



INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE
MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE

UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIREKTOR: PROF. DR. HANS WOLF

WHO Collaborating Centre
for Research and Control of
Virus-associated Cancers



WHO Collaborating Centre
for Reference and Research
on Viral Hepatitis



PD DR. UDO REISCHL, TEL: (0941) 944-6450 FAX: -6402

MOLEKULARE DIAGNOSTIK

Regensburg, den 31. Mai 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 15 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

AKTUELLE HINWEISE:

Nach dem sehr erfolgreichen Verlauf der initialen "Probe-Ringversuche" wurden RV 539 "MRSA bzw. cMRSA" (sog. *community-associated* Methicillin-resistente *S. aureus*) und RV 540 "*Chlamydia pneumoniae*" nun als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen. Die Konzeption und Auswertung der *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen Ringversuche erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Maaß vom Universitätsklinikum Salzburg, der hier auch als Ringversuchsleiter fungiert.

Ab der aktuellen Ringversuchsreihe zum "Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken" werden die einzelnen Ringversuche bei INSTAND e.V. aus organisatorischen Gründen jetzt der 500er-Nummerngruppe zugeordnet. Die entsprechenden Ringversuchsnummern (ehemals RV 430 bis RV 438) ändern sich dann wie folgt: RV 430 > RV 530; RV 431 > RV 531; u.s.w. Wir bitten dies bei der Anmeldung zu beachten.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2006:

Nachdem in einigen der vorhergegangenen Runden dieser Ringversuchs-Serie vorwiegend Proben mit relativ hoher Keimzahl versandt wurden, wird bei der Konzeption des aktuellen und der zukünftigen Ringversuche zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) bei einigen Zielorganismen auch der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets an Rückstellproben enthalten u.a. 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 # 52101), *B. pertussis* (Probe # 52204), EHEC (Probe # 52401), *L. pneumophila* (Probe # 52603), *L. monocytogenes* (Probe # 52801), MRSA (Probe # 52903), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 52411). 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.

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). 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 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)" als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 536: *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.

Nachdem im vorhergegangenen Ringversuch noch eine Probe mit sehr geringer Menge an Zielorganismen versandt wurde führte diesmal die relativ hohe Menge an Zielorganismen und die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme zumindest bei der relativ stark positiven Probe # 61601 (*L. pneumophila*, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml) und der negativen Probe # 61604 zu hohen Richtigkeitsquoten innerhalb des Teilnehmerfeldes. Um im Rahmen dieses Ringversuchs die diagnostische Situation mit manch schwach-positivem klinischem Probenmaterial widerzuspiegeln, wurde eine der vier Proben (# 61602) mit einer etwas geringeren, jedoch bei weitem nicht als grenzwertig zu betrachtenden Menge an *L. pneumophila* versetzt ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml). Bei dieser Probe konnten lediglich 40 der insgesamt 45 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.

Daher lässt ein falsch-negatives Ergebnis bei der Probe #61602 dieses Ringversuchs durchaus auf eine unzureichende analytische Sensitivität des eingesetzten Testsystems bzw. auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion schließen. Selbst wenn dieser Ringversuch seitens INSTAND e.V. als "bestanden" zertifiziert wird (ein falsches Ergebnis wird ja bekanntlich toleriert), so sollte es dem verantwortungsbewußten Laborleiter dennoch Anlaß geben, sein jeweiliges NAT-Testsystem zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Eine der Proben (# 61603) des aktuellen Sets enthielt diesmal eine nennenswerte Menge an *Legionella hackeliae*, was in der überweigenden Mehrzahl erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen führte. Nur bei 7 der insgesamt 45 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurden hier von 6 Teilnehmern die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR Protokolls (4 Teilnehmer) sowie eines TaqMan PCR Protokolls und eines Block-Cycler Protokolls mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte angegeben (jeweils ein Teilnehmer).

Kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial kamen bei 4 Teilnehmern 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.

