



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", 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", 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"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 433: *Helicobacter pylori*

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den positiven Proben # 52302 und # 52304 führte beim Nachweis von *H. pylori* zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten. Probe # 52301 enthielt diesmal eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter salomonis*, deren DNA mit den NAT-Testsystemen der insgesamt 15 Teilnehmer offensichtlich keine "spezifischen" Amplifikationsprodukte erzeugte. Daher lagen die Richtigkeitsquoten der positiven und der negativen Befunde diesmal erfreulicherweise bei 100 %. Alle Teilnehmer verwendeten zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in house* Testsysteme (bei 12 der 15 Teilnehmer beinhalteten diese Testsysteme auch eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle) und bei keiner der untersuchten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet. Wie in der Beschreibung des Ringversuchs 433 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* 28S rDNA. Ergebnisse wurden hier von 10 der 15 Teilnehmer mitgeteilt und diese waren auch durchwegs korrekt.

PCR-/NAT *Helicobacter pylori*
(RV 433) September 2005



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|-----------------------|--|
| 52301 | Ø | 62 | <i>Helicobacter salomonis</i> (~ 5x10 ⁴ CFU/mL) |
| 52302 | ++ | 61 / 72 ²⁾ | <i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 28S rDNA seq.) |
| 52303 | Ø | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 52304 | + | 61 / 71 ²⁾ | <i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA mutation in 28S rDNA) |

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

| n = 15 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|-------|-------|-------|-------------------|------------|-------|-------|-------|
| | 52301 | 52302 | 52303 | 52304 | | 52301 | 52302 | 52303 | 52304 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 0 | 15 | 0 | 15 | n.d. | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Negativ | 15 | 0 | 15 | 0 | nein <i>no</i> | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 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 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 <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 = 15) | 30 | 30 / 30 | 100 | 30 | 30 / 30 | 100 |
| Andere / k.A. / 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: ²⁾ Ten of the 15 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing; all reported results were correct (# 52302: code 72, # 52304: code 71).



433 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 09.2005

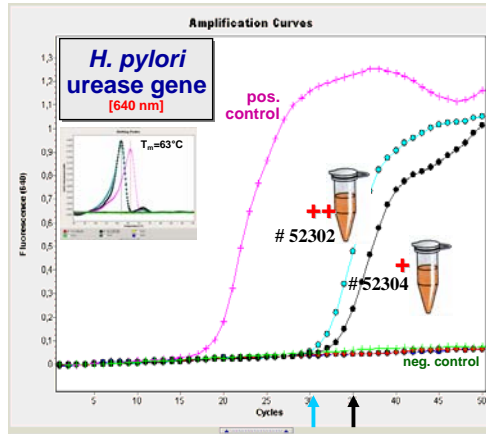
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

| | | | |
|---|----|------------------|-------|
| ✓ | 13 | Hepy 52301 | |
| ✓ | 14 | Hepy 52302 | 31,65 |
| ✓ | 15 | Hepy 52303 | |
| ✓ | 16 | Hepy 52304 | 33,28 |
| ✓ | 17 | Pos control Hepy | 18,86 |
| ✓ | 18 | Neg control | |



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.



organisms / PCR reaction:

neg. # 52301
 neg. # 52303



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL 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/09.2005



INSTAND-C03_II/05



433 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori*

status 09.2005

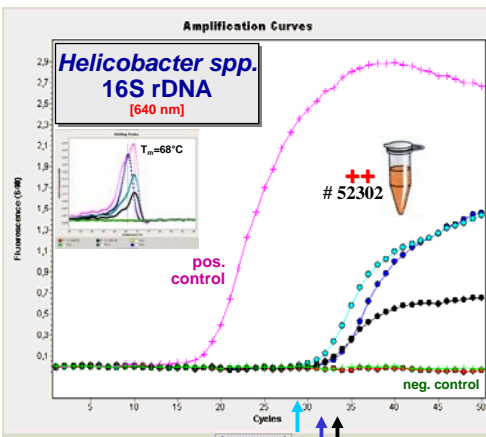
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

| | | | |
|---|----|-------------------|-------|
| ✓ | 7 | 52301 Hel.spp.neu | 33,23 |
| ✓ | 8 | 52302 | 31,50 |
| ✓ | 9 | 52303 | |
| ✓ | 10 | 52304 | 31,72 |
| ✓ | 11 | pos.Kon. Hel.spp | 18,75 |
| ✓ | 12 | neg.Kon. | |



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.



organisms / PCR reaction:

52302
 # 52304
 # 52301
 neg. # 52303



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL 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/09.2005



INSTAND-C04_II/05



433 Bakteriengenom-Nachweis *Helicobacter pylori* status 09.2005

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

Reischl / Lehn / Wolf

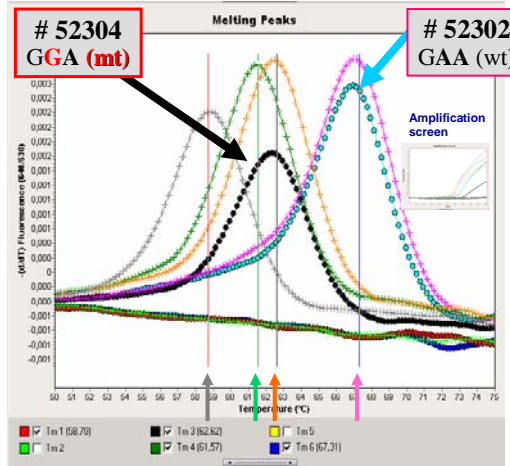
H. pylori
 Clari-Resistance
 28S rDNA

| Inc... | C... | P... | Name | CP |
|-------------------------------------|------|----------|-------|-------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1 | 52301 | Clari | 31,20 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2 | 52302 | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 3 | 52303 | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4 | 52304 | | 34,33 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 5 | AA | | 29,06 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 6 | AG | | 26,67 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 7 | GA | | 27,54 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 8 | AC | | 29,80 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 9 | neg.Kon. | | |



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.

INSTAND-C05_II/05



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL 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/09.2005

