



Regensburg, den 23.5.2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a brief discussion (NEW !) of the current results in English after the German version on the following pages. As usual, tables with the results are 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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

May 23, 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", 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", 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"

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 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 bzw. als grenzwertig positiv zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 81101), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 81003), *Helicobacter pylori* (Probe # 81304), EHEC (Probe # 81402), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 81504), *Legionella pneumophila* (Probe # 81604), *Salmonella enterica* (Probe # 81704), *Listeria monocytogenes* (Probe # 81803), sowie *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila) pneumoniae* (Probe # 81412). 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. **Rückstellprobensätze können bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden.**

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. (www.instandev.de) 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.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wollten wir mit den 3 positiven Proben eine Art Verdünnungsreihe des Zielorganismus *L. pneumophila* abbilden. Daher enthielt Probe # 81603 diesmal eine relativ hohe Menge an *L. pneumophila* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), die auch von 58 der insgesamt 60 Teilnehmer als positiv getestet wurde. Probe # 81601 enthielt mit $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Mit ca. 1×10^3 CFU/mL *L. pneumophila* pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 81604 diesmal eine relativ geringe Menge der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde auch diese schwach-positive Probe von 50 der insgesamt 60 Teilnehmer als "positiv" und von einem Teilnehmer als "fraglich" klassifiziert. 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 # 81604 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.

Die "negative" Probe # 81602, die im aktuellen Probenstet lediglich eine nennenswerte Menge eines *E. coli* Isolats enthielt, wurde von nahezu allen Teilnehmern als negativ befundet. Lediglich bei 2 der insgesamt 60 Teilnehmer hatten hier offensichtlich 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 10 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: Minerva ONAR Lp-QP (2x), TibMolbiol LightMix Legionella (1x), Argene Chlamydege-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 Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

Brief discussion of the current results (English version) for the growing number of international participants:

RV 536: *Legionella pneumophila*

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of the corresponding target organism. A relatively high amount of *L. pneumophila* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 81603 - and it was tested positive by 58 of the 60 participating laboratories. Sample # 81601 contained $\sim 1 \times 10^4$ *L. pneumophila* organisms per mL (detected by 57 participants). Sample # 81604, which contained a very low amount of target organisms ($\sim 1 \times 10^3$ organisms per mL), was reported positive by 50 of the 60 participating laboratories. Only two false-positive results were observed for the "negative" sample # 81602 (presumably caused by cross-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.

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
81601	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
81602	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
81603	+++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
81604	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 ³ CFU/mL)

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

n = 60	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	81601	81602	81603	81604		81601	81602	81603	81604
Befund Result									
Positiv	57	2	58	50	n.d.	1	1	1	1
Negativ	3	58	2	9 ¹⁾	nein no	59	59	59	59
Fraglich Questionable	0	0	0	1	ja yes	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
In house PCR assay [28] (n = 50)	137	137 / 149 [§]	92	49	49 / 50	98
BD ProbeTec Legionella [26] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100
Other commercial tests [27] (n = 9)	25	25 / 27	93	8	8 / 9	89
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	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.

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

Comments: ¹⁾ Nine of the 60 participants reported negative results for sample # 81604. As target organism numbers around 10³/mL can definitely be expected with typical clinical specimens, the corresponding participants should consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila* status 04.2008

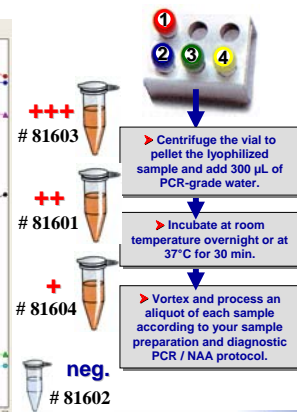
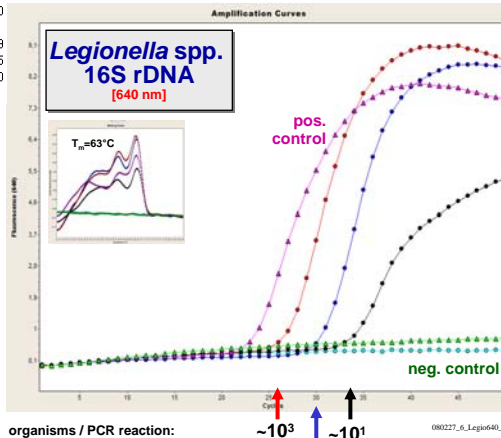
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

- 7 81601 29,60
- 8 81602 25,99
- 9 81603 32,55
- 10 81604 22,20
- 11 pos. Ko. Legio
- 12 NTC



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



INSTAND-F03_I/08



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila* status 04.2008

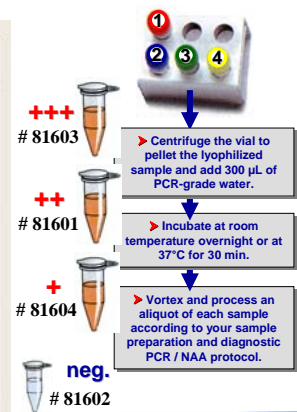
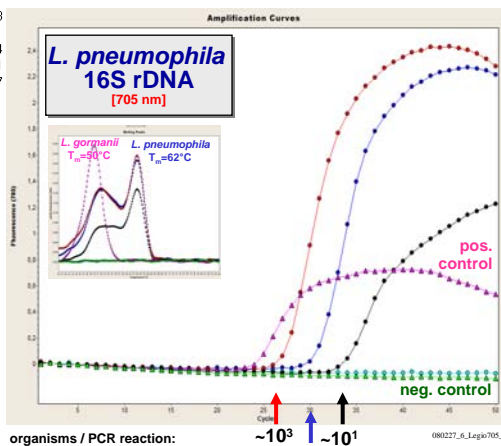
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

- 7 81601 29,48
- 8 81602 25,94
- 9 81603 32,11
- 10 81604 22,47
- 11 pos. Ko. Legio
- 12 NTC



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



INSTAND-F04_I/08