



Regensburg, den 19. Oktober 2005

**An die Teilnehmer  
der INSTAND-Ringversuche  
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT**  
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438 und 539 bis 540)

**Dear Participant, dear Colleague,**  
*Please find a cover letter in English on page 2 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,

**PD Dr. Udo Reischl**  
Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis  
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

**Prof. Dr. H. Wolf      Prof. Dr. N. Lehn      Prof. Dr. E. Straube      Prof. Dr. M. Maaß**

To the participants of the  
INSTAND-Proficiency Test in  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 430 to 438 and 539 to 540)

**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](http://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 April 2006.

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](http://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. H. Wolf      Prof. Dr. N. Lehn      Prof. Dr. E. Straube      Prof. Dr. M. Maaß**

---

### 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. Nach dem erfolgreichen Verlauf der aktuellen Probe-Ringversuche werden RV 539 "MRSA bzw. cMRSA" (sog. community-associated Methicillin-resistente *S. aureus*) und RV 540 "*Chlamydia pneumoniae*" nun als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen.

Die Konzeption und Auswertung der *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen Ringversuche erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Maaß, Universitätsklinikum Salzburg, der hier auch als Ringversuchsleiter fungieren wird. 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.

**Organisatorische Anmerkung:** ab 2006 werden die Ringversuche zum "Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken" (jetzt RV 430 bis RV 438) aus organisatorischen Gründen der 500er-Nummerngruppe zugeordnet. Die entsprechenden Ringversuchsnummern ändern sich dann wie folgt: RV 430 > RV 530; RV 431 > RV 531; u.s.w. Die beiden neu hinzukommenden Ringversuche werden dann unter der Nummer RV 539 für "MRSA bzw. cMRSA" und der Nummer RV 540 für "*Chlamydia pneumoniae*" aufgeführt.

## **Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer**

### **SEPTEMBER 2005:**

Nachdem in einigen der vorhergegangenen Runden dieser Ringversuchs-Serie vorwiegend Proben mit relativ hoher Keimzahl versandt wurden, wurde bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) bei einigen Zielorganismen wieder der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

Es sei an dieser Stelle auch darauf hingewiesen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der letzten Ringversuche verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets an Rückstellproben enthalten u.a. 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 in den aktuellen Ringversuchssets befinden sich wieder einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 52101), *B. pertussis* (Probe # 52204), EHEC (Probe # 52401), *L. pneumophila* (Probe # 52603), *L. monocytogenes* (Probe # 52801), MRSA (Probe # 52903), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 52411). 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 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 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich

---

sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, 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). 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 auch immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

Eine weitergehende systematische Aufschlüsselung nach den einzelnen Kategorien der DNA-Extraktion, Amplifikation, Detektion sowie den jeweils verwendeten Zielsequenzen ist bei diesem Ringversuch aufgrund der relativ hohen Richtigkeitsquote unter den eindeutig positiven Proben wenig sinnvoll. Die individuellen Angaben der einzelnen Teilnehmer zur Testdurchführung werden jedoch EDV-technisch erfasst und bleiben somit für retrospektive Analysen verfügbar.

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](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

---

### **RV 432: *Bordetella pertussis***

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt je eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 52202), mit relativ geringerer Menge (# 52204), ohne Zielorganismen (# 52203), sowie eine Probe mit relativ hoher Menge an einer mit dem Zielorganismus eng verwandten Spezies (# 52201). Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *B. pertussis* DNA führte auch diesmal zu hohen Richtigkeitsquoten bei der relativ stark positiven und bei der negativen Probe. Die etwas geringere Menge an *B. pertussis* in der Probe # 52204 konnte zudem von 42 der insgesamt 57 Teilnehmer mit den individuell etablierten PCR-Testsystemen eindeutig nachgewiesen werden. Nur 14 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis und ein Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis für Probe # 52204 als "fraglich".

Auffällig war beim aktuellen Ringversuch eine hohe Rate an "falsch-positiven" Ergebnissen für die Probe #52201, die diesmal nennenswerte Mengen an *Bordetella holmesii* enthielt. Wie bereits bei zwei der vorhergegangenen Ringversuche erwähnt, ist diese Kreuzreaktion bei der Verwendung von IS481 als "*B. pertussis*-spezifische" Zielsequenz jedoch ganz einfach zu erklären: auf dem Genom aller bisher untersuchten *B. holmesii*-Isolate befinden sich einige Kopien der bakteriellen Insertionssequenz IS481. Kopien der Insertionssequenz IS481 wurden auch gelegentlich bei *B. bronchiseptica* gefunden. Dieser Umstand führte bei 46 der 57 Teilnehmer zwangsläufig zu "falsch-positiven" PCR-Ergebnissen für die Probe #52201.

Die Inzidenz von *B. holmesii* und *B. bronchiseptica* in klinischen Materialien von Menschen dürfte jedoch (zumindest hierzulande) eher gering sein. Daher erscheint es auch vertretbar, die Sequenz IS481, für die eine Vielzahl von Validierungsdaten vorliegt, auch weiterhin zur NAT-gestützten Diagnostik einer Infektion mit *B. pertussis* einzusetzen. Bemühungen zu einer internationalen Standardisierung der Bordetella-PCR im *real-time* Format sind nach wie vor auf dem Wege. Im Rahmen dieses Ringversuchs wollten wir aber lediglich auf diese potentielle Kreuzreaktion aufmerksam machen und bei Verwendung der IS481-Zielsequenz wurde ein positives Ergebnis für Probe #52204 daher nicht als Fehler bewertet. Zudem wurde diese unausweichliche Kreuzreaktion nicht bei den Berechnung der Richtigkeitsquoten für die negativen Ergebnisse berücksichtigt (Tabelle 3).

