



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 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 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 541: *Mycoplasma pneumoniae*

Nach der erfolgreichen Durchführung der Proberingversuche im letzten Jahr wurde der Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Mycoplasma pneumoniae* nun in unser reguläres Programm aufgenommen. Er ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Mycoplasma pneumoniae* aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Da NAT-gestützte Verfahren zum Direktnachweis geringer Mengen an *Mycoplasma pneumoniae* aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterial vor allem zur differentialdiagnostischen Abklärung respiratorischer Infektionen zunehmend an Aktualität gewinnen, sind bereits einige Testsysteme bzw. Testkits kommerziell verfügbar. Deren Verwendung wird im Zuge dieses Ringversuchs auch systematisch abgefragt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt können aber noch keine grundlegenden Bewertungen hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität von individuellen Testkonzepten getroffen werden und die in der Tabelle 3 dargestellten Zahlenwerte haben noch eher einen orientierenden Charakter.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt je eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 81424; *M. pneumoniae*, $\sim 10^5$ Genomkopien/mL), eine mit etwas geringerer Menge (# 81422; *M. pneumoniae*, $\sim 10^4$ Genomkopien/mL), eine ohne Zielorganismen (# 81421; nur *E. coli*), sowie eine Probe mit relativ hoher Menge an einer mit dem Zielorganismus verwandten Spezies (# 81423; *Mycoplasma genitalium*, $\sim 10^6$ Genomkopien/mL).

Auch wenn es sich hier um einen neu eingeführten Ringversuch handelt und die Erfahrungswerte aus früheren Ringversuchsrunden noch fehlen, so zeigt die Auswertung der Ergebnisse bereits relativ deutlich auf, daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *M. pneumoniae* DNA mit einer Menge von ca. $\sim 10^3$ Genomkopien pro NAT-Reaktionsansatz noch nicht ganz erreicht zu sein scheint. So konnten 68 der insgesamt 69 Teilnehmer die *M. pneumoniae* DNA in den beiden positiven Proben problemlos und zuverlässig nachweisen. Zudem wurden, bis auf eine Ausnahme, bei der negativen Probe # 81421 von den 69 Teilnehmern keine falsch-positiven Ergebnisse berichtet, was bei den meisten der teilnehmenden Laboratorien für ein gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen spricht.

Auch für die Probe # 81423 (*Mycoplasma genitalium*) wurde von der Mehrzahl der Teilnehmer ein richtig-negatives Ergebnis berichtet. Bei 11 der insgesamt 69 Teilnehmer hatten hier Kontaminationsereignisse während der individuellen Probenaufarbeitung stattgefunden. Wahrscheinlicher ist jedoch (da die Proben mit *E. coli* DNA negativ blieben), dass Testsysteme mit eher mangelhafter Spezifität hinsichtlich der erfassten Spezies eingesetzt wurden. Ein falsch-positives Ergebnis bei dieser Probe läßt daher durchaus auf eine unzureichende Spezifität 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. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Qiagen/Artus *M.pneumoniae* LC-PCR kit (7x), Minerva Venor Mp (5x), Argene Chlamylege-Kit (1x), "Fa. GenID" (1x) und AID CAP Bac Kit (1x).

Hier noch ein kurzer **Kommentar von Herrn Prof. Dr. Enno Jacobs und Herrn Dr. Roger Dumke** (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden, Konsiliarlaboratorium für Mykoplasmen) bezüglich der in diesem Ringversuch beobachteten Kreuzreaktionen: Aufgrund der teilweise ausgeprägten Sequenzhomologien zwischen *Mycoplasma pneumoniae* und *Mycoplasma genitalium* innerhalb verschiedener Gene sei darauf verwiesen, dass die Auswahl der Primer für den Nachweis von *M. pneumoniae* besondere Sorgfalt erfordert.

