



INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE
MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE

UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIREKTOR: PROF. DR. HANS WOLF

WHO Collaborating Centre
for Research and Control of
Virus-associated Cancers



WHO Collaborating Centre
for Reference and Research
on Viral Hepatitis



PD DR. UDO REISCHL, TEL: (0941) 944-6450 FAX: -6402

MOLEKULARE DIAGNOSTIK

Regensburg, den 27. Oktober 2006

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 540)**

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find a cover letter in English on page 2 of this document and
tables with the results in a bilingual style after the discussion in German language.*

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

Prof. Dr. N. Lehn

Prof. Dr. E. Straube

Prof. Dr. M. Maaß

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 540)

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.instand-ev.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 of proficiency testing. 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.

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).

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 Prof. Dr. N. Lehn Prof. Dr. E. Straube Prof. Dr. M. Maaß

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

SEPTEMBER 2006:

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 befinden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 62003, # 62102, und # 62103), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 62001), EHEC (Probe # 62401), *Legionella pneumophila* (Probe # 62601), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Proben # 63412 und # 63414). 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 prozentuellem 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 auch immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

Eine weitergehende systematische Aufschlüsselung nach den einzelnen Kategorien der DNA-Extraktion, Amplifikation, Detektion sowie den jeweils verwendeten Zielsequenzen ist bei diesem Ringversuch aufgrund der relativ hohen Richtigkeitsquote unter den eindeutig positiven Proben wenig sinnvoll. Die individuellen Angaben der einzelnen Teilnehmer zur Testdurchführung werden jedoch EDV-technisch erfasst und bleiben somit für retrospektive Analysen verfügbar.

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. 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. *Anmerkung:* auch wenn im Rahmen dieses Ringversuchs aus formellen und auswertungstechnischen Gründen (Zielorganismus ist *L. pneumophila*) die Anwesenheit von non-*pneumophila* Legionellenspezies im Untersuchungsmaterial als "negativ" zu befunden ist, können einige dieser Spezies sehr wohl von humanpathogener Relevanz sein. So gelten *Legionella micdadei*, die im aktuellen Ringversuch in einer der 4 Proben versandt wurden, beispielsweise als die aus humanem Probenmaterial am zweithäufigsten isolierte Spezies unter den derzeit bekannten mehr als 40 Arten und 60 Serotypen von Legionellen und kann beim Menschen grippeähnliche Symptome bis hin zur Pneumonie verursachen.

Nachdem im vorhergegangenen Ringversuch noch eine Probe mit sehr geringer Menge an Zielorganismen versandt wurde, führte diesmal die etwas höhere Menge an Zielorganismen und die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysensysteme zumindest bei der relativ stark positiven Probe # 62602 (*L. pneumophila*, Serogruppe 3, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml) und der negativen Probe # 62603 zu sehr hohen Richtigkeitsquoten innerhalb des Teilnehmerfeldes. Um im Rahmen dieses Ringversuchs die diagnostische Situation mit manch schwach-positivem klinischem Probenmaterial widerzuspiegeln, wurde eine der vier Proben (# 62601) wieder mit einer etwas geringeren, jedoch bei weitem nicht als grenzwertig zu betrachtenden Menge an *L. pneumophila* versetzt ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml). Erfreulicherweise konnten auch bei dieser Probe 50 der insgesamt 53 Teilnehmer *L. pneumophila* DNA zuverlässig nachweisen. 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 # 62601 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.

Wie bereits zuvor erwähnt enthielt eine der Proben des aktuellen Sets (# 62604) diesmal eine nennenswerte Menge an *Legionella micdadei*, was bei der Mehrzahl der Teilnehmer erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen führte. Nur bei 4 der insgesamt 53 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurden hier von 3 Teilnehmern die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR Protokolls sowie von einem Teilnehmer die Verwendung eines kommerziellen Testsystems mit dem *mip* Gen als *L. pneumophila*-spezifische Zielsequenzen angegeben.

Kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial kamen bei 6 Teilnehmern zum Einsatz - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits im Auswertungsbogen nicht durchgehend spezifiziert. 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 Inhibitionsergebnisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

PCR-/NAT *Legionella pneumophila* (RV 536) September 2006



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
62601	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
62602	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
62603	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
62604	∅	62	<i>Legionella micdadei</i> (~ 5x10 ³ CFU/mL)

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

n = 53	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	62601	62602	62603	62604		62601	62602	62603	62604
Befund <i>Result</i>									
Positiv	50	53	1	4 ¹⁾	n.d.	2	2	2	2
Negativ	3	0	52	49	nein <i>no</i>	51	51	51	51
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	0	0	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>	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 46)	90	90 / 92	98	88 ¹⁾	88 / 92	96
Other commercial tests [27] (n = 6)	12	12 / 12	100	11 ¹⁾	11 / 12	92
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	1	1 / 2	50	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.

Comments: ¹⁾ Four of the 53 participants reported a false-positive result for sample # 62604 (*L. micdadei*). This could be due to a "simple" cross-contamination event and/or a cross-reactivity of the primer and probe sequences of the "*L. pneumophila*-specific" PCR assays (3 of the 4 participants indicated the use of a ribosomal gene as target sequence, and the one indicated the use of an commercial assay).



536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila*

status 09.2006

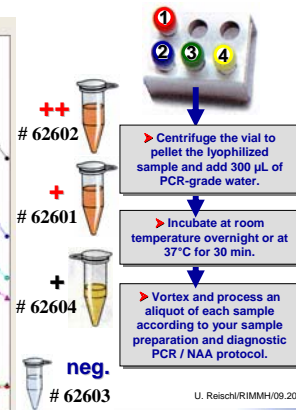
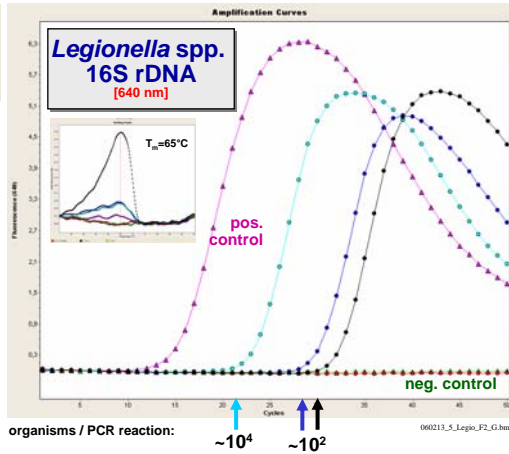
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

5	Positive <i>L. gormanii</i>	14,57
6	Negative control	
7	RV 62601	28,93
8	RV 62602	22,32
9	RV 62603	
10	RV 62604	31,09



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



IN STAND-F03_II/06



536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila*

status 09.2006

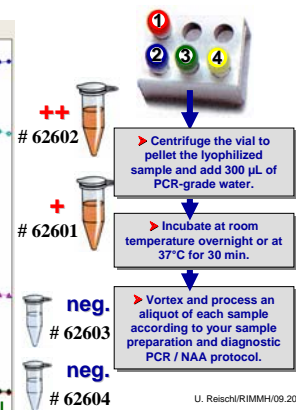
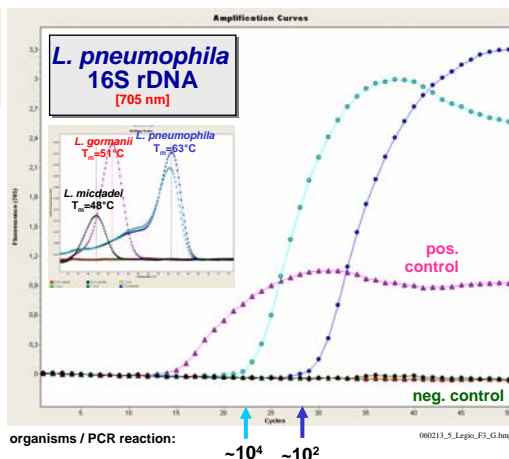
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

5	Positive <i>L. gormanii</i>	13,86
6	Negative control	
7	RV 62601	28,76
8	RV 62602	22,08
9	RV 62603	
10	RV 62604	



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



IN STAND-F04_II/06