



**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", 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

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 prozentualen 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"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. 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 Untersuchungsmaterial als "negativ" zu befunden ist, können einige dieser Spezies sehr wohl von humanpathogener Relevanz sein. So wurden *Legionella dumoffii* und *Legionella jordanis*, die im aktuellen Ringversuch jeweils in einer der 4 Proben versandt wurden, in vielen Fällen als kausatives Agens bei mitunter dramatisch verlaufenden Legionellosen identifiziert (Outbreak of travel-related pontiac fever among hotel guests illustrating the need for better diagnostic tests. J Travel Med., 2005, 12:173-179, bzw.: Legionnaires' disease caused by *Legionella dumoffii* in distilled water, Canadian Medical Association Journal, 1986, 135:1274-1277).

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben der **Gruppe A** enthielt diesmal zwei positive Proben:

Probe # 71601 wurde mit einer relativ hohen Menge von ca. 10^6 CFU/ml an *Legionella pneumophila* versetzt, die von allen der insgesamt 39 Teilnehmer auch als positiv befundet wurde. Probe # 71603 dieses Sets enthielt eine deutlich geringere Menge von ca. 10^3 CFU/ml an *L. pneumophila*, die lediglich noch bei 27 der 39 Teilnehmer mit den entsprechenden NAT-gestützten Testsystemen zuverlässig nachgewiesen werden konnten. 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 manchen Einzelproben auch sehr gering sein. Daher lässt ein falsch-negatives Ergebnis bei der Probe # 71603 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 (1 falsches Ergebnis wird ja in der Regel toleriert), so sollte es dem verantwortungsbewußten Laborleiter dennoch Anlaß geben, sein jeweiliges NAT-Testsystem zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Wie bereits zuvor erwähnt enthielt eine der 4 Proben in Gruppe A (# 71602) diesmal eine nennenswerte Menge an *Legionella dumoffii*, was bei der Mehrzahl der Teilnehmer erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen führte. Nur bei 3 der insgesamt 39 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurde hier zweimal 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 jordanis* 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 ggf. nachgebessert werden.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben der **Gruppe B** enthielt ebenfalls zwei positive Proben: Probe # 71607 wurde mit einer etwas höheren Menge von ca. 10^4 CFU/ml an *Legionella pneumophila* versetzt, die von allen der insgesamt 16 Teilnehmer auch als positiv befundet wurde. Probe # 71606 dieses Sets enthielt eine relativ geringe Menge von ca. 10^2 CFU/ml an *L. pneumophila*, die erfreulicherweise noch mit den NAT-Testsystemen von 6 der 16 Teilnehmer zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der geringen Menge an Zielorganismen wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die Probe # 71606 hier nicht als "falsch-negativ" bewertet. Innerhalb der 4 Ringversuchsproben der Gruppe B befand sich diesmal

eine Probe (# 71605) die mit *Legionella jordanis* versetzt worden war, was bei der überwiegenden Mehrzahl der Teilnehmer erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen führte. Nur bei 2 der insgesamt 16 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurden hier von beiden Teilnehmern die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR bzw. Block Cycler Protokolls angegeben.

Kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial kamen bei 8 Teilnehmern zum Einsatz - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits im Auswertungsbogen nicht durchgehend spezifiziert. 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 Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

**PCR-/NAT *Legionella pneumophila*
 (RV 536) April 2007, Group A**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
	Erwartet	Erwartet	
71601	+++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG2 (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
71602	∅	62	<i>Legionella dumoffii</i> (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
71603	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG5 (~ 1x10 ³ CFU/mL)
71604	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 39	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	71601	71602	71603	71604		71601	71602	71603	71604
Befund <i>Result</i>									
Positiv	39	3 ¹⁾	27	1	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	36	11	38	nein <i>no</i>	39	39	39	39
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	1	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 = 31)	53	53 / 61 §	87	59 ¹⁾	59 / 62	95
Other commercial tests [27] (n = 6)	10	10 / 12	83	11	11 / 12	92
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	3	3 / 4	75	4	4 / 4	100

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

Comments: ¹⁾ Three of the 39 participants reported a false-positive result for sample # 71602 (*L. dumoffii*). 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.

PCR-/NAT *Legionella pneumophila* (RV 536) April 2007, Group B



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

Gruppe B	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
	Erwartet	Erwartet	
71605	∅	62	<i>Legionella jordanis</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
71606	(+)	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 ² CFU/mL)
71607	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
71608	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 16	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	71605	71606	71607	71608		71605	71606	71607	71608
Befund Result									
Positiv	2 ¹⁾	6	16	3	n.d.	1	1	1	1
Negativ	14	9 ²⁾	0	13	nein no	15	15	15	15
Fraglich Questionable	0	1	0	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	%
In house PCR assay [28] (n = 14)	27	27 / 27 [§]	100	23 ¹⁾	23 / 28	82
Other commercial tests [27] (n = 2)	4	4 / 4	100	4	4 / 4	100

[§] Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

Comments: ¹⁾ Two of the 16 participants reported a false-positive result for sample # 71605 (*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 (both participants indicated the use of a ribosomal gene as target sequence).

²⁾ 9 of the 16 participants reported negative results for **sample # 71606**. 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.

