



**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438)**

Dear Participant, dear Colleague,
Please find a cover letter in English on page 10 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: 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.

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

AKTUELLER HINWEIS:

Wie bereits erwähnt, sind wir bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche stets bemüht den Anregungen und Wünschen von Seiten der Teilnehmer möglichst zeitnah und professionell Rechnung zu tragen. Daher werden wir auch alles daran setzen, das derzeitige Panel an erregerspezifischen Ringversuchen bereits im Laufe des kommenden Jahres um "*Chlamydia pneumoniae*" und "MRSA bzw. cMRSA" (sog. community-associated Methicillin-resistente *S. aureus*) zu erweitern. Mit der Einbeziehung der beiden letztgenannten Erreger bzw. Erregergruppen wollen wir vor allem den zahlreichen Anfragen seitens humandiagnostisch orientierter mikrobiologischer Laboratorien und aktuellen infektiologischen Notwendigkeiten nachkommen. Wir arbeiten derzeit bereits an der Konfektionierung entsprechenden Probenmaterials und alle an unserer Ringversuchsreihe teilnehmenden Laboratorien werden im Laufe des kommenden Jahres von INSTAND e.V. ein Anmeldeformular für die Teilnahme an einem probeweisen Ringversuch bekommen. Bei erfolgreichem Ablauf dieser Prototyp-Ringversuche werden diese dann ab 2006 als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

SEPTEMBER 2004:

Nachdem in den vorhergegangenen Runden dieser neuen Ringversuchs-Serie auch einige Proben mit relativ geringer Keimzahl versandt wurden, wollten wir bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäure-amplifikationstechniken (NAT) den Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig zu betrachtenden Erregerzahlen weitestgehend vermeiden. Es sei an dieser Stelle aber nochmals darauf hingewiesen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der letzten Ringversuche 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). Auch im aktuellen Ringversuchssset EHEC/STEC (RV 434) befindet sich eine Probe (# 42402) mit relativ geringer Menge an Zielorganismen. Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze beispielsweise als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

Mit einer Ausnahme (# 42402) wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen bei den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde 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 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 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). 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 systematische 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 EDV-technisch erfasst und bleiben somit 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 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)" als *pdf*-Files zum freien download bereit.

RV 438: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *L. monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies mit humanpathogenem Potential bekannt, für die inzwischen auch 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 es werden auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs 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 # 42802 (*Listeria monocytogenes*, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), der stark positiven Probe # 42801 (*Listeria monocytogenes*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml) sowie der negativen Probe # 42803 (*E. coli*) zu Richtigkeitsquoten im Bereich von 100 %. Lediglich der Nachweis der Spezies *Listeria ivanovii* in der Probe # 42804 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml) bereitete 2 der 3 Teilnehmer, die die Verwendung eines *Listeria* spp.-spezifischen Testsystemen anführten bzw. keine Angaben zur Spezies-Spezifität ihrer Testsysteme in Spalte VII des Ergebnisformulars machten, offensichtlich etwas Schwierigkeiten.

Bei den übrigen 7 Teilnehmern dieses Ringversuchs, die explizit den Einsatz von *L. monocytogenes*-spezifischen Testsystemen angaben (Code [71]), ist ein negatives Ergebnis bei Probe # 42804 dagegen wohl eher als Hinweis auf eine hohe Spezifität der jeweiligen PCR-Testkonzepte anzusehen. Dies wurde auch bei der statistischen Auswertung berücksichtigt (siehe Tabelle 3: Spalte mit "*L. monocytogenes* PCR").

Von allen 10 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet und vermeindliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet.

Auch im Fall des NAT-gestützten Listerien-Nachweises wird es interessant sein zu verfolgen, wie sich die durchschnittliche analytische Sensitivität und Spezifität bei den selbstentwickelten und den kommerziellen Testsystemen im Laufe der nächsten Ringversuchsrunden entwickelt. 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 seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

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 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 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. Please note that our current panel of pathogen-specific QC sets will be expanded by "*Chlamydia pneumoniae*" and "MRSA / CA-MRSA" by the end of next year.

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.

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).

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. Hans Wolf

Prof. Dr. Norbert Lehn

Prof. Dr. Eberhard Straube

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
42801	++	61	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
42802	+++	61	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
42803	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12
42804	++	61	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)

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

n = 10	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	42801	42802	42803	42804	42801	42802	42803	42804	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	10	10	0	1	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	0	10	9 ¹⁾	nein <i>no</i>	10	10	10	10
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

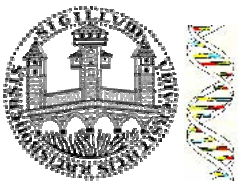
Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.

