



Regensburg, den 11. Dezember 2009

**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 in English on the following pages of this document. As always, result tables are depicted 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 beigegeführten 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, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

December 11, 2009

To the participants of the
INSTAND external quality assessment scheme (EQAS)
for NAATs in Diagnostic Bacteriology
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 sheme for external quality assessment (EQAS) 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", 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 (spring and autumn), 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 quality control and 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. **New in 2009:** 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 EQAS scheme 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"

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, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Eine kurze Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir werden im Laufe des Jahres je einen sog. **Proberingversuch** für den Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis* anbieten. Als Sollwertlabor wird hier das Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart fungieren. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen. Sollten Sie Interesse an der Teilnahme an diesem "Proberingversuch" mit limitierter Anzahl von entsprechenden Probensets haben, so bitten wir Sie um kurze Mitteilung an den Ringversuchsleiter (udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de).

NOVEMBER 2009:

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: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 92001, 92004, sowie die drei schwach positiven Proben des RV 531), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 92003), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 92504), *Salmonella enterica* (Probe # 92701), sowie cMRSA (Probe # 92903). 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 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; 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 kommerzieller PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

RV 540: *Chlamydia (Chlamydophila) 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* DNA** 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* DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 92414; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ IFU/ml), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 92411; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml), eine Probe mit sehr geringer Menge (# 92413; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 92412; nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen).

Wie auch schon in 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 eindrucksvoll aufgezeigt. Während erfreulicherweise alle Teilnehmer die Zielorganismen in der Probe # 92414 und alle bis auf 2 Teilnehmer die Zielorganismen in der Probe # 92411 sicher nachweisen konnten, so gelang dies bei der Probe # 92413 nur noch 57 der insgesamt 73 Teilnehmer. Hier nähern wir uns also wieder einmal der klassischen Konstellation nahe der unteren Nachweisgrenze von diagnostischen NAT-Testkonzepten, bei der sowohl die sogenannte *limit of detection* (LOD) der von den Teilnehmern eingesetzten Testkonzepte als auch die statistische Verteilung der infizierten Zellen bzw. der Zielorganismen innerhalb des zu untersuchenden Probenmaterials zum Tragen kommen. Denn diese 60:40 Ergebnislage kann durch eine ungleichmäßige Verteilung der wenigen *C. pneumoniae* Genome in den pipettierten Aliquots der resultierenden DNA-Präparation und/oder durch die Verwendung von Testsystemen mit unterschiedlich guten analytischen Sensitivitäten begründet sein. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 92413 wurden die mitgeteilten Ergebnisse nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. In der entsprechenden Tabelle 2 der Ringversuchsauswertung ist dies auch durch die beiden grau schattierten Felder für positive und negative Ergebnisse grafisch gekennzeichnet.

Erfreulicherweise wurde bei der negativen Probe # 92412 diesmal nur ein falsch-positives Ergebnis berichtet, was für ein überraschend gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen spricht. Solche falsch-positiven Ergebnisse bei den "negativen" Proben sollten jedoch von den entsprechenden Teilnehmern zum Anlaß genommen werden, ihre DNA Extraktionsprotokolle und/oder ihre NAT-gestützten Testsysteme auf gewisse Mängel hinsichtlich der Kontaminationsicherheit zu überprüfen.

Bis auf 51 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 bei den vier versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs wurde dabei von keinem der 72 Teilnehmer 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. Das in dieser Ringversuchsserie mit einer eigenen Codenummer aufgeführte und seit kurzem auch kommerziell verfügbare

LightMix *C. pneumoniae* real-time PCR Testsystem der Fa. TIB Molbiol, Berlin, wurde diesmal von 4 Teilnehmern verwendet. Mit diesem kommerziellen Testsystem konnten die Teilnehmer alle 4 Proben dieses Ringversuchs korrekt analysieren und detektieren – und die Richtigkeitsquote für das LightMix *C. pneumoniae* real-time PCR Testsystem liegt somit bei 100 %.

Unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (5x), GenProof CHP (1x), Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit der Fa. Euroclone (1x), BD ProbeTec *C. trachomatis* (2x), CHLPD-LC von PIIM (1x), AmpliSens *C. pneumoniae* Kit (1x), Argene Chlamylege (1x), Immundiagnostik (1x) und DYNEX Pneumoplex (1x).

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der analytischen Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen im Rahmen dieses Ringversuchs (vor allem mit der Probe # 92413 als "analytische Herausforderung") wiederum zahlreiche Sets an standardisierten Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Brief discussion of the current EQAS results in English:

RV 540: *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. pneumoniae* in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory materials. So the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components. As a consequence, diagnostic assays designed for *C. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *C. pneumoniae* infected cells in individual samples of the QC set.

The current set of QC samples contained three samples positive for *C. pneumoniae* in a kind of dilution series. Sample # 92414 was spiked with a relatively high number of *C. pneumoniae* target organisms (~1x10⁶ IFU/ml). Sample # 92411 contained an approximately hundredfold lower number of *C. pneumoniae* (~1x10⁴ IFU/ml), sample # 92413 contained a very low amount of *C. pneumoniae* (~1x10³ IFU/ml), and "negative" sample # 92412 contained no target organisms but only *E. coli* and non-infected human cells.

As depicted in table 2, no false-negative results were observed for the strongly positive sample # 92414 and only 2 false-negative results were observed for the hundredfold weaker positive sample # 92411. Only one participant reported a false-positive result for the negative sample # 92412 (which could be due to intralaboratory contamination event). Interestingly, a considerable number of the participating laboratories failed to detect the target organisms in the weak-positive sample # 92413. Sixteen out of 73 participants were obviously not able to detect the low amount of target organisms with their individual *C. pneumoniae*-specific PCR/NAT assays. In agreement with the previous rounds of our EQAS scheme for direct detection of *C. pneumoniae* DNA, it seems that we have touched the lower limit of detection again for several commercial and *in-house* PCR assays with ~1x10³ IFU/ml of *C. pneumoniae*. So (false) negative results for the latter sample were not scored in the course of issuing the corresponding QC certificates.

**PCR-/NAT *Chlamydia pneumoniae*
 (RV 540) November 2009**



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

Gruppe A	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
92411	++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
92412	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
92413	+	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
92414	+++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁶ IFU/mL)

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

<i>n</i> = 73	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	92411	92412	92413	92414		92411	92412	92413	92414
Befund <i>Result</i>									
Positiv	71	1	57	73	n.d.	1	1	1	1
Negativ	2	72	16 ¹⁾	0	nein <i>no</i>	72	72	72	72
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>	%
LightMix <i>C.pneumoniae</i> [21] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	100
Other commercial tests [27] (n = 17)	45	45 / 51	88	17	17 / 17	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 51)	141	141 / 153	92	50	50 / 51	98
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100

Comments: ¹⁾ 16 of the 73 participants reported negative results for sample # 92413. Due to the low number of target organisms, we have not rated them as "false-negative", but the corresponding participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.



540 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia pneumoniae* status 11.2009

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

1	92411	30,60
2	92412	
3	92413	33,75
4	92414	23,11
5	Pos. Ko. Ch. pneumoniae	24,76
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., N. Lehn, U. Sinnacher, R. Marre, and A. Essig (2003) Rapid and standardized detection of *Chlamydia pneumoniae* using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21:54-57.

