



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 438: *Listeria* spp.

Listerien kommen ubiquitär in unserer Umwelt vor und können als potentielle Kontaminanten auch in Lebensmitteln wie z.B. Räucherlachs, Rohmilchkäse oder Schnittsalaten präsent sein. Daher muß für viele Lebensmittel die vom Gesetzgeber geforderte Abwesenheit von *L. monocytogenes* geprüft und bestätigt werden. Neben *L. monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies mit humanpathogenem Potential bekannt, für die inzwischen einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wollen wir uns bei der Konzeption der Proben für RV 438 nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken und bei diesem Ringversuch werden auch andere Listerien-Spezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein.

Die Verfügbarkeit von gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte bei diesem Ringversuch zumindest bei der relativ stark positiven Probe # 41804 (*Listeria monocytogenes*, $\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml), der stark positiven Probe # 41802 (*Listeria monocytogenes*, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml) sowie der negativen Probe # 41801 zu hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich der Nachweis der Spezies *Listeria ivanovii* in der stark positiven Probe # 41803 (*Listeria ivanovii*, $\sim 10^6$ CFU/ml) bereitete den meisten der 10 Teilnehmer offensichtlich Schwierigkeiten. Bis auf einen Teilnehmer wurden hier durchwegs falsch-negative Befunde berichtet. Zur Ehrenrettung der molekularbiologischen Diagnostik muß jedoch berücksichtigt werden, daß 6 von 10 Teilnehmern den Einsatz von *L. monocytogenes*-spezifischen Testsystemen anführten. Die übrigen 4 Teilnehmer machten leider keine Angaben zur Spezies-Spezifität ihrer Testsysteme und es kann vermutet werden, daß sich in dieser Gruppe auch noch einige *L. monocytogenes*-spezifische Assays befanden.

Von allen 10 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet und nur von einem Teilnehmer wurde bei einer der 4 ausgesandten Probenmaterialien ein vermeintliches Inhibitionsereignis beobachtet.

Da dieser Ringversuch bewußt nicht auf den alleinigen Nachweis von *L. monocytogenes* abzielt, und *L. ivanovii* zugegebenermaßen eine der selteneren aber dennoch humanpathogenen Spezies darstellt, sollten die betroffenen Teilnehmer diese Ergebnisse gegebenenfalls zum Anlaß nehmen, ihre verwendeten Testsysteme hinsichtlich offenkundiger Defizite bei der Speziesabdeckung zu analysieren. Auch im Fall des NAT-gestützten Listerien-Nachweises wird es interessant sein zu verfolgen, inwieweit sich die durchschnittliche analytische Sensitivität und Spezifität bei den selbstentwickelten und den kommerziellen Testsystemen im Laufe der nächsten Ringversuchsrunden entwickeln wird. Um etwas aussagekräftigere Analysen der Ringversuchsergebnisse zu erhalten bleibt zu hoffen, daß sich die Teilnehmerzahl bei den zukünftigen Ringversuchsrunden erhöhen wird. Zudem besteht speziell bei diesem Ringversuch explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung. Hält ein Teilnehmer lediglich ein *L. monocytogenes*-spezifisches NAT-Verfahren vor, so kann er dies über den Zusatzcode [71] im Ergebnisfeld angeben - für die Erstellung des individuellen Zertifikats werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse bewertet.

**PCR-/NAT *Listeria spp.*
(RV 438) April 2004**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
41801	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
41802	+	61	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (~ 5x10 ⁵ CFU/mL)
41803	++	61	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119 (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
41804	+++	61	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (~ 5x10 ⁶ CFU/mL)

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

n = 10	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	41801	41802	41803	41804		41801	41802	41803	41804
Befund Result									
Positiv	1	9	1	9	n.d.	0	0	0	0
Negativ	9	1	9 ¹⁾	1	nein no	14	14	13	14
Fraglich Questionable	0	0	0	0	ja yes	0	0	1	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
In house PCR assay [28] (n = 8)	15	15 / 24	50	7	7 / 8	87
¹⁾ "L. monocytogenes PCR" (n = 6)	11	11 / 12	92	12	12 / 12	100
Other commercial tests [27] (n = 2)	6	4 / 6	66	2	2 / 2	100
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⁾ Six of 10 participants indicated the use of a *Listeria monocytogenes*-specific PCR assay. This was considered in statistical analysis.