Unter den insgesamt 228 NAT-Ergebnissen befanden sich somit 15 falsch-negative (für die *B. pertussis*-positiven Proben #52202 und #52204) aber kein falsch-positives Ergebnis. Inhibitionskontrollen wurden von 54 der insgesamt 57 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet. Wie auch beim vorhergehenden Ringversuch verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*.

---

**PCR-/NAT *Bordetella pertussis*  
 (RV 432) September 2005**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
52201	∅	62	<i>Bordetella holmesii</i> clin. isolate (~ 5x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
52202	++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12742 (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
52203	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
52204	+	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12742 (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)

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

n = 57	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	52201	52202	52203	52204		52201	52202	52203	52204
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	46 <sup>1) 2)</sup>	56 <sup>1)</sup>	0	42 <sup>1)</sup>	n.d.	3	3	3	3
<b>Negativ</b>	11 <sup>1)</sup>	1 <sup>1)</sup>	57	14 <sup>1)</sup>	nein <i>no</i>	54	54	54	54
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	1	1	0	1	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 = 48)	133	133 / 144	92	48	48 / 48	100
<i>ampliWell</i> Pertussis [21] (n = 2)	6	6 / 6	100	2	2 / 2	100
Other commercial tests [27] (n = 6)	14	14 / 18	77	6	6 / 6	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	1	1 / 2	50	2	2 / 2	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.

**Comments:** <sup>1)</sup> One of the participants reported a positive PCR result for IS481 and a negative PCR result for the pertussis toxin gene.  
<sup>2)</sup> Due to the well-known cross-reaction of *B. holmesii* in an IS 481-specific PCR assay for *B. pertussis*, positive PCR results with sample 52201 are not rated as false-positive.



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

Instand e.V.  
 Institut für Standardisierung und Dokumentation  
 im medizinischen Laboratorium e.V.  
<http://www.instand-ev.de>



### 432 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis* status 09.2005

#### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

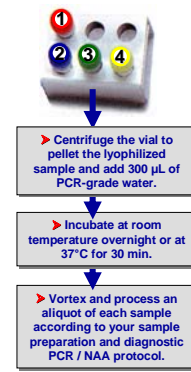
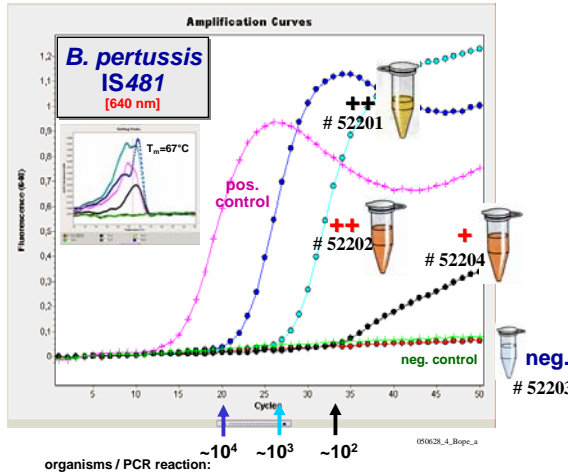
Reischl / Lehn / Wolf

✓	1	Bope 52201	22,55
✓	2	Bope 52202	28,29
✓	3	Bope 52203	
✓	4	Bope 52204	33,70
✓	5	Pos control Bope	15,48
✓	6	Neg control	



**LightCycler PCR protocol:**

Reischl, U., K. Kösters, B. Leppmeier, H.-J. Linde, and N. Lehn (2001) Rapid detection and simultaneous differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in clinical specimens by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Reischl, U., Wittwer, C., and Cockerill, F., eds.), ISBN 3-540-41881-4, Springer Press, Heidelberg, pp. 31-44.



U. Reischl/RIMMH/09.2005



INSTAND-B03\_II/05



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

Instand e.V.  
 Institut für Standardisierung und Dokumentation  
 im medizinischen Laboratorium e.V.  
<http://www.instand-ev.de>



### 432 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis* status 09.2005

#### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

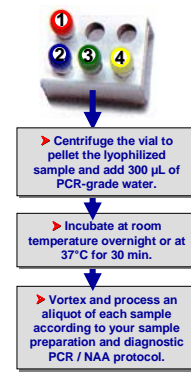
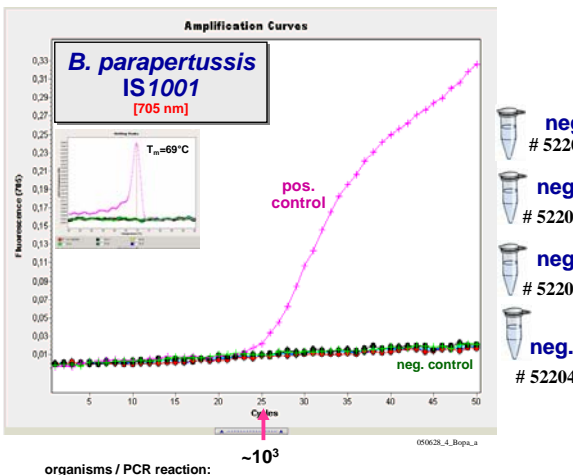
Reischl / Lehn / Wolf

✓	7	Bope 52201	
✓	8	Bope 52202	
✓	9	Bope 52203	
✓	10	Bope 52204	
✓	11	Pos control Bope	25,81
✓	12	Neg control	



**LightCycler PCR protocol:**

Reischl, U., K. Kösters, B. Leppmeier, H.-J. Linde, and N. Lehn (2001) Rapid detection and simultaneous differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in clinical specimens by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Reischl, U., Wittwer, C., and Cockerill, F., eds.), ISBN 3-540-41881-4, Springer Press, Heidelberg, pp. 31-44.



U. Reischl/RIMMH/09.2005



INSTAND-B04\_II/05