



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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 20-26 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 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 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 mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Erfreulicherweise waren die Kommentare in den letzten sieben Jahren überwiegend positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

June 8, 2010

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., Düsseldorf, Germany (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", 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", 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 since 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"

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. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 11 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder zwei „highlights“: zum einen wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 531 wieder die **schwedische Chlamydienvariante (nvCT)** ausgesandt und zum anderen befand sich der **sog. Züricher Drogenstamm** in einer der 4 Proben des MRSA Ringversuchs RV 539.

Eine weitere Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir beschäftigen uns gerade mit der Konfektionierung und Herstellung eines Proberingversuchs für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis*. Eine limitierte Anzahl von entsprechenden Probensets wird voraussichtlich im Rahmen der kommenden Ringversuchsrunde im November 2010 für interessierte Teilnehmer verfügbar sein. Als Sollwertlabor fungieren hier die Kollegen Dr. D. Frangoulidis und Dr. W. Splettstösser vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen.

Übrigens: das **REMMDI 2011** wird vom **14.-16. April 2011** wieder in Regensburg stattfinden. Diesen Termin eventuell schon mal vormerken... Nähere Informationen finden Sie demnächst unter www.remmdi.de

APRIL 2010:

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 # 1015303, 1015304, sowie die schwach positive Probe des RV 531 # 1015314), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1015303), *Bordetella pertussis* (Probe # 1015324), *Helicobacter pylori* (Probe # 1015334), *Borrelia afzelii* (Probe # 1015352), *Legionella pneumophila* (Probe # 1015363), sowie *Listeria monocytogenes* (Probe # 1015381). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 1015313 dieser Ringversuchsrunde. 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 prozentualen 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"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (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*

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt Probe # 1015332 des aktuellen Ringversuchs eine sehr hohe Menge an *Helicobacter pylori* ($\sim 10^6$ Organismen/mL). Die Probe # 1015331 enthielt das gleiche Isolat in einer etwa hundertfach geringeren Menge ($\sim 10^4$ CFU/mL), und die letzte der 3 positiven Proben enthielt diesmal eine relativ niedrige Menge der Zielorganismen (# 1015334, $\sim 10^3$ CFU/ml).

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme zum Nachweis von *H. pylori* DNA führte diesmal selbst bei den Proben mit relativ geringer Menge an Zielorganismen (# 1015331 und # 1015334) zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich von 3 der insgesamt 33 Teilnehmer wurde jeweils ein falsch-negatives Ergebnis für die positiven Proben # 1015331, # 1015332 und # 1015334 mitgeteilt. Probe # 1015333 enthielt diesmal eine Kultursuspension von *E. coli*, deren DNA mit den NAT-Testsystemen aller Teilnehmer offensichtlich keine "spezifischen" Amplifikationsprodukte erzeugte und somit auch korrekt als *H. pylori*-negativ bewertet wurde. Daher lagen die Richtigkeitsquoten der positiven und der negativen Befunde auch diesmal wieder erfreulich hoch. Bis auf 9 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (u.a. 6 x GenoType Helico Kit von Hain Lifescience) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in house* Testsysteme. Bei 32 der 33 Teilnehmer beinhalteten diese Testsysteme auch eine Inhibitionskontrolle, bei keiner der Proben des gesamten Probensatzes wurden dabei 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 Hybridisierungs sonden. Ergebnisse wurden hier von 23 der insgesamt 33 Teilnehmer mitgeteilt, und diese waren mit Ausnahme von 2 Teilnehmern (von denen die *H. pylori* Zielorganismen in der Probe # 1015334 als Clarithromycin-sensibel bewertet wurden) durchwegs korrekt. Die Zielwerte für die molekularbiologische Resistenztestung der ausgesandten Isolate sind in Tabelle 1 aufgeführt.

ENGLISCH:

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained three *Helicobacter pylori* positive samples in a kind of dilution series. Sample # 1015332 contained approximately 10^6 CFU/ml, sample # 1015331 contained approximately 10^4 CFU/ml, and sample # 1015334 contained approximately 10^3 CFU/ml of the same Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strain isolated from a patient in the course of a antibiotic therapy failure study. All of the 33 participants reported correct PCR results for the negative sample # 1015333 (which contained a significant number of *E. coli* K12 cells). For the remaining samples, 31 of the 33 participants reported correct results for all of the three *H. pylori*-positive samples. Only two participants observed negative results with samples # 1015331, # 1015332, and # 1015334 using their individual *H. pylori*-specific assay concepts. With the exception of the three false-negative results, 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 was performed by 23 of the 33 participants – and with the exception of 2 laboratories (who reported Clarithromycin sensible results for sample # 1015334), the reported results were correct.

**PCR-/NAT *Helicobacter pylori*
 (RV 533) April 2010**



Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.

Sample composition and expected results.

