



Regensburg, den 27. Oktober 2006

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 540)**

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find a cover letter in English on page 2 of this document and
tables with the results in a bilingual style after the discussion in German language.*

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

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 530 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 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.

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

SEPTEMBER 2006:

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 bzw. als grenzwertig positiv zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befinden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 62003, # 62102, und # 62103), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 62001), EHEC (Probe # 62401), *Legionella pneumophila* (Probe # 62601), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Proben # 63412 und # 63414). 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 prozentuellem 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)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 534: EHEC / STEC

Wie auch bereits bei den vorhergegangenen Runden dieses Ringversuchs mehrfach diskutiert, besteht die eigentliche Herausforderung bei dem Nukleinsäure-gestützten Nachweis von EHEC/STEC prinzipiell nicht so sehr in dem Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen, sondern vielmehr in der differenzierten Analyse und der Typisierung unterschiedlicher Shiga-Toxin Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin codierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin codierende *hlyA*-Gen) von entsprechenden Zielorganismen. Aus diesem Grund werden von uns bei der Probenkonfektionierung meist nicht nur klassische "Prototyp" EHEC-Stämme (wie z.B. O157:H7), sondern relativ willkürlich auch Routineisolate aus einer inzwischen sehr umfangreichen Sammlung von *stx*-positiven *E. coli* ausgewählt.

Da wir uns innerhalb des gesamten Ringversuchsprogramms jedoch nur gelegentlich und nicht regelmäßig auch mit einzelnen Proben an die derzeit technisch machbare untere Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns dabei sehr wohl bewusst, daß bei vielen Fragestellungen das "technisch machbare" nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem "diagnostisch sinnvollen" ist), wurden die drei positiven Proben des aktuellen Probensets (# 62401 und # 62404: *E. coli* O157:H7, *stx*₁-positiv, *stx*₂-positiv, *eae*- und *hlyA*-positiv; sowie # 62403; *E. coli* O26:H11, *stx*₁-positiv, *stx*₂-negativ, *eae*-positiv und *hlyA*-negativ) diesmal mit "nicht so ganz geringen" Mengen der entsprechenden Zielorganismen versetzt.

Offensichtlich stellte der gezielte Nachweis des mit ca. 1×10^4 CFU/ml in Probe # 62401 anwesende EHEC hier dennoch eine gewisse Herausforderung an die analytische Sensitivität der individuellen NAT-gestützten Testsysteme dar; diese Probe wurde nur von 49 der insgesamt 55 Teilnehmer als positiv befundet. Da in den meisten der teilnehmenden Laboratorien ein NAT-gestützter Nachweis von Shiga-Toxin Genen im Umfeld der EHEC-Diagnostik primär als Kulturbestätigungstest eingesetzt wird, werden bei zukünftigen Ringversuchen auch die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten, und der Schwerpunkt bleibt auf der Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze. Werden in bestimmten Laboratorien solche Nachweisverfahren jedoch auch zum gezielten Direktnachweis von EHEC in klinischem Untersuchungsmaterial oder in Lebensmittelproben eingesetzt, so sollten falsch-negative Ergebnisse bei der Probe # 62401 jedoch Anlaß zur Überprüfung und Optimierung des jeweiligen Testsystems geben.

Die beiden falsch-positiven Ergebnisse bei Probe # 62402 sind wohl am ehesten mit laborinternen Kontaminationsereignissen vereinbar. Abgesehen von den insgesamt erfreulich wenigen falsch-positiven oder -negativen Ergebnissen wurden bei den übrigen Proben hohe Richtigkeitsquoten erzielt. Die Mehrzahl der Teilnehmer verwendete dabei selbstentwickelte oder "andere" Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC, und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet. Lediglich 13 Teilnehmer gaben hier die Verwendung von kommerziellen NAT-Testsystemen für die Nukleinsäure-gestützte EHEC-Diagnostik an - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits nicht durchgehend spezifiziert.

