



Regensburg, den 21. Dezember 2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion (NEW !) of the current results after the corresponding sections in German language. As usual, tables with the results are presented 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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

December 22, 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,



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. 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

NOVEMBER 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 Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 82002), EHEC (Proben # 82401, # 82402), MRSA (Probe # 82902), *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila pneumoniae* (Probe # 82412), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 82424). 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.

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. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem geschätzten Kollegen Herrn Dr. Christoph Schoerner, Erlangen, für seine zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

RV 540: *Chlamydia (Chlamydomphila) pneumoniae*

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

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: eine mit 5×10^3 IFU/mL an *C. pneumoniae* Zielorganismen (# 82414), eine mit etwa doppelter Menge (# 82412; *C. pneumoniae*, $\sim 10^4$ IFU/mL), eine ohne Zielorganismen (# 82413; nur *E. coli*), sowie eine Probe mit 1×10^4 CFU/mL an *Legionella pneumophila*.

Wie auch schon in einigen der vorhergegangenen Ringversuche zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und teilweise bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Während alle bis auf 6 Teilnehmer die relativ geringe Menge an Zielorganismen in der Probe # 82414 noch sicher nachweisen konnten, so gelang dies bei der sehr gering konzentrierten Probe # 82412 nur noch 45 der insgesamt 64 Teilnehmer. Bei einer Menge von 10^3 IFU/mL an *C. pneumoniae* Zielorganismen (entspricht ca. 10^2 IFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessiertem Probenvolumen von 100 μ l) nähern wir uns offensichtlich erneut der unteren Nachweisgrenze der entsprechenden Testsysteme an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 82412 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.

Erfreulicherweise wurden sowohl bei der negativen Probe # 82413 als auch bei der Probe mit *L. pneumophila* (# 82411) nur jeweils 4 falsch-positive Ergebnisse berichtet, was für ein erfreulich gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen und hinreichender Spezifität der verwendeten Testsysteme spricht. Die falsch-positiven Ergebnisse bei den "negativen" Proben sollten jedoch den entsprechenden Teilnehmern Anlaß geben, ihre DNA Extraktionsprotokolle und/oder ihre PCR-gestützten Testsysteme auf gewisse Mängel hinsichtlich der Kontaminationssicherheit zu überprüfen.

Bis auf 46 Teilnehmer haben alle selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde dabei lediglich bei einem Teilnehmer und hier auch nur bei einer der vier versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs beobachtet. Aufgrund des leider noch relativ geringen Anteils und der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Immundiagnostik MutaReal (2x), TibMolbiol LightMix *Chlamydia pneumoniae* (4x), GenProof CHP (2x), und Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit der Fa. Euroclone (1x).

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der analytischen Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen im Rahmen dieses Ringversuchs (vor allem mit der Probe # 82412) wiederum zahlreiche Sets an standardisierten Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

RV 540: *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*

The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae* and one sample with *Legionella pneumophila* organisms (sample # 82411). Sample # 82414 contained a low number of *C. pneumoniae* (approximately 5×10^4 IFU/ml), sample # 82412 contained a five times lower amount of *C. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), and "negative" sample # 82413 contained no target organisms but only *E. coli* cells. As depicted in table 2, only a few false-positive and false-negative results were observed for samples # 82411, # 82414, and negative sample # 82413. Interestingly, a considerable number of the participating laboratories failed to detect the target organisms in the weak-positive sample # 82412. In agreement with the previous rounds of our QC initiative for direct detection of *C. pneumoniae* DNA, it seems that we have touched the lower limit of detection for several commercial and *in-house* PCR assays with $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml of *C. pneumoniae*. So we have not scored a negative result for the latter sample in the course of issuing the corresponding QC certificates.

**PCR-/NAT *Chlamydia pneumoniae*
 (RV 540) November 2008**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
82411	∅	62	<i>Legionella pneumophila</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
82412	+	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
82413	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
82414	++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 5x10 ³ IFU/mL)

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

n = 64	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	82411	82412	82413	82414		82411	82412	82413	82414
Befund <i>Result</i>									
Positiv	4	45	4	58	n.d.	1	1	1	1
Negativ	60	18	60	5	nein <i>no</i>	63	62	63	63
Fraglich <i>Questionable</i>	0	1	0	1	ja <i>yes</i>	0	1	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>	%
In house PCR assay [28] (n = 47)	77	77 / 92 §	84	89	89 / 94	95
Other commercial tests [27] (n = 15)	22	22 / 30	73	27	27 / 30	90
Andere / k.A. / other [29] (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⁾ Eighteen of the 64 participants reported negative results for sample # 82412. Due to the low number of target organisms, we have not rated them as "false-negative", but the corresponding participants may 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>