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



438 Bakteriengenom-Nachweis *Listeria spp.* status 04.2004

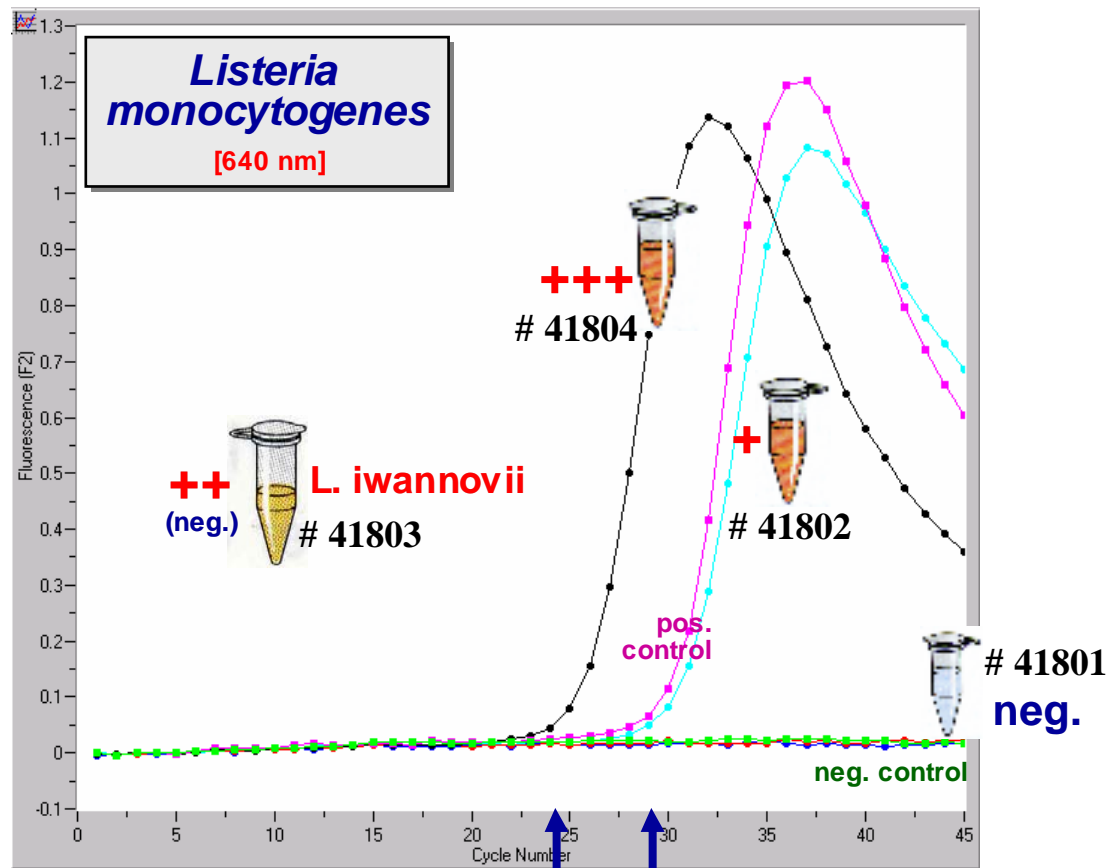
➤ **Evaluation** (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

- 1 Li spp 41801
- 2 Li spp 41802 30.30
- 3 Li spp 41803
- 4 Li spp 41804 25.31
- 5 posKo Limo 29.84
- 6 negKo

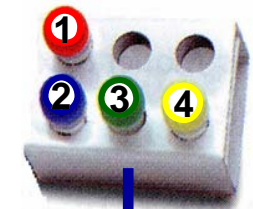


LightCycler PCR protocol:
 LightCycler *Listeria monocytogenes*
 Detection Kit
 Roche Cat. No. 3 357 457



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$ $\sim 10^3$

040218_2_Rv_vBerlin_Limo_ampl.bmp



- 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/RIMMH/02.2004