**PCR-/NAT *Legionella pneumophila*
 (RV 536) April 2006**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
61601	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 5x10 ⁵ CFU/mL)
61602	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
61603	∅	62	<i>Legionella hackeliae</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
61604	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 45	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	61601	61602	61603	61604	61601	61602	61603	61604	
Befund Result									
Positiv	45	40	7 ¹⁾	1	n.d.	1	1	1	1
Negativ	0	5	36	44	nein no	44	44	44	44
Fraglich Questionable	0	0	2 ²⁾	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 40)	76	76 / 80	95	71 ¹⁾	71 / 78	91
Other commercial tests [27] (n = 4)	8	8 / 8	100	7	7 / 8	88
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	1	1 / 2	50	2	2 / 2	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.

Comments: ¹⁾ Seven and two of the 45 participants reported a false-positive and a questionable result respectively for sample # 61603 (*L. hackeliae*). 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 (6 of the 9 participants indicated the use of a ribosomal gene as target sequence, two indicated the use of an commercial assay, and one indicated the use of other target gene).

²⁾ One of the participants reported a positive PCR result for the real-time PCR (TaqMan-format) and a negative PCR result for the real-time PCR (LightCycler).

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



536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila*

status 04.2006

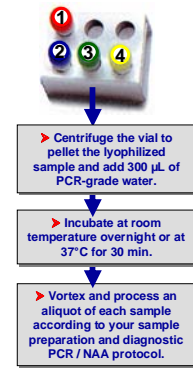
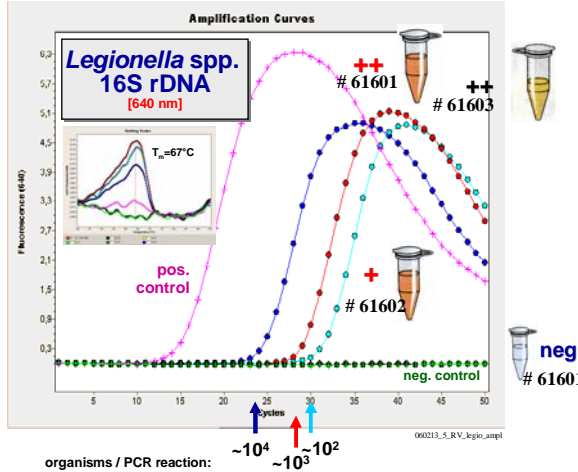
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

1	RV 61601	23,59
2	RV 61602	30,50
3	RV 61603	27,96
4	RV 61604	
5	Pos <i>L.gormanii</i>	14,57
6	Neg control	



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/04.2006



INSTAND-F03_I/06



536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila*

status 04.2006

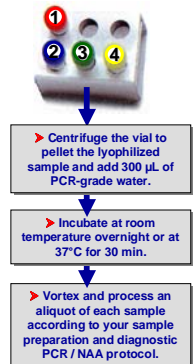
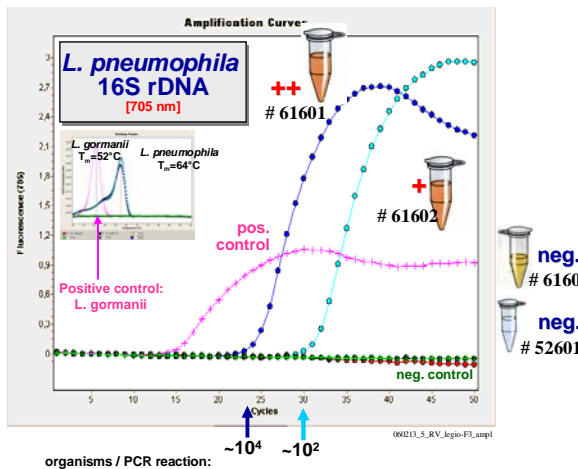
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

1	RV 61601	23,31
2	RV 61602	30,22
3	RV 61603	
4	RV 61604	
5	Pos <i>L.gormanii</i>	13,86
6	Neg control	



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/04.2006



INSTAND-F04_I/06