



Regensburg, den 21. Dezember 2008

**An die Teilnehmer  
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT  
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 541)**

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a cover letter and a brief discussion (NEW !) of the current results after the corresponding sections in German language. As usual, tables with the results are presented 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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs**

December 22, 2008

To the participants of the  
INSTAND-Proficiency Test in  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 541)

**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.instandev.de](http://www.instandev.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. 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. **New in 2008:** due to the growing number of international participants, we will further include a brief discussion of the results in English (see the following pages).

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).

If you should have any further questions, please do not hesitate to contact me by e-mail: "[udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de](mailto:udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de)"

With best personal regards,



**PD 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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs**

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

### NOVEMBER 2008:

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 Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 82002), EHEC (Proben # 82401, # 82402), MRSA (Probe # 82902), *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila pneumoniae* (Probe # 82412), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 82424). 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 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. ([www.instandev.de](http://www.instandev.de)) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem geschätzten Kollegen Herrn Dr. Christoph Schoerner, Erlangen, für seine zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

### **RV 536: *Legionella pneumophila***

Aufgrund zahlreicher Anfragen hier eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Legionella pneumophila* aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Einzelne Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets können daher typischerweise auch relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. 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 *L. pneumophila* etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal zwei positive Proben: Probe # 82602 wurde mit einer relativ hohen Menge von ca.  $10^6$  CFU/ml an *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 versetzt, die auch von allen der insgesamt 59 Teilnehmer als positiv befundet wurde. Die Probe # 82601 des aktuellen Sets enthielt eine etwa hundertfach geringere Menge an Zielorganismen (ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL *L. pneumophila*), die erfreulicherweise ebenfalls von allen Teilnehmern mit den entsprechenden NAT-gestützten Testsystemen zuverlässig nachgewiesen werden konnte.

Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzuprüfen, enthielt eine der 4 Proben (# 82603) diesmal eine nennenswerte Menge (ca.  $10^5$  CFU/mL) an *Legionella bozemanii* (vormals: *L. bozemanii*), was bei der Mehrzahl der Teilnehmer erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen führte. Nur bei 7 der insgesamt 59 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurde hier dreimal die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR Protokolls sowie von einem Teilnehmer die Verwendung eines kommerziellen Testsystems mit dem *mip* Gen als *L. pneumophila*-spezifische Zielsequenzen angegeben. Da sich *Legionella bozemanii* zumindest auf Ebene der 16S rDNA Sequenz jedoch in zahlreichen Nukleotidpositionen von *L. pneumophila* unterscheidet, sollten hier von den entsprechenden Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis die Annealingbedingungen sowie die Hybridisierungsregionen der verwendeten Primer und/oder Sonden überprüft und gegebenenfalls nachgebessert werden.

Die "negative" Probe # 82604, die im aktuellen Probenstet lediglich ein Isolat von *E. coli* enthielt, wurde von nahezu allen Teilnehmern als negativ befundet. Lediglich bei 3 der insgesamt 59 Teilnehmer hatten hier vermutlich Kontaminationsereignisse während der individuellen Probenaufarbeitung stattgefunden oder die analytische Spezifität der eingesetzten Testsysteme war schlichtweg unzureichend.

Kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial kamen bei 9 Teilnehmern zum Einsatz - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits im Auswertungsbogen nicht durchgehend spezifiziert.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Aqua Screen *L. pneumophila* Detection Kit (1x), TibMolbiol LightMix *Legionella* (2x), LCD Array Kit (1x), Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x) und AID CAP Bac Kit (1x). Auch das in dieser Ringversuchsserie erstmals aufgeführte (und seit kurzem auch kommerziell verfügbare) *L. pneumophila*-spezifische BD ProbeTec Testsystem wurde von einem Teilnehmer verwendet. Damit konnten alle 4 Proben dieses Ringversuchs korrekt analysiert und detektiert werden. Es wird auch weiterhin interessant sein zu verfolgen, inwieweit sich im Laufe der nächsten Ringversuchsrunden Unterschiede in der analytischen Sensitivität von selbstentwickelten und kommerziellen Testsystemen abzeichnen. Von den übrigen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (*in house*) NAT Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet, und von keinem der Teilnehmer wurden vermeintliche Inhibitionereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

**RV 536: *Legionella pneumophila***

The current set of QC samples contained two positive samples. A relatively high amount of *L. pneumophila* serogroup 1 ( $\sim 1 \times 10^6$  CFU/mL) was present in sample # 82602 - and a hundredfold lower amount of *L. pneumophila* serogroup 1 ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) was present in sample # 82601. Both samples were tested positive by all of the 59 participating laboratories and no false-negative results were observed.

