



Regensburg, den 11. Dezember 2009

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 in English on the following pages 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 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, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

December 11, 2009

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. (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 in 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. H. Wolf, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Eine kurze Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir werden im Laufe des Jahres je einen sog. **Proberingversuch** für den Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis* anbieten. Als Sollwertlabor wird hier das Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart fungieren. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen. Sollten Sie Interesse an der Teilnahme an diesem "Proberingversuch" mit limitierter Anzahl von entsprechenden Probensets haben, so bitten wir Sie um kurze Mitteilung an den Ringversuchsleiter (udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de).

NOVEMBER 2009:

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 # 92001, 92004, sowie die drei schwach positiven Proben des RV 531), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 92003), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 92504), *Salmonella enterica* (Probe # 92701), sowie cMRSA (Probe # 92903). 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 prozentuaalem 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 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt je zwei Proben mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 92702; *Salmonella enterica* ser. Grumpensis, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml und # 92704; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 92701; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 92703), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Das Isolat der *Salmonella enterica* ser. Grumpensis wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Ute Messelhäuser (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um einen Stamm, der im Zusammenhang mit sporadisch aufgetretenen Erkrankungsfällen unter den Besuchern eines spanischen Restaurants aus schwarzem brasilianischem Pfeffer isoliert wurde.

Die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den Proben # 92701, # 92702 und # 92704 sowie die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu relativ hohen Richtigkeitsquoten. Im Gegensatz zu den früheren *Salmonella enterica* PCR/NAT-Ringversuchen war diesmal nur ein isoliertes falsch-positives Ergebnis bei der "negativen Probe" zu beobachten. Dies deutet auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

Von 2 der insgesamt 7 Teilnehmer wurde bei den beiden relativ stark positiven Proben # 92701 und # 92704 ein falsch-negatives NAT-Ergebnis beobachtet. Vermutlich wurden hier Probenaufbereitungsverfahren und/oder Testsysteme mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt. Angesichts der hohen Menge an *Salmonella enterica* in diesen Probenmaterialien sollten die betroffenen Ringversuchsteilnehmer die verwendeten Zielsequenzen und ihre eingesetzten Testkonzepte überprüfen und umgehend nachbessern.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 7 Teilnehmern lediglich 2 falsch-negative Befunde und ein falsch-positiver Befund mitgeteilt. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: SureFood PATHOGEN Salmonella Plus Kit der Fa. Congen (1x) und iQ-Check *Salmonella* II Kit von Bio-Rad Laboratories (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.

Brief discussion of the current EQAS results in English:

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained three positive samples. A relatively high amount of the corresponding target organism were present in samples: # 92702 (*Salmonella enterica* ser. Grumpensis, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), and # 92704 (*Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), and an approximately tenfold lower amount was present in sample # 92701 (*Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml). No target organisms but only human cells and *E. coli* cells were present in sample # 92703. Only one false-positive result was reported for sample # 92703 and only 2 false-negatives for samples # 92701 and # 92704 were among the 28 results reported by the 7 participating laboratories. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays.

**PCR-/NAT *Salmonella enterica*
 (RV 537) November 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
92701	+	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
92702	++	61	<i>S. enterica</i> ser. Grumpensis (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
92703	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12
92704	++	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)

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

n = 7	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	92701	92702	92703	92704		92701	92702	92703	92704
Befund Result									
Positiv	6	7	1	6	n.d.	0	0	0	0
Negativ	1	0	6	1	nein no	7	7	7	7
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	%
Other commercial tests [27] (n = 3)	7	7 / 9	78	2	2 / 3	67
In house PCR assay [28] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	100



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

IN STAND e. V.
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
 in medizinischen Laboratorien e.V.
<http://www.instand-ev.de>



537 Bakteriengenom-Nachweis *Salmonella enterica*

status 11.2009

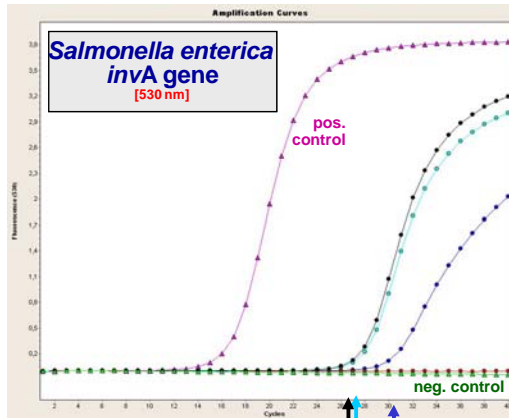
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

7	92701	28,98
8	92702	26,64
9	92703	
10	92704	26,47
11	Pos. Ko. Salmonella	15,50
12	NTC	

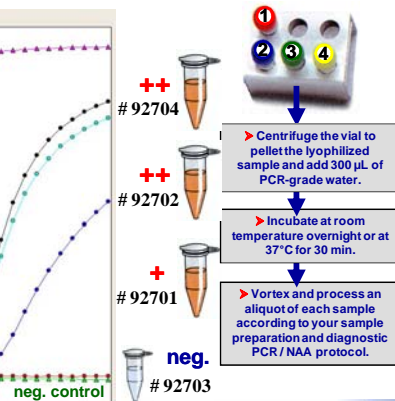


LightCycler PCR protocol:
 Daam et al. (2002), *J. Clin. Microbiol.*
 40: 3050-3052.
 (TaqMan assay format)



organisms / PCR reaction:

$\sim 10^4$
 $\sim 10^3$



IN STAND-G03_II/09