



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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 20-26 of this document. As always, result tables are depicted 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 mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Erfreulicherweise waren die Kommentare in den letzten sieben Jahren überwiegend positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

June 8, 2010

To the participants of the
INSTAND external quality assessment scheme (EQAS)
for NAATs in Diagnostic Bacteriology
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., Düsseldorf, Germany (attached to this letter).

This highly desired sheme for external quality assessment (EQAS) 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 (spring and autumn), 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 quality control and 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 since 2009:** 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 EQAS scheme 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,



PD 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. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 11 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder zwei „highlights“: zum einen wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 531 wieder die **schwedische Chlamydienvariante (nvCT)** ausgesandt und zum anderen befand sich der **sog. Züricher Drogenstamm** in einer der 4 Proben des MRSA Ringversuchs RV 539.

Eine weitere Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir beschäftigen uns gerade mit der Konfektionierung und Herstellung eines Proberingversuchs für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis*. Eine limitierte Anzahl von entsprechenden Probensets wird voraussichtlich im Rahmen der kommenden Ringversuchsrunde im November 2010 für interessierte Teilnehmer verfügbar sein. Als Sollwertlabor fungieren hier die Kollegen Dr. D. Frangoulidis und Dr. W. Splettstösser vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen.

Übrigens: das **REMMDI 2011** wird vom **14.-16. April 2011** wieder in Regensburg stattfinden. Diesen Termin eventuell schon mal vormerken... Nähere Informationen finden Sie demnächst unter www.remmdi.de

APRIL 2010:

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 Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 1015303, 1015304, sowie die schwach positive Probe des RV 531 # 1015314), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1015303), *Bordetella pertussis* (Probe # 1015324), *Helicobacter pylori* (Probe # 1015334), *Borrelia afzelii* (Probe # 1015352), *Legionella pneumophila* (Probe # 1015363), sowie *Listeria monocytogenes* (Probe # 1015381). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 1015313 dieser Ringversuchsrunde. 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 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; 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 kommerzieller PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

RV 536: *Legionella pneumophila*

Aufgrund zahlreicher Anfragen hier eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die **Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Legionella pneumophila*** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Einzelne Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets können daher typischerweise auch relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila* DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine relativ stark positive Probe # 1015362, die mit einer Menge von ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* Serogruppe 3 versetzt war und auch von 76 der insgesamt 77 teilnehmenden Laboratorien als positiv befundet wurde. Der Teilnehmer mit negativem NAT-Ergebnis für diese Probe sollte sein Testsystem wohl umgehend überprüfen. Die „negative“ Probe # 1015361, die im aktuellen Probenstet neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli* enthielt, wurde erfreulicherweise von allen 77 Teilnehmern durchgehend als negativ befundet. Die Proben # 1015364 und # 1015363 des aktuellen Sets enthielten eine etwa zehnfach bzw. hundertfach geringere Menge an Zielorganismen ($\sim 10^4$ CFU/mL und $\sim 10^3$ CFU/mL *L. pneumophila* Serogruppe 3), die zumindest in der Probe # 1015364 noch von 68 der insgesamt 77 Teilnehmer mit ihren NAT-gestützten Testsystemen zuverlässig nachgewiesen werden konnten. Lediglich 8 Teilnehmer berichteten bei dieser etwas schwächer positiven Probe ein falsch-negatives NAT-Ergebnis. Diese Teilnehmer mit negativem Ergebnis für diese Probe sollten versuchen, die analytische Sensitivität der jeweils eingesetzten Probenaufbereitungsverfahren und/oder Testsysteme zu überprüfen und nachzubessern.

Mit ca. 10^3 *L. pneumophila* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1015363 diesmal eine relativ geringe Menge an Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 50 der insgesamt 77 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet. Ähnlich wie bei einer vergleichbaren Probe mit ca. 10^3 CFU/mL an *L. pneumophila* aus dem Ringversuch im April 2008 (die damals auch von ca. zwei Drittel der Teilnehmer erfolgreich detektiert werden konnte) kann die Ergebniskonstellation mit dieser gering konzentrierten Probe als Hinweis darauf angesehen werden, daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensystemen für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA mit einer Menge von ca. 10^3 Organismen/mL im Probenmaterial erreicht zu sein scheint.

Hinweis des Ringversuchsleiters: Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei 20 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Leider wurden von den Teilnehmern die Hersteller der entsprechenden Testkits im Auswertungsbogen nicht durchgehend spezifiziert. Neben dem BD ProbeTec Testsystem wurden hier im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TibMolbiol LightMix *Legionella* (3x), GeneProof LP PCR detection Kit (2x), *L. pneumophila* Q-PCR Alert Kit von Nanogen (2x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (2x), Minerva Onar Lp *L. pneumophila* (2x), Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (2x), Test Kit LEGD-LC von PIIM (2x), Qiagen artus *L. pneumophila* LC PCR Kit (1x), Argene Chlamyge (1x) und SureFood BAC *L. pneumophila* (1x).

