1 Hepy 41 301
- 2 Hepy 41 302
- 3 Hepy 41 303
- 4 Hepy 41 304
- 5 Plasmid AA
- 6 Plasmid AG
- 7 Plasmid GA
- 8 Plasmid CA
- 9 negKo



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



➤ 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.

U. Reischl/RIMM/02.2004

