



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 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.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 82422; *M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 82421; *M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 82424; *M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 82423; nur *E. coli*).

Erfreulicherweise wurden im Rahmen des aktuellen Probensets durchwegs hohe Richtigkeitsquoten beobachtet. Auch wenn es sich hier um einen relativ neu eingeführten Ringversuch handelt und die Erfahrungswerte aus früheren Ringversuchsrunden noch fehlen, so zeigt die Auswertung der Ergebnisse bereits deutlich auf, daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensystemen für den Nachweis von *M. pneumoniae* DNA mit einer Menge von ca. $\sim 10^4$ Genomkopien pro NAT-Reaktionsansatz noch nicht ganz erreicht zu sein scheint. So konnten 61 der insgesamt 63 Teilnehmer die *M. pneumoniae* DNA in den drei positiven Proben problemlos und zuverlässig nachweisen. Zudem wurden, bis auf eine Ausnahme, bei der negativen Probe # 82423 von den 63 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.

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 (4x), Minerva Venor Mp (4x), und Duplica Real Time *M. pneumoniae* Detection Kit der Fa. Euroclone (1x).

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of the corresponding target organism. Sample # 82422 contained a relatively high number of *M. pneumoniae*-infected cells ($\sim 10^6$ genome copies/mL), one sample contained a tenfold lower amount of target cells (# 82421; *M. pneumoniae*, $\sim 10^5$ genome copies/mL) and one sample contained a hundredfold lower amount of target cells (# 82424; *M. pneumoniae*, $\sim 10^4$ genome copies/mL). The set was completed by sample # 82421, which contained no *M. pneumoniae*-infected cells but only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Despite the relatively low amounts of target organisms in sample # 82424 of the current set, the availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a surprisingly high portion of correct results. Among the *Mycoplasma pneumoniae*-specific results reported by the 63 participants, only five false-negative results (presumably due to some minor analytical sensitivity issues in the corresponding PCR-based assays) and one false-positive result (presumably caused by cross-contamination events) were reported. All in all, 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) November 2008**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
82421	+	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 ⁵ genome copies/mL)
82422	++	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 ⁶ genome copies/mL)
82423	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12
82424	(+)	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 ⁴ genome copies/mL)

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

n = 63	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	82421	82422	82423	82424		82421	82422	82423	82424
Befund Result									
Positiv	61	62	1	61	n.d.	0	0	0	0
Negativ	2	1	62	2	nein no	63	63	63	63
Fraglich Questionable	0	0	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 =45)	132	132 / 135	98	44	44 / 45	98
Commercial assay / kit [27] (n = 13)	38	38 / 39	97	13	13 / 13	100
LightMix <i>M.pneumoniae</i> [20] (n = 3)	8	8 / 9	89	3	3 / 3	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	8	8 / 9	89	3	3 / 3	100



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 11.2008

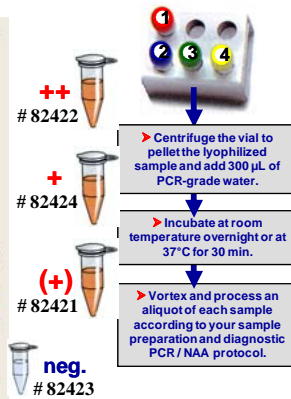
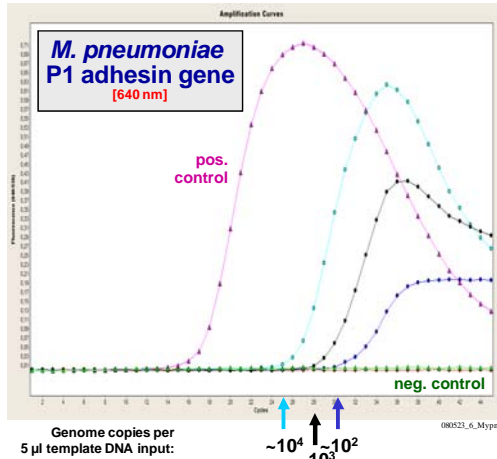
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs

1	82421	30,24
2	82422	25,47
3	84223	
4	84224	28,32
5	Pos. Ko Mycoplasma pn.	16,08
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_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>



541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 11.2008

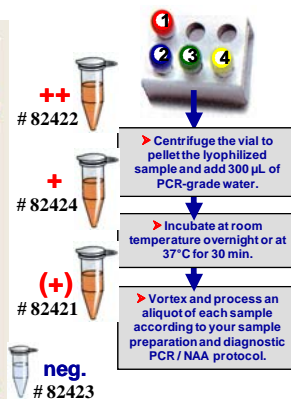
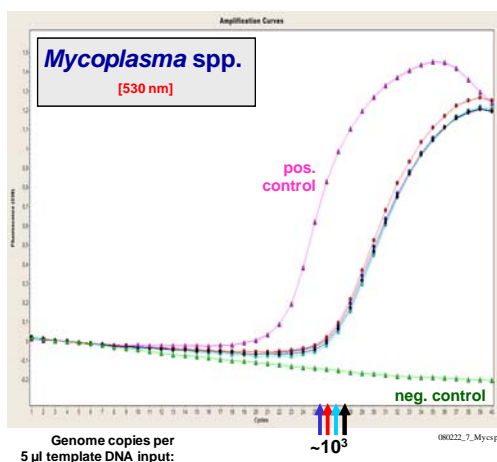
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs

1	82421	25,29
2	82422	25,54
3	82423	25,29
4	82424	25,39
5	Pos. Ko Mycoplasma spp	20,80
6	NTC	



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



INSTAND-K04_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>



541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 11.2008

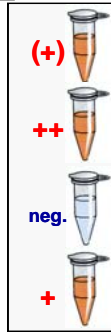
➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs

**Becton Dickinson
 ProbeTec *Mycoplasma pneumoniae***

Probennummer	MP
82421	⊖
82422	⊕+
82423	⊖
82424	⊕+

MPBD



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.



INSTAND-K05_II/08



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

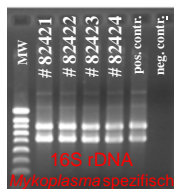
Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



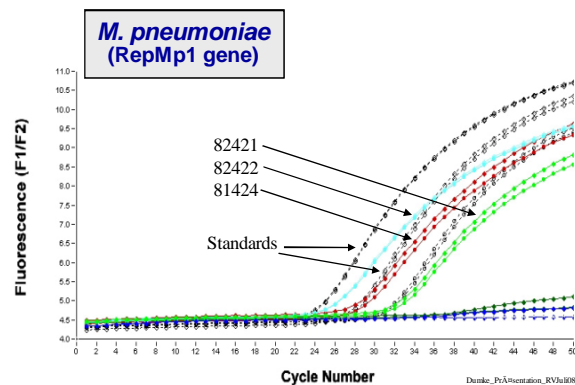
541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 11.2008

➤ **Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs



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



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.



INSTAND-K06_II/08