



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 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 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 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *L. monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. Im aktuellen Ringversuch wurde dies mit *Listeria innocua* (Probe # 62802, $\sim 10^4$ CFU/ml), einer vor allem in Umweltpollen weitverbreiteten nicht humanpathogenen Listerienspezies praktiziert.

Die Verfügbarkeit von gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte bei dem aktuellen Ringversuch zumindest bei der stark positiven Probe # 62804 (*Listeria monocytogenes*, $\sim 10^6$ CFU/ml) sowie der negativen Probe # 62801 (*E. coli*) zur Mitteilung von durchwegs richtigen Ergebnissen.

Da wir uns innerhalb dieses Ringversuchsprogramms gelegentlich auch mit einzelnen Proben an die derzeit technisch machbare untere Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns dabei sehr wohl bewusst, daß bei vielen Fragestellungen das "technisch machbare" nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem "diagnostisch sinnvollen" ist), bestanden auch beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostischen Herausforderungen sowohl in der Detektion bzw. differenzierten Erfassung von non-monocytogenes Listerienspezies als auch in der Abprüfung der analytischen Sensitivität individueller Testkonzepte.

Nachdem in den vorhergegangenen Ringversuchen (beispielsweise mit Probe # 52801, *Listeria monocytogenes*, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml) die untere Nachweisgrenze hochsensitiver NAT-gestützter Testsysteme bereits etwas unterschritten schien, wurde im aktuellen Ringversuch mit der Probe # 62802 (*Listeria monocytogenes*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml) erneut die analytische Sensitivität der verwendeten Testkonzepte evaluiert bzw. abgeprüft. Diese Menge an Zielorganismen konnte von der Mehrzahl der Teilnehmer einwandfrei nachgewiesen werden. Wie aus Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei dieser Probe von 14 der insgesamt 16 Teilnehmer positive NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Die beiden Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für Probe # 62803 führten die Verwendung von eigenentwickelten *in-house* PCR Protokollen mit Agarosegel-Analyse bzw. nested-PCR zur Detektion spezifischer PCR-Produkte an. Die offensichtlich unzureichende analytische Sensitivität dieser beiden PCR-Nachweisverfahren lässt auf gewisse Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion schließen.

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen aus vorhergegangenen Ringversuchen jedoch noch eine Reihe standardisierter Rückstellproben mit geringerer Menge an Zielorganismen zur Verfügung, die als untere Meßplatte bezüglich der analytischen Sensitivität dienen können und über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind.

Von allen Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet.

Bei diesem Ringversuch besteht explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung. Hält ein Teilnehmer lediglich ein ***L. monocytogenes*-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen. Leider wurde diese Option lediglich von drei der 13 Teilnehmer wahrgenommen, die ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe # 62802 (*Listeria innocua*) berichteten.

**PCR-/NAT *Listeria spp.*
 (RV 538) September 2006**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
62801	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
62802	+	61 / 74	<i>Listeria innocua</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
62803	+	61	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
62804	++	61	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)

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

n = 16	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	62801	62802	62803	62804		62801	62802	62803	62804
Befund Result									
Positiv	0	3	14	16	n.d.	0	0	0	0
Negativ	16	13 ¹⁾	2	0	nein no	16	16	16	16
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 = 15)	31	31 / 45	69	15	15 / 15	100
RealArt <i>L. monocytog.</i> [20] (n = 1)	2	2 / 3	67	1	1 / 1	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⁾ When the use of a *Listeria monocytogenes*-specific PCR assay is specified, negative PCR results with sample # 62802 are not rated as "false-negative". Unfortunately, only 2 of the 13 laboratories who reported false-negative results for sample # 62802 have specified the [71] code which indicates the use of a *L. monocytogenes*-specific assay !!!



538 Bakteriengenom-Nachweis *Listeria spp.*

status 09.2006

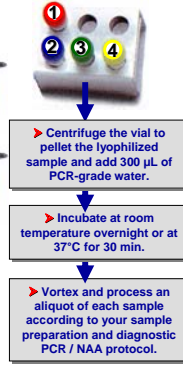
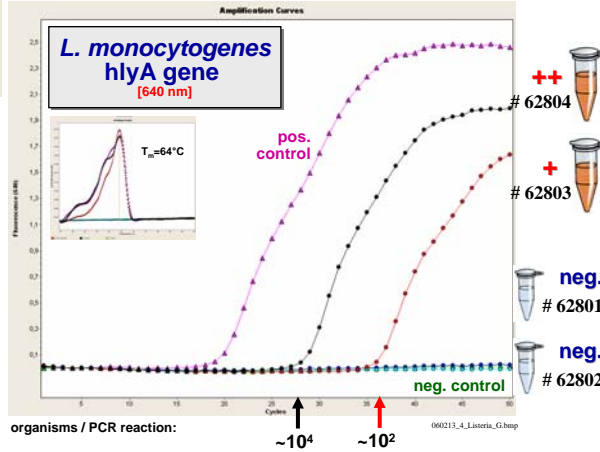
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

5	Positive <i>L.monocytogenes</i>	19,32
6	Negative control	
7	FV 62801	
8	FV 62802	
9	FV 62803	36,30
10	FV 62804	28,40



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-H03_II/06