



Regensburg, den 21. Dezember 2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion (NEW !) of the current results after the corresponding sections in German language. As usual, tables with the results are presented 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 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

December 22, 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,



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. 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

NOVEMBER 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 Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 82002), EHEC (Proben # 82401, # 82402), MRSA (Probe # 82902), *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila pneumoniae* (Probe # 82412), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 82424). 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.

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 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. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem geschätzten Kollegen Herrn Dr. Christoph Schoerner, Erlangen, für seine zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt je eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 82702; *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium O:9 (D1), $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 82703; *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium O:9 (D1), $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), eine Probe mit relativ geringer Menge an *Salmonella enterica* Serovar Enterica (# 82704; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 82701), die ausschließlich *E. coli* enthielt.

Die relativ hohe Menge an Zielorganismen in Probe # 82702 sowie die Verfügbarkeit von spezifischen und gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal (zumindest bei 3 der 4 Proben) zu relativ hohen Richtigkeitsquoten von über 90%. Ein zuverlässiger Nachweis der geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 82704 bereitete lediglich zwei der 10 Teilnehmer Schwierigkeiten. Wie bereits im vorhergegangenen Ringversuch diskutiert, scheint mit einer Konzentration von $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml an Zielorganismen die Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver NAT-gestützter Testsysteme für die zuverlässige Detektion von *Salmonella enterica* definitiv noch nicht unterschritten zu sein. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit der Probe # 82704 dieses Ringversuchs wieder Rückstellproben zur Verfügung, die eine "grenzwertig" geringe Menge von ca. 10^3 CFU/mL an *Salmonella enterica* enthalten.

Die beiden falsch-positiven Ergebnisse von 2 Teilnehmern bei der Probe ohne Zielorganismen (# 82701) lassen sich wohl am ehesten mit Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und Analytik erklären.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 10 Teilnehmern lediglich 3 falsch-negative Befunde mitgeteilt.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: SureFood PATHOGEN Salmonella Plus der Fa. Congen (1x) und IQ-Check Salmonella Kit der Fa. Bio-Rad (1x).

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.

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 # 82702 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium O:9 (D1), $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), an approximately hundredfold lower amount was present in sample # 82703 (*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium O:9 (D1), $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), and sample # 82704 contained a very low number of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml). No target organisms but only *E. coli* cells were present in sample # 82701. Only 2 false-positives and 3 false-negatives were among the 40 results reported by the 10 participating laboratories. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays.

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
82701	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
82702	++	61	<i>S. enterica</i> Typhimurium O:9(D1) (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
82703	+	61	<i>S. enterica</i> Typhimurium O:9(D1) (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
82704	(+)	61	<i>S. enterica</i> Enteritidis (~ 1x10 ³ CFU/mL)

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

n = 10	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	82701	82702	82703	82704		82701	82702	82703	82704
Befund Result									
Positiv	2	9	10	8	n.d.	1	1	1	1
Negativ	8	1	0	2	nein no	9	9	9	9
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	%
In house PCR assay [28] (n = 7)	18	18 / 21	86	5	5 / 7	71
Other commercial tests [27] (n = 2)	6	6 / 6	100	2	2 / 2	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	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.



537 Bakteriengenom-Nachweis *Salmonella enterica* status 11.2008

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

Reischl / Linde / Wolf

1	82701	
2	82702	23,90
3	82673	28,45
4	82704	31,04
5	pos. ko. Salmonella	16,21
6	NTC	



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