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 77 Teilnehmer wurde bei dem aktuell versandten Probenstet ein vermeintliches Inhibitionsereignis bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

ENGLISCH:

RV 536: *Legionella pneumophila*

The current set of QC samples contained three positive samples: a high amount of *L. pneumophila* serogroup 3 ($\sim 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1015362, an approximately tenfold lower amount ($\sim 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1015364, and an approximately hundredfold lower amount ($\sim 10^3$ CFU/mL) was present in sample # 1015363. With the exception of one false-negative result for sample # 1015362 and eight false-negative results for sample # 1015364, these two samples were tested positive by all of the 77 participating laboratories. As expected, a higher number of false-negative results were observed with sample # 1015363, which contained a low amount of target organisms ($\sim 10^3$ CFU/mL). We have not scored a (false) negative result for the very weak positive sample in the course of issuing the corresponding QC certificates. However, colleagues who have missed this particular sample but are aiming at a very high analytical performance should consider to improve the sensitivity and/or check the species coverage of their individual assay concepts. As no false-positive result was observed for the "negative" sample # 1015361, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

PCR-/NAT *Legionella pneumophila* (RV 536) April 2010



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
1015361	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1015362	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1015363	(+)	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ³ CFU/mL)
1015364	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)

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

n = 77	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1015361	1015362	1015363	1015364		1015361	1015362	1015363	1015364
Befund <i>Result</i>									
Positiv	0	76	50	68	n.d.	1	1	1	1
Negativ	77	1	26 ¹⁾	8	nein <i>no</i>	76	76	76	76
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	1	1	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>	%
BD ProbeTec Legionella [26] (n = 1)	2	2 / 3	67	1	1 / 1	100
Other commercial tests [27] (n = 25)	59	59 / 73 §	81	25	25 / 25	100
In house PCR assay [28] (n = 50)	130	130 / 150	87	50	50 / 50	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	6	6 / 6	100	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

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

Comments: ¹⁾ Twenty six of the 77 participants reported negative results for sample # 1015363. 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.



536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila* status 04.2010

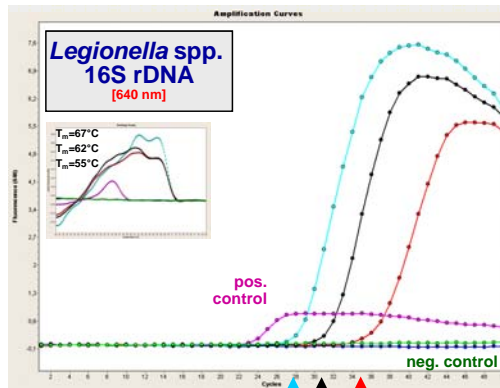
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

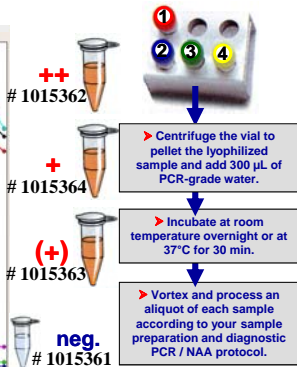
13	1015361	
14	1015362	27,60
15	1015363	36,00
16	1015364	30,68
17	Pos. Ko. Legionella	21,22
18	NTC	



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



organisms / PCR reaction: $\sim 10^3$, $\sim 10^2$, $\sim 10^1$



INSTAND-F03_I/10



536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila* status 04.2010

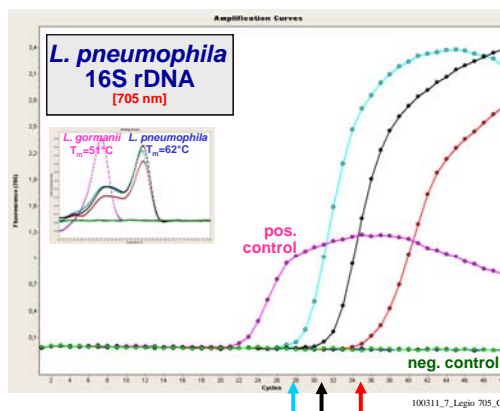
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

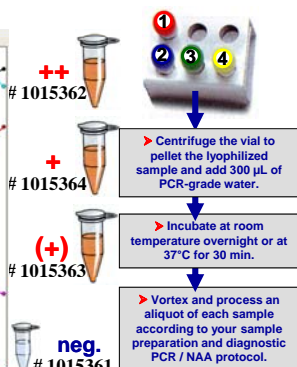
13	1015361	
14	1015362	27,64
15	1015363	35,82
16	1015364	30,61
17	Pos. Ko. Legionella	21,06
18	NTC	



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



organisms / PCR reaction: $\sim 10^3$, $\sim 10^2$, $\sim 10^1$



INSTAND-F04_I/10