540 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia pneumoniae* status 11.2008

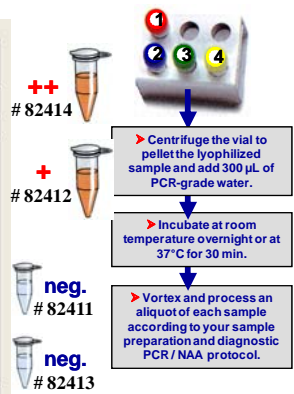
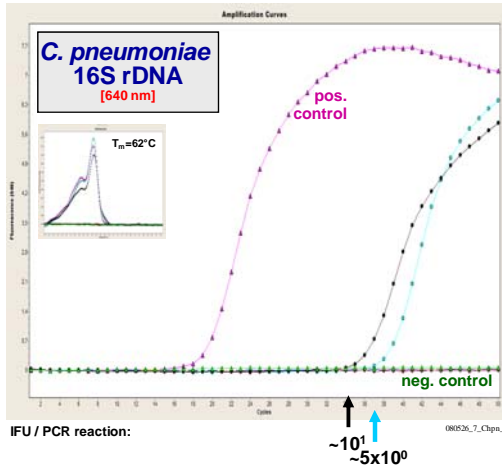
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

1	82411	
2	82412	37,46
3	82413	
4	82414	34,90
5	pos. Ko. Chl. pneumoniae	18,17
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., N. Lehn, U. Sinnacher, R. Marre, and A. Essig (2003) Rapid and standardized detection of *Chlamydia pneumoniae* using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21:54-57.



INSTAND-J03_II/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>



540 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumoniae* status 11.2008

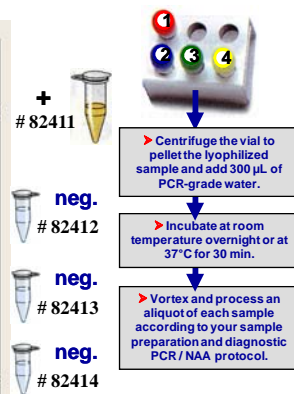
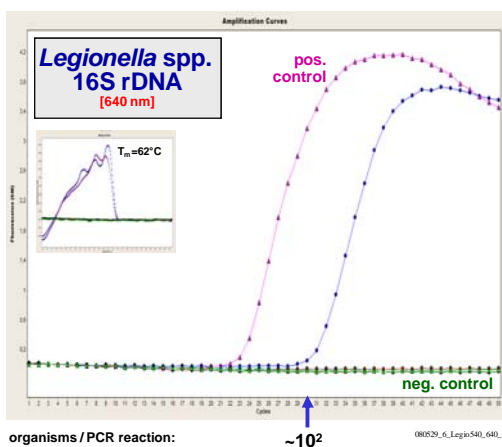
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

1	82411	29,94
2	82412	
3	82413	
4	82414	
5	pos. Ko. Legionella	22,11
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., H.-J. Linde, N. Lehn, O. Landt, K. Barrat, 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-J04_II/08



540 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia pneumoniae* status 11.2008

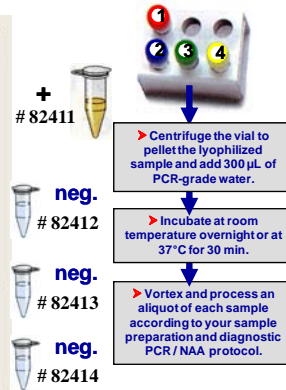
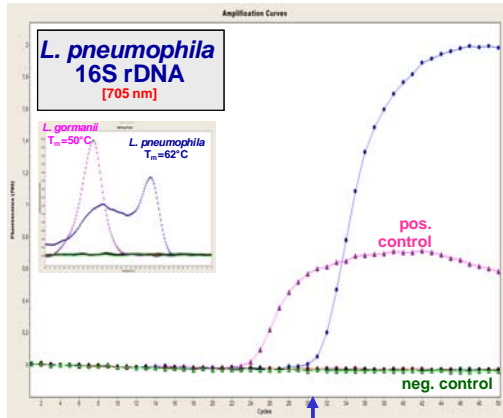
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

1	82411	29.94
2	82412	
3	82413	
4	82414	
5	pos. Ko. Legionella	22.51
6	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-J05_II/08