



Regensburg, den 28. April 2005

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438)**

Dear Participant, dear Colleague,
Please find a cover letter in English on page 11 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

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. Daher wird das derzeitige Panel an erregerspezifischen Ringversuchen um "*Chlamydia pneumoniae*" und "MRSA bzw. cMRSA" (sog. community-associated Methicillin-resistente *S. aureus*) erweitert.

Die Konzeption und Auswertung der *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen Ringversuche erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Maaß, Universität Lübeck, 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.

Die Konfektionierung entsprechenden Probenmaterials ist bereits abgeschlossen und alle an unserer Ringversuchsreihe teilnehmenden Laboratorien werden demnächst von INSTAND e.V. ein Anmeldeformular für die Teilnahme an einem probeweisen Ringversuch bekommen.

Einen erfolgreichen Ablauf dieser Prototyp-Ringversuche vorausgesetzt, werden sie dann ab 2006 als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen.

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 zusätzlichen 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

MÄRZ 2005:

Nachdem in der vorhergegangenen Runde dieser Ringversuchs-Serie (September 2004) 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 nochmal 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 unter anderem 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 # 51101), EHEC (Probe # 51402), *L. pneumophila* (Probe # 51604), *Salmonella typhimurium* (Probe # 51702), sowie *L. monocytogenes* (Probe # 51801). 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 diesen 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.

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 436: *Legionella pneumophila*

Ein möglichst sensitiver und spezifischer Nachweis von *Legionella pneumophila* ist sowohl im Rahmen der mikrobiologischen Patientendiagnostik als auch im Bereich umwelthygienischer Untersuchungen (Wasseranalytik) von besonderem Interesse. **Anmerkung:** auch wenn im Rahmen dieses Ringversuchs aus formellen und auswertungstechnischen Gründen (Zielorganismus ist *L. pneumophila*) die Anwesenheit von non-pneumophila Legionellenspezies im Untersuchungsgut als negativ zu befunden ist (Code [62]), können einige dieser Spezies sehr wohl von humanpathogener Relevanz sein.

Die relativ hohe Menge an Zielorganismen und die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme führte zumindest bei positiven Probe # 51603 (*L. pneumophila*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml) und der negativen Probe # 51602 zu hohen Richtigkeitsquoten innerhalb des Teilnehmerfeldes.

Um im Rahmen dieses Ringversuchs die diagnostische Situation mit manch schwach-positivem klinischem Probenmaterial widerzuspiegeln, wurde auch diesmal eine der Proben (# 51604) mit einer sehr geringen Menge an *L. pneumophila* versetzt ($\sim 5 \times 10^2$ CFU/ml). Im Vergleich zur schwach positiven Probe des vorhergegangenen Ringversuchs im September 2004 lag die effektive Menge an Zielorganismen somit noch einmal um eine Zehnerpotenz niedriger. Bei dieser schwach-positiven Probe konnten zumindest noch 10 der insgesamt 42 Teilnehmer *L. pneumophila* DNA nachweisen. Abgesehen von den hohen Anforderungen an die untere Nachweisgrenze von NAT-gestützten *Legionella*-spezifischen Testsystemen im Umfeld der Wasseranalytik kann auch im Umfeld der Humandiagnostik bei den betroffenen Patienten die Menge an *Legionella* DNA in geeignetem klinischen Probenmaterial (BAL, Urin, o.ä.) erfahrungsgemäß stark variieren - und in Einzelproben auch sehr gering sein.

Auch wenn für die Erteilung der entsprechenden Zertifikate ein falsches Ergebnis innerhalb des Probensatzes ja prinzipiell toleriert wird und negative Ergebnisse bei der Probe # 51604 aufgrund der sehr geringen Menge an Zielorganismen im aktuellen Ringversuch in diesem Zusammenhang nicht als "falsch-negativ" bewertet wurden, so stellt ein falsch-negatives Ergebnis bei Probe # 51603 jedoch einen relativ deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar. Und selbst wenn dieser Ringversuch seitens INSTAND e.V. als "bestanden" zertifiziert wird, so sollte es dem verantwortungsbewußten Laborleiter dennoch Anlaß geben, sein jeweiliges NAT-Testsystem zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren. Nebenbei bemerkt gaben die beiden Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für Probe # 51603 die Verwendung eines Block-Cycler PCR-Protokolls mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte an.

Eine der Proben (# 51601) des aktuellen Sets enthielt diesmal eine nennenswerte Menge an *Legionella jordanis*, was erfreulicherweise bei der Mehrzahl der Teilnehmer nicht zu falsch-positiven Ergebnissen führte. Nur bei 5 der insgesamt 42 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten NAT-Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurde hier jeweils die Verwendung von ribosomalen Zielsequenzen aufgeführt.

Kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial kamen bei 5 der 42 Teilnehmer zum Einsatz - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits im Auswertungsbogen nicht näher spezifiziert. Von den übrigen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (*in house*) NAT Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet und von keinem der Teilnehmer wurden vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 430 to 438)

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" within the next few months.

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

PCR-/NAT *Legionella pneumophila* (RV 436) März 2005



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
51601	∅	62	<i>Legionella jordanis</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
51602	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
51603	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
51604	(+)	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 5x10 ² CFU/mL)

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

n = 42	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	51601	51602	51603	51604		51601	51602	51603	51604
Befund <i>Result</i>									
Positiv	5 ¹⁾	1	40	10	n.d.	2	2	2	2
Negativ	36	41	2	32 ²⁾	nein <i>no</i>	40	40	40	40
Fraglich <i>Questionable</i>	1	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 = 37)	46 ²⁾	46 / 74	62	68 ¹⁾	68 / 74	81
Other commercial tests [27] (n = 5)	4	4 / 10	40	10	10 / 10	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:

¹⁾ Five of the 42 participants reported a false-positive result for sample # 51601 (*L. jordanis*). This could be due to a "simple" cross-contamination event and/or a cross-reactivity of the primer and probe sequences of the "*L. pneumophila*-specific" PCR assays (all of the 5 participants indicated the use of a ribosomal gene as target sequence).

²⁾ Thirty-two of the 42 participants reported a false-negative result for **sample # 51604**, which **contained a low number of target organisms**. The large portion of negative results is due to a lack of analytical sensitivity of the corresponding PCR assays.

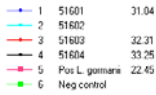


436 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila*

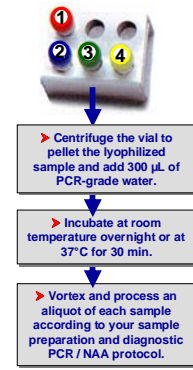
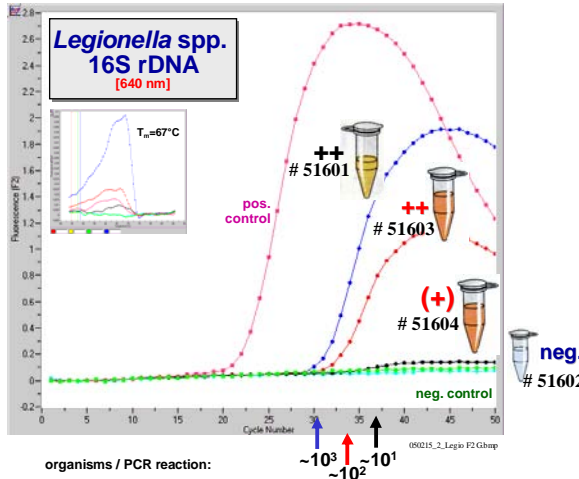
status 04.2005

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., H.-J. Linde, N. Lehn, O. Landt, K. Barratt, 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



U. Reischl/RMMH-04.2005



INSTAND-F03_I/05

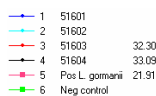


436 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila*

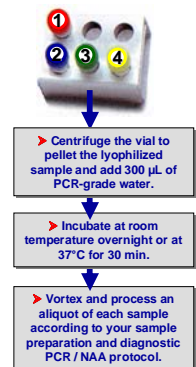
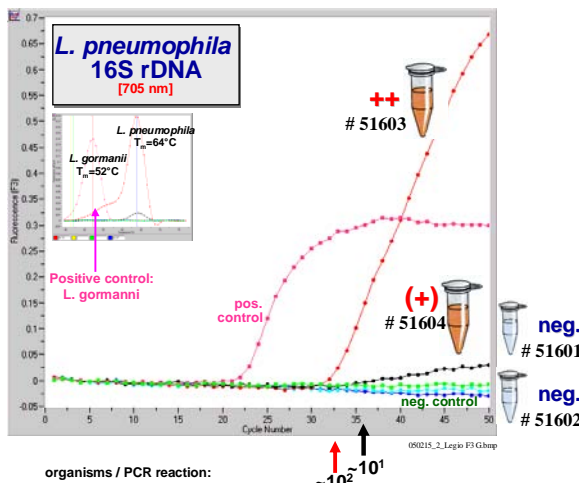
status 04.2005

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., H.-J. Linde, N. Lehn, O. Landt, K. Barratt, 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



U. Reischl/RMMH-04.2005



INSTAND-F04_I/05