Sample # 82603 of the current set contained  $\sim 1 \times 10^5$  *Legionella bozemanæ* organisms per mL and false-positive results were reported from only 7 participating laboratories (presumably due to some cross-contamination events or a lack of analytical specificity in the corresponding PCR-based assays). Only three false-positive results were observed for the "negative" sample # 82604; this may also be caused by some contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection. Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed .

## PCR-/NAT *Legionella pneumophila* (RV 536) November 2008



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
82601	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
82602	+++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
82603	∅	62	<i>Legionella bozemanae</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
82604	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 59	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	82601	82602	82603	82604		82601	82602	82603	82604
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	59	59	7	3	n.d.	2	2	2	2
<b>Negativ</b>	0	0	52	56	nein <i>no</i>	57	57	57	57
<b>Fraglich</b> <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 = 47)	<b>94</b>	94 / 94	<b>100</b>	<b>87</b>	87 / 94	<b>93</b>
BD ProbeTec Legionella [26] (n = 1)	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>
Other commercial tests [27] (n = 9)	<b>18</b>	18 / 18	<b>100</b>	<b>15</b>	15 / 18	<b>83</b>
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>

\* 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.*



## 536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila* status 11.2008

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

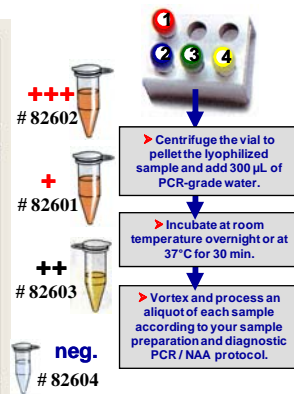
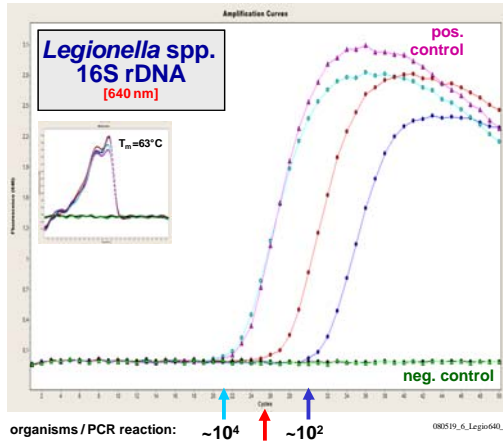
Reischl / Linde / Wolf

13	82601	30.48
14	82602	21.78
15	82603	26.68
16	82604	
17	Pos. Contr. Leprn	22.12
18	NTC	



#### LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., H.-J. Linde, N. Lehn, O. Landt, K. Barrat, and N. Wellinghausen (2002). Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40:3814-3817



INSTAND-F03\_II/08



## 536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila* status 11.2008

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

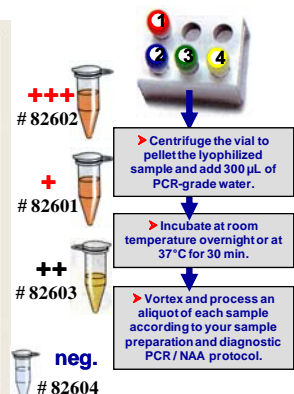
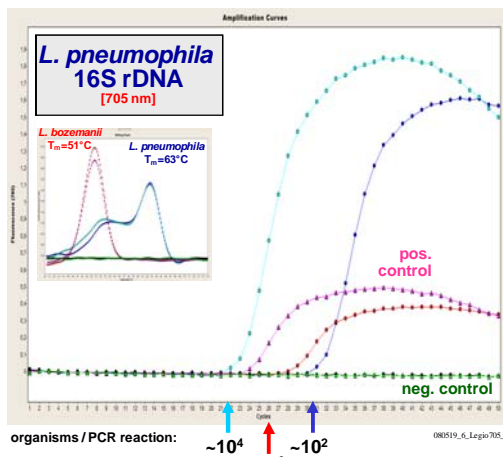
Reischl / Linde / Wolf

13	82601	30.48
14	82602	21.82
15	82603	26.81
16	82604	
17	Pos. Contr. Leprn	22.47
18	NTC	



#### LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., H.-J. Linde, N. Lehn, O. Landt, K. Barrat, and N. Wellinghausen (2002). Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40:3814-3817



INSTAND-F04\_II/08



**536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila*** status 11.2008

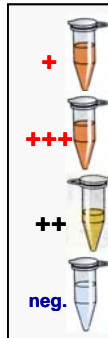
➤ **Evaluation** (qualitative PCR):

Reischl / Linde / Wolf

**Becton Dickinson  
 ProbeTec *Legionella pneumophila***

<u>Probennummer</u>	<u>LP</u>
82601	⊕+
82602	⊕+
82603	⊖
82604	⊖

Legio BD



- 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.