Zudem wurden von 55 Teilnehmern die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben bei der Mehrzahl der Teilnehmer, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, korrekt.

**PCR-/NAT EHEC / STEC
 (RV 534) September 2006**



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

Gruppe A	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
62401	+	61 /71, 72, 77, 78	EHEC (~1x10 ⁴ CFU/mL) (O157:H7; <i>stx-1, stx-2, eae, hlyA</i>)
62402	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i>)
62403	++	61 /71, 77	EHEC (~5x10 ⁵ CFU/mL) (O26:H11; <i>stx-1, eae</i>)
62404	++	61 /71, 72, 77, 78	EHEC (~1x10 ⁵ CFU/mL) (O157:H7; <i>stx-1, stx-2, eae, hlyA</i>)

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

<i>n = 55</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	62401	62402	62403	62404		62401	62402	62403	62404
Befund Result									
Positiv	49 ¹⁾	2	54 ¹⁾	54 ¹⁾	n.d.	4	4	4	4
Negativ	4	53	0	1	nein no	51	51	51	51
Fraglich Questionable	2	0	1	0	ja yes	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>	%
In house PCR assay [28] (n = 42)	120	120 / 124 §	97	40	40 / 42	95
Other commercial tests [27] (n = 13)	37	37 / 38 §	97	13	13 / 13	100
Andere/ k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 3	67	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.

§ Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

Comments: ¹⁾ Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by **50 laboratories**. With the exception of 3 results for sample 62403, the reported results were correct.



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 09.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

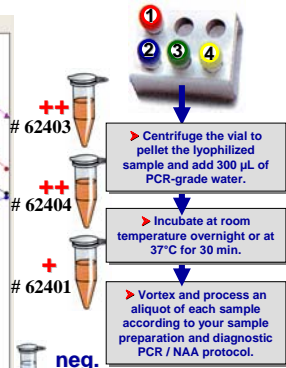
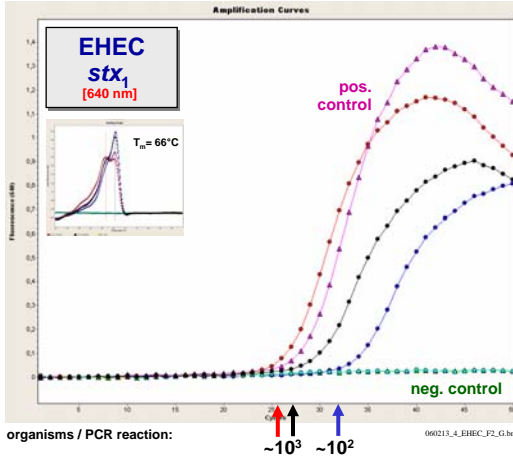
Reischl / Lehn / Wolf

5	Positive EHEC (347)	28,79
6	Negative control	34,00
7	62401	34,00
8	62402	27,01
9	62403	30,02
10	62404	30,02



LightCycler PCR protocol:

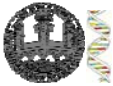
Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Sirockbine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



U. Reischl/RIMMH/09.2006



IN STAND-D03_II/06



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 09.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

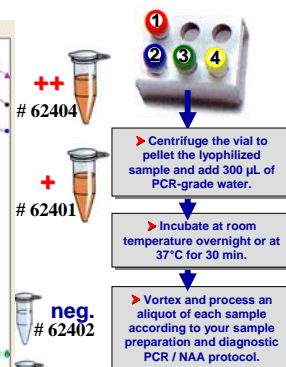
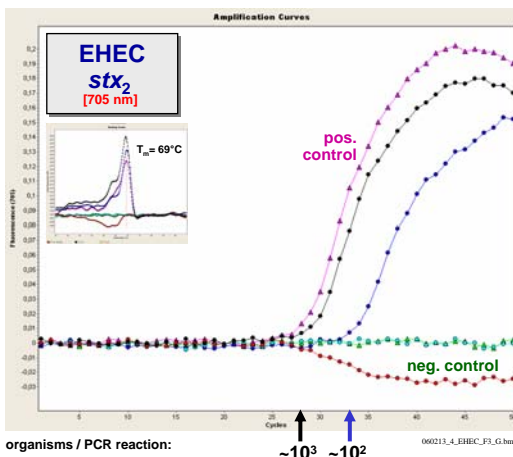
Reischl / Lehn / Wolf