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

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

The current set of QC samples also contained a kind of dilution series of the corresponding target organism. Sample # 81424 contained a relatively high number of *M. pneumoniae*-infected cells ($\sim 10^5$ genome copies/mL), one sample contained a tenfold lower amount of target cells (# 81422; *M. pneumoniae*, $\sim 10^4$ genome copies/mL), one sample contained no *M. pneumoniae*-infected cells (# 81421; only *E. coli*), and sample # 81423 contained high numbers of the related species *Mycoplasma genitalium* ($\sim 10^6$ genome copies/mL). Eleven of the 69 participants reported a false-positive result for sample # 81423 (*M. genitalium*) - this could be due to a "simple" cross-contamination event or (more likely) a cross-reactivity of the primer and probe sequences of the individual "*M. pneumoniae*-specific" PCR assays. With exception of the latter sample, a very good diagnostic performance was observed for the *M. pneumoniae*-specific PCR assays used by the 69 participants

**PCR-/NAT *Mycoplasma pneumoniae*
 (RV 541) April 2008**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
81421	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12
81422	+	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 ⁴ genome copies/mL)
81423	Ø	62	<i>Mycoplasma genitalium</i> (~ 10 ⁶ genome copies/mL)
81424	++	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 ⁵ genome copies/mL)

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

n = 69	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	81421	81422	81423	81424		81421	81422	81423	81424
Befund Result									
Positiv	1	68	11 ¹⁾	68	n.d.	1	1	1	1
Negativ	68	1	58	1	nein no	68	68	68	68
Fraglich Questionable	0	0	0	0	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 = 48)	94	94 / 96	98	84	84 / 96	88
Commercial assay / kit [27] (n = 17)	34	34 / 34	100	34	34 / 34	100
LightMix <i>M.pneumoniae</i> [20] (n = 2)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100

Comments: ¹⁾ Eleven of the 69 participants reported a false-positive result for sample # 81423 (*M. genitalium*). This could be due to a "simple" cross-contamination event or (more likely) a cross-reactivity of the primer and probe sequences of the "*M. pneumoniae*-specific" 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>



541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 09.2008

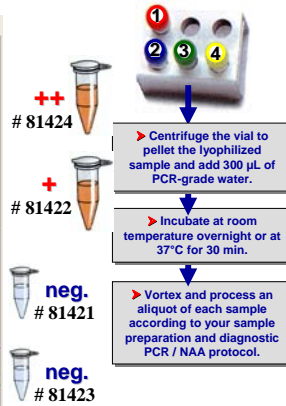
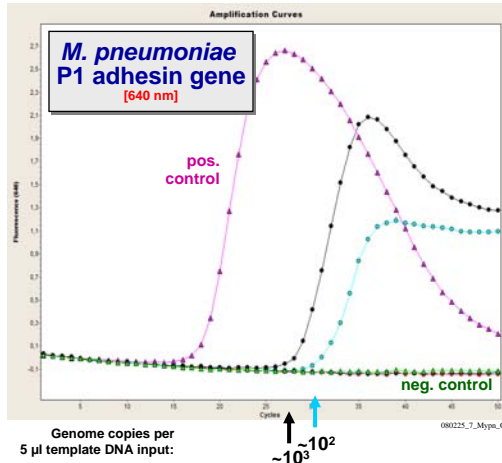
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf / Jacobs

1	81421	29,80
2	81422	
3	81423	
4	81424	27,50
5	pos. Ko. M. pneumoniae 16.93	
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 In-house LightCycler protocol based on:
 Sharma et al. (1998) Detection and
 Confirmation of *Mycoplasma pneumoniae*
 in Urogenital Specimens by PCR. JCM
 36:277-280.



