



Regensburg, den 23.5.2008

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 541)**

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a brief discussion (NEW !) of the current results in English after the German version on the following pages. As usual, tables with the results are 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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

May 23, 2008

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
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 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.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 (April / September), 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 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 2008:** 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 QC program 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,



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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2008:

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 bzw. als grenzwertig positiv zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 81101), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 81003), *Helicobacter pylori* (Probe # 81304), EHEC (Probe # 81402), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 81504), *Legionella pneumophila* (Probe # 81604), *Salmonella enterica* (Probe # 81704), *Listeria monocytogenes* (Probe # 81803), sowie *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila) pneumoniae* (Probe # 81412). 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. **Rückstellprobensätze können bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden.**

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 prozentualem 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 kommerziellen PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt je eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 81701; *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium O:9 (D1), $\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 81702; *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium O:9 (D1), $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml), eine Probe mit relativ geringer Menge an *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium O:9 (D1) (# 81704; $\sim 5 \times 10^2$ CFU/ml) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 81703), die ausschließlich *E. coli* enthielt.

Im Vergleich zu früheren Ringversuchsrunden mit ähnlich geringen Mengen an Zielorganismen in einzelnen Proben ist bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse die hohe Richtigkeitsquote von 100 % die wohl auffälligste (und natürlich auch hocheffiziente) Beobachtung. Selbst der Nachweis von $\sim 5 \times 10^2$ CFU *Salmonella enterica* pro mL Probenmaterial bereitete keinem der insgesamt 9 Teilnehmer Schwierigkeiten. Offensichtlich stehen den Laboratorien im Umfeld des Nukleinsäure-gestützten Salmonellen-Nachweises zunehmend spezifischere und auch sensitivere selbstentwickelte oder kommerzielle Analysesysteme und PCR-Kits zur Verfügung.

So stehen mit dem aktuellen Ringversuch für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, auch wieder attraktive Sets an Rückstellproben zur Verfügung, die eine "grenzwertig" geringe Menge an *Salmonella enterica* enthalten (wie z.B. mit der Probe # 81704).

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 9 Teilnehmern keine falsch-negativen und auch keine falsch-positiven Befunde mitgeteilt. Lediglich von einem der Teilnehmer wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" die Verwendung des Teskits SureFood PATHOGEN Salmonella Plus der Fa. Congen angegeben.

In enger Abstimmung mit unseren Sollwert-Laboratorien werden wir weiterhin versuchen, ab und an ein etwas exotischeres Serovar von *Salmonella enterica* zu versenden und zumindest eine der 4 Proben mit einer relativ geringen Menge an Zielorganismen zu versetzen - auch wenn im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften und/oder Richtlinien der einzelnen Fachgesellschaften derzeit noch keine genauen unteren Nachweisgrenzen für den NAT-gestützten Salmonellen-Nachweis festgelegt wurden.

Brief discussion of the current results (English version) for the growing number of international participants:

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Salmonella enterica*. A relatively high amount of the corresponding target organism was present in sample # 81701 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium O:9 (D1), $\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml), an approximately hundredfold lower amount was present in sample # 81702 (*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium O:9 (D1), $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml), and sample # 81704 contained a very low number of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ($\sim 5 \times 10^2$ CFU/ml). No target organisms but only *E. coli* cells were present in sample # 81703. It is a pleasure to see that only correct results were observed in the course of this external PCR assay validation.

**PCR-/NAT *Salmonella enterica*
 (RV 537) April 2008**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
81701	++	61	<i>S. enterica</i> Typhimurium O:9(D1) (~ 5x10 ⁶ CFU/mL)
81702	+	61	<i>S. enterica</i> Typhimurium O:9(D1) (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
81703	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
81704	(+)	61	<i>S. enterica</i> Typhimurium O:9(D1) (~ 5x10 ² CFU/mL)

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

n = 9	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	81701	81702	81703	81704		81701	81702	81703	81704
Befund Result									
Positiv	9	9	0	9	n.d.	1	1	1	1
Negativ	0	0	9	0	nein no	8	8	8	8
Fraglich Questionable	0	0	0	0	ja yes	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 8)	24	24 / 24	100	8	8 / 8	100
Other commercial tests [27] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100



537 Bakteriengenom-Nachweis *Salmonella enterica*

status 04.2008

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

1	81701	23,17
2	81702	27,81
3	81703	
4	81704	30,52
5	pos. Ko. Salmonella	15,80
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Daum et al. (2002), *J. Clin. Microbiol.*
 40: 3050-3052.
 (TaqMan assay format)