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
1015331	+	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA & GTA mut. in 28S rDNA)
1015332	+++	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁶ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA & GTA mut. in 28S rDNA)
1015333	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1015334	(+)	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA & GTA mut. in 28S rDNA)

Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.

Absolute numbers of reported individual results.

n = 33	Probennummer (Sample no.)				Inhibition
	1015331	1015332	1015333	1015334	
Befund Result					
Positiv	32 ¹⁾	32 ¹⁾	0	32 ¹⁾	n.d.
Negativ	1	1	33	1	nein no
Fraglich Questionable	0	0	0	0	ja yes

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	%
Commercial assay [27] (n = 9)	27	27 / 27	100	9	9 / 9	100
In house PCR assay [28] (n = 20)	60	60 / 60	100	20	20 / 20	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	9	9 / 12	75	4	4 / 4	100

Comments: ¹⁾ Twentythree of the 33 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing. With the exception of 2 laboratories (who report Clarithromycin sensible results for sample # 1015334), the reported results were correct.



533 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 04.2010

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

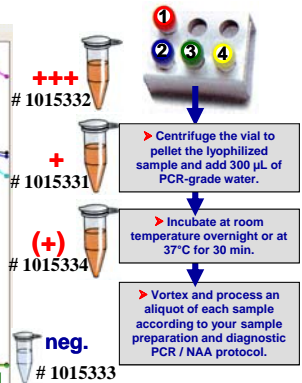
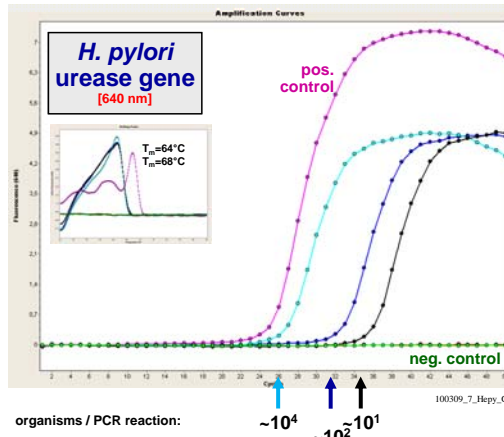
Reischl / Linde / Wolf

13	1015331	31,51
20	1015332	25,53
21	1015333	
22	1015334	34,85
23	Pos. Ko. H. pylori	23,99
24	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_I/10



533 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 04.2010

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

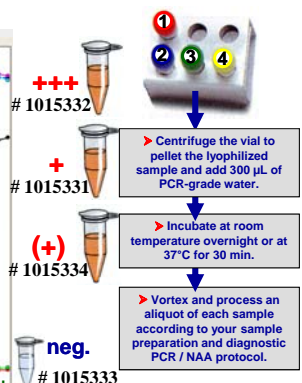
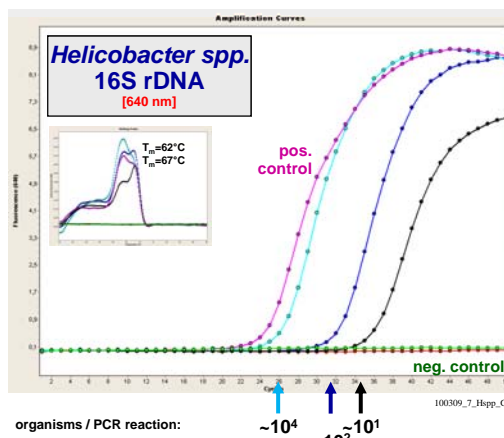
Reischl / Linde / Wolf

13	1015331	31,20
14	1015332	25,18
15	1015333	
16	1015334	34,89
17	Pos. Ko. H. spp	23,50
18	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_I/10



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 04.2010

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

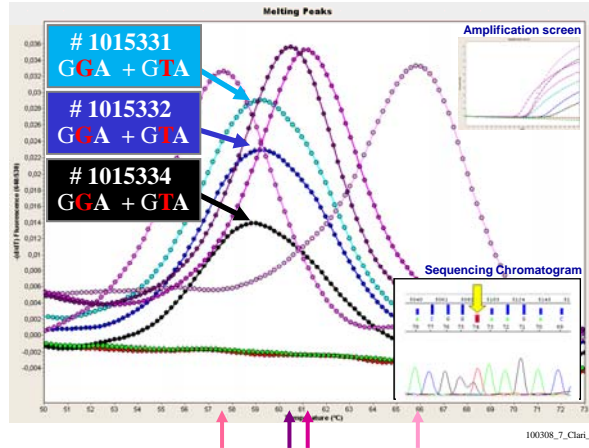
H. pylori Clari-Resistance 23S rDNA

1	1015331	33,52
2	1015332	26,86
3	1015333	
4	1015334	36,02
5	AA	26,71
6	CA	26,49
7	GA	22,32
8	AG	26,62
9	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished *In house* protocol.

INSTAND-C05_I/10



➤ 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.

Regensburg