5	Positive EHEC (347)	28,54
6	Negative control	33,51
7	62401	33,51
8	62402	29,28
9	62403	29,28
10	62404	29,28



LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Sirockbine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



U. Reischl/RIMMH/09.2006



IN STAND-D04_II/06



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 09.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

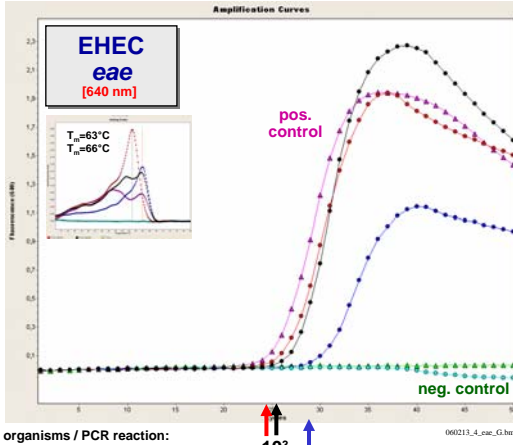
Reischl / Lehn / Wolf

15 Positive EHEC (347)	25,11
16 Negative control	30,29
17 62401	30,29
18 62402	25,98
19 62403	26,89
20 62404	26,89

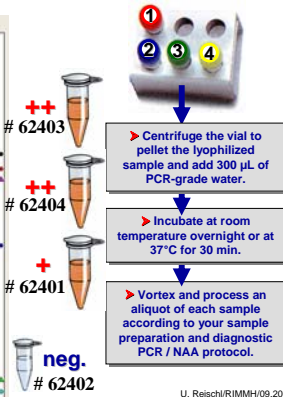


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



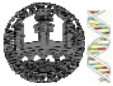
organisms / PCR reaction: $\sim 10^3$ $\sim 10^2$



U. Reischl/RIMMH/09.2006



IN STAND-D05_II/06



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC

status 09.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

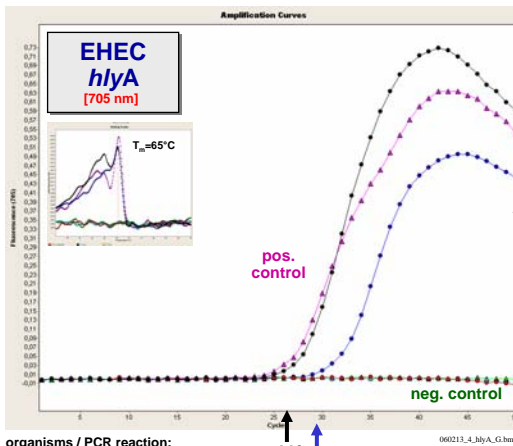
Reischl / Lehn / Wolf

25 Positive EHEC (347)	28,61
26 Negative control	33,53
27 62401	33,53
28 62402	33,53
29 62403	29,24
30 62404	29,24

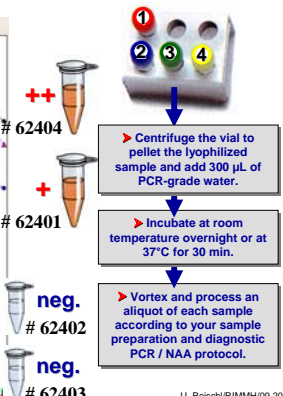


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^3$ $\sim 10^2$



U. Reischl/RIMMH/09.2006



IN STAND-D06_II/06