INSTAND-K03_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>



541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 09.2008

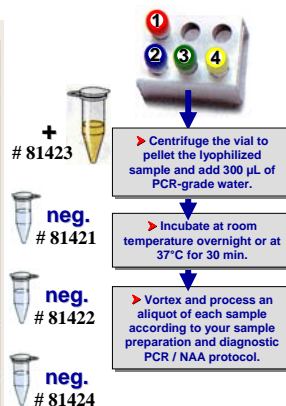
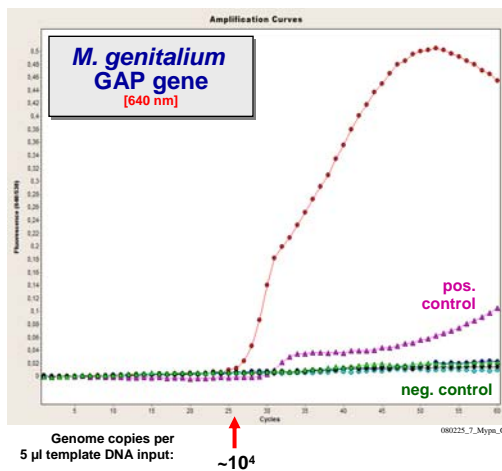
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf / Jacobs

1	81421	25,57
2	81422	
3	81423	
4	81424	
5	pos. Ko. M. genitalium 27,81	
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol
 (Reischl, U., Regensburg).



INSTAND-K04_I/08



541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 09.2008

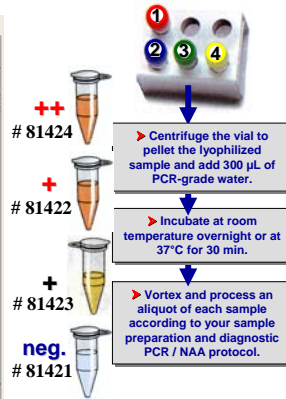
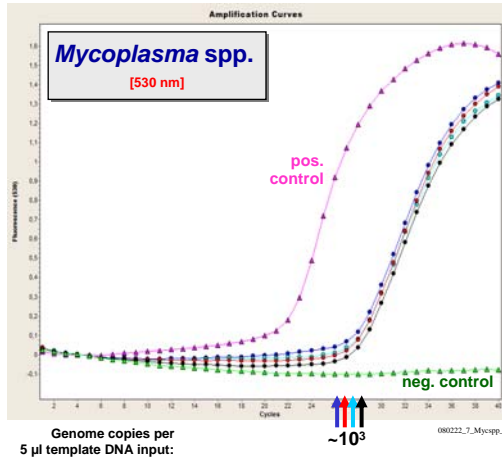
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf / Jacobs

1	81421	26,98
2	81422	26,35
3	81423	26,35
4	81424	27,00
5	pos. Ko. Mycoplasma ZK	20,77
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol
 (Reischl, U., Regensburg).



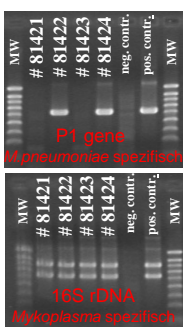
IN STAND-K05_I/08



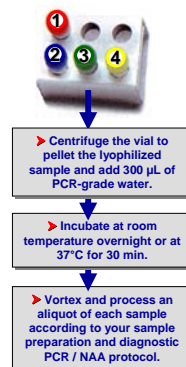
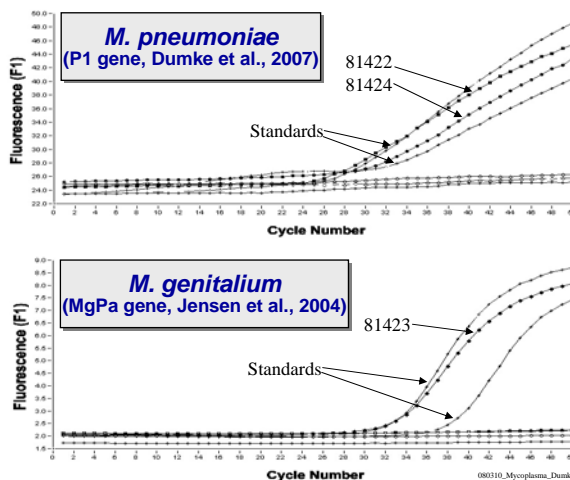
541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 09.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf / Jacobs



Data kindly provided by
 Dr. Roger Dumke
 Institut für Medizinische Mikrobiologie
 und Hygiene, TU Dresden, Germany



IN STAND-K06_II/08