



Regensburg, den 31. Mai 2007

**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 the next page of this document and  
tables with the results 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 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](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 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](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. Um unser Spektrum an respiratorischen Pathogenen sinnvoll zu erweitern, werden wir im Laufe dieses Jahres (voraussichtlich im Zuge der kommenden Ringversuchsrunde im September 2007) einen sogenannten Probe-Ringversuch **RV 541 "Mycoplasma pneumoniae"** anbieten. Interessierte Laboratorien können sich bereits im Vorfeld bei INSTAND e.V. für eine Teilnahme anmelden - es wird in der ersten Runde nur eine limitierte Anzahl von Probensets verfügbar sein. Bei erfolgreichem Verlauf soll dieser neue Ringversuch zusammen mit den bereits etablierten Ringversuchen für *Chlamydia pneumoniae* und *Legionella pneumophila* als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen werden. Damit wäre der weltweit erste regelmäßige Ringversuch für den gezielten Nachweis von *Mycoplasma pneumoniae* DNA verfügbar und das sog. "CAP-Panel", zumindest bezüglich der bakteriellen Erreger, für die ein NAT-gestützter Nachweis in vielen Fällen sinnvoll sein kann, weitgehend abgedeckt.

Die Konzeption und Auswertung des neuen *Mycoplasma pneumoniae*-spezifischen Ringversuchs erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit **Herrn Professor Jacobs** vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden.

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

### APRIL 2007:

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* (Probe # 71102), *Bordetella pertussis* (Probe # 71207), *Helicobacter pylori* (Probe # 71304), EHEC (Probe # 71407), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 71502), *Legionella pneumophila* (Probe # 71606), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 71411). 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 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) 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 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 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 kommerziellen PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "[www.udo-reischl.de](http://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 540: *Chlamydia pneumoniae***

Auch hier eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Chlamydia pneumoniae* aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *C. pneumoniae* etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal je eine Probe mit etwas höherer Menge an Zielorganismen (# 71412; *C. pneumoniae*,  $\sim 5 \times 10^3$  IFU/ml), eine mit relativ geringer Menge (# 71411; *C. pneumoniae*,  $\sim 5 \times 10^2$  IFU/ml), eine Probe ohne Zielorganismen (# 71413; nur *E. coli*), sowie eine Probe mit einer relativ hohen Menge eines anderen respiratorischen Pathogens (# 71414; *Legionella pneumophila*,  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/ml).

Wie auch schon in den beiden vorhergegangenen Ringversuchen zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA aufgezeigt. Während nahezu alle Teilnehmer die Zielorganismen in der Probe # 71412 sicher nachweisen konnten, so gelang dies bei der Probe # 71411 nur noch 64 der insgesamt 72 Teilnehmer. Erfreulicherweise wurden bei den beiden negativen Proben # 71413 und # 71414 diesmal nur je 2 falsch-positive Ergebnisse berichtet, was für ein überraschend bzw. erfreulich gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen spricht. Die falsch-positiven Ergebnisse bei den "negativen" Proben sollten jedoch den entsprechenden Teilnehmern Anlaß geben, ihre DNA Extraktionsprotokolle und/oder ihre PCR-gestützten Testsysteme auf gewisse Mängel hinsichtlich der Kontaminationssicherheit zu überprüfen.

Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 71411 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen.

Bis auf 12 Teilnehmer haben alle selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde dabei lediglich bei einem Teilnehmer und hier bei allen der versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs beobachtet (?).

Aufgrund des leider noch relativ geringen Anteils und der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen.

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der analytischen Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen im Rahmen dieses Ringversuchs mit der Probe # 71411 wiederum zahlreiche Sets an standardisierten Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

**PCR-/NAT *Chlamydia pneumoniae*  
 (RV 540) April 2007**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected |    | Probenzusammensetzung / Sample composition                     |
|----------|---------------------|----|----------------------------------------------------------------|
| 71411    | (+)                 | 61 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 5x10 <sup>2</sup> IFU/mL)       |
| 71412    | +                   | 61 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 5x10 <sup>3</sup> IFU/mL)       |
| 71413    | ∅                   | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12                                    |
| 71414    | ∅                   | 62 | <i>Legionella pneumophila</i> SG2 (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL) |

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

| n = 72                   | Probennummer (Sample no.) |       |       |       |            | Inhibition |       |       |       |
|--------------------------|---------------------------|-------|-------|-------|------------|------------|-------|-------|-------|
|                          | 71411                     | 71412 | 71413 | 71414 |            | 71411      | 71412 | 71413 | 71414 |
| Befund<br>Result         |                           |       |       |       |            |            |       |       |       |
| Positiv                  | 64                        | 70    | 2     | 2     | n.d.       | 4          | 4     | 4     | 4     |
| Negativ                  | 7 <sup>1)</sup>           | 1     | 69    | 69    | nein<br>no | 67         | 67    | 67    | 67    |
| Fraglich<br>Questionable | 1 <sup>1)</sup>           | 1     | 1     | 1     | ja<br>yes  | 1          | 1     | 1     | 1     |

**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<br>[Code] (total number *) | NAT richtig positiv<br>True positive results |                     |     | NAT richtig negativ<br>True negative results |                     |     |
|----------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------|-----|----------------------------------------------|---------------------|-----|
|                                        | Absolut<br>Absolute                          | Relativ<br>Relative | %   | Absolut<br>Absolute                          | Relativ<br>Relative | %   |
| In house PCR assay [28] (n = 58)       | 115                                          | 115 / 116           | 99  | 114                                          | 114 / 116           | 98  |
| Other commercial tests [27] (n = 12)   | 24                                           | 24 / 24             | 100 | 22                                           | 22 / 24             | 92  |
| Andere / k.A. / other [29] (n = 2)     | 2                                            | 2 / 2 <sup>§</sup>  | 100 | 2                                            | 2 / 2 <sup>§</sup>  | 100 |

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

**Comments:** <sup>1)</sup> 7 of the 72 participants reported negative results for **sample # 71411**. Due to the **low number of target organisms**, we have not rated them as "false-negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

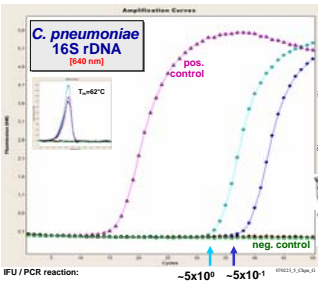
**540 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia pneumoniae*** 04.2007  
 Reischl / Lehn / Wolf

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

- 1 71411 37,82
- 2 71412 32,66
- 3 71413
- 4 71414
- 5 Positive C.pneum 15,51
- 6 Negative control



**LightCycler PCR protocol:**  
 Reischl, U., N. Lehn, U. Simascher, & Mann, and A. Escriu (2003) Rapid and standardized detection of Chlamydia pneumoniae using LightCycler real-time fluorescence PCR. Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28:14-17.



# 71412  
 +  
 # 71411  
 (+)  
 # 71413  
 neg.  
 # 71414  
 neg.

U. Reischl/IMA/104.2007  
 Regensburg

- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lysophilized 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.