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 <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 7)	15	15 / 21	71	7	7 / 7	100
" <i>L. monocytogenes</i> PCR" (n = 7) ¹⁾	14 ¹⁾	14 / 14	100	14 ¹⁾	14 / 14	100
Other commercial tests [27] (n = 3)	6	6 / 9	66	3	3 / 3	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⁾Seven of 10 participants indicated the use of a *Listeria monocytogenes*-specific PCR assay. This was considered in statistical analysis.



438 Bakteriengenom-Nachweis *Listeria spp.*

status 09.2004

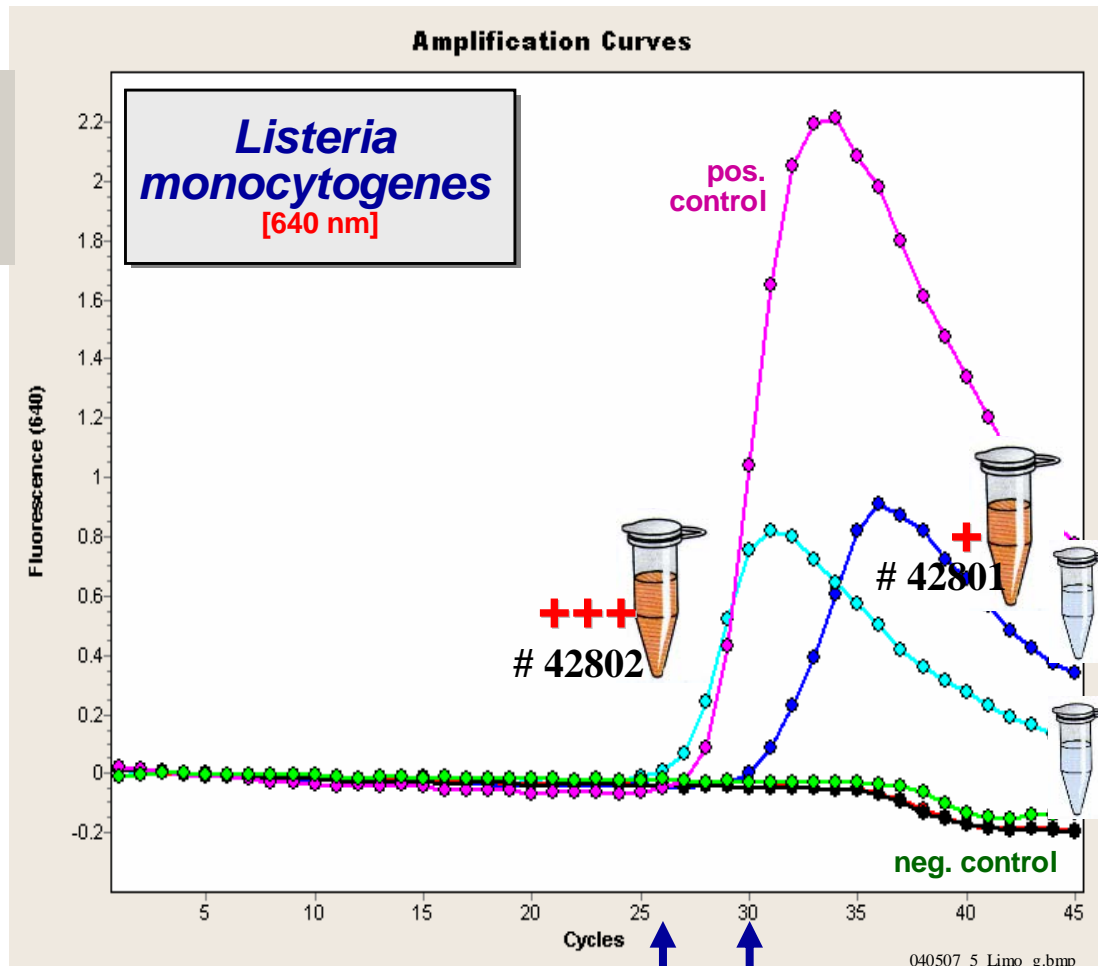
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

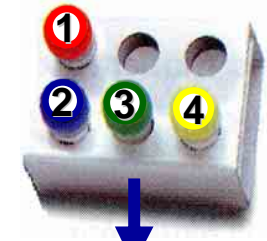
1	RV 42801	29.05
2	RV 42802	24.70
3	RV 42803	
4	RV 42804	
5	Positive Listeria	26.19
6	Negative control	



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



organisms / PCR reaction: $\sim 10^6$ $\sim 10^5$



- 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.

U. Reischl/RIMMH/09.2004

