



An die Teilnehmer
des INSTAND-Ringversuchs
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438)

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter in English on page 9 of this document.

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 auf folgende Veröffentlichungen in den Zeitschriften "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.) und "Hygiene und Mikrobiologie" (Herausgeber: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., DGHM) 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) "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT": Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Hyg. Mikrobiol.* **8**:19-21.

Bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir nach wie vor für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer.

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. Hans Wolf

Prof. Dr. Norbert Lehn

Prof. Dr. Eberhard Straube

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2004:

Nachdem in der vorhergegangenen Runde (November 2003) dieser neuen Ringversuchs-Serie einige Proben mit relativ geringer Keimzahl versandt wurden, wollten wir bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) den Versand von Proben mit relativ niedriger Keimzahl vermeiden. Es sei aber an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß noch zahlreiche Rückstell-Probensätze des letzten Ringversuchs verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets enthalten unter anderem als "grenzwertig positiv" zu bezeichnende Proben für *B. pertussis* (Probe # 32202), *H. pylori* (Probe # 32302), *B. burgdorferi* (Probe # 32503), *L. pneumophila* (Probe # 32601) und für *Salmonella enteritidis* (Probe # 32702) und können im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung beispielsweise als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

Bei den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen jedoch wieder deutlich über der "durchschnittlichen Nachweisgrenze" eingestellt, die wie folgt definiert wird: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gut evaluierte Primersequenzen). Falsch-negative Ergebnisse stellen in der aktuellen Ringversuchsrunde damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar. Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen 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. 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. Eine weitergehende Aufschlüsselung nach den einzelnen Kategorien der DNA-Extraktion, Amplifikation, Detektion sowie den jeweils verwendeten Zielsequenzen erschien bei diesem Ringversuch aufgrund der relativ hohen Richtigkeitsquote unter den positiven Proben wenig sinnvoll. Die individuellen Angaben der einzelnen Teilnehmer zur Testdurchführung werden jedoch systematisch erfasst und bleiben für retrospektive Analysen verfügbar. Erwartungsgemäß waren auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs 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 anonymisierten Ergebnisse der einzelnen Sollwertlaboratorien oder die Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR) auch unter folgender Internetadresse:
"www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)"
als *pdf*-Files zum freien download bereit.

RV 430: *Neisseria gonorrhoeae* & *Chlamydia trachomatis*

Auf vielfachen Wunsch haben wir unser Ringversuchs-Programm kürzlich um ein "*STD-Panel*", d.h. um eine Kombination der beiden Zielorganismen *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis* erweitert. Die relativ hohe Erregermenge in den drei positiven Proben und die Verfügbarkeit gut evaluierter und z.T. automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für beide Zielorganismen führte hier zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive als auch für negative Befunde.

Unter den von 69 Teilnehmern mitgeteilten 276 NAT-Ergebnissen fanden sich für *Chlamydia trachomatis* insgesamt 8 falsch-positive Ergebnisse (die vermutlich durch laborinterne Kontaminationsereignisse hervorgerufen wurden) und nur ein falsch-negatives Ergebnis. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden insgesamt 12 falsch-positive Ergebnisse und 3 falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Aufgrund der relativ hohen Erregermenge von beiden Zielorganismen in den jeweiligen Ringversuchsproben sind falsch-negative Ergebnisse hier nicht mit "marginalen" Sensitivitätsproblemen der einzelnen Testsysteme zu begründen. Sie sind vielmehr als ernstzunehmender Hinweis auf signifikante Mängel innerhalb einzelner Komponenten des laborspezifischen diagnostischen Protokolls anzusehen.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Amplicor, COBAS Amplicor oder dem Becton Dickinson ProbeTec System muß berücksichtigt werden, daß die Probleme hier vor allem auf Seiten des Gonokokken-Nachweises lagen. Für den PCR-gestützten Nachweis von *C. trachomatis* allein wurden mit diesen kombinierten Testsystemen Richtigkeitsquoten von 100 % für die positiven Ergebnisse und über 90% für die negativen Ergebnisse beobachtet. Die in Tabelle 3 aufgeführten Defizite bei den richtig-negativen Ergebnissen wurden durch insgesamt 15 falsch-positive Einzelergebnisse bedingt (8 x falsch-positives Ergebnis für Gonokokken, 4 x falsch-positive Ergebnisse für Gonokokken und *C. trachomatis*, sowie 3 x falsch-positive Ergebnisse für *C. trachomatis*). Die Ursache hierfür lag wohl hauptsächlich in einer Verschleppung von Probenmaterial aus den hochpositiven Proben in "negative" Proben während der Probenextraktion und/oder der Abarbeitung einzelner Protokollschritte.

Inhibitionsereignisse wurden nur von 6 Teilnehmern bei einzelnen Proben beobachtet. Interessanterweise gaben alle 3 Teilnehmer, die Probe # 41003 als inhibiert eingestuft haben, die Verwendung des kommerziellen COBAS Amplicor Testsystems an. Da im PCR-Reaktionsgemisch dieses automatisierten Testsystems von Hoffmann-La Roche beide Zielsequenzen und die gering konzentrierte DNA der internen Kontrolle nebeneinander im gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert werden, kann in Abwesenheit von *C. trachomatis*-DNA aber in Gegenwart von relativ hohen Mengen an Gonokokken-DNA die interne Kontrollreaktion (Inhibitionskontrolle, IC) für das *C. trachomatis*-spezifische Detektionsmodul durchaus negativ ausfallen obwohl keine Inhibitor der *C. trachomatis*-spezifischen PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt. Dies kann natürlich auch umgekehrt der Fall sein (d.h. die Interne Kontrolle des Gonokokken-spezifischen Detektionsmoduls kann in Anwesenheit großer Mengen an *C. trachomatis*-DNA einen Zahlenwert nahe oder sogar unterhalb des testspezifischen "cut-off"-Wertes aufweisen). Naturgemäß treten diese Schwierigkeiten bei der Interpretation von COBAS Amplicor Testergebnissen nicht mehr auf, wenn beide Detektionsmodule ("*Gonokokken*" und "*C. trachomatis*") eingesetzt werden.

Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems sollte in diesem Zusammenhang auch noch einmal darauf hingewiesen werden, daß in Gegenwart von relativ hohen Mengen an Zielorganismen (bzw. deren Nukleinsäure) die Interne Kontrollreaktion aufgrund der "Konkurrenzsituation" mit der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz durchaus negativ ausfallen kann obwohl keine Inhibitor der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt. Dieser Umstand ist bei der Interpretation von PCR-Ergebnissen stets zu berücksichtigen - und führte möglicherweise auch bei den übrigen 3 Teilnehmern zur Mitteilung von "Inhibitor" bei den Proben # 41001 und # 41002.

PCR-/NAT GO & *C. trachomatis* (RV 430) April 2004



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
41001	∅ / ++	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
41002	∅ / ++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁵ IFU/mL)
41003	++ / +	62	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁶ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
41004	∅ / ∅	64	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 69	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	41001	41002	41003	41004		41001	41002	41003	41004
Befund <i>Result</i>									
Positiv CT	0	64	1	2	n.d.	0	0	0	0
Positiv CT & GO	1	4	67	4	nein / no	66	66	69	68
Positiv GO	65	0	0	4	ja / yes	1*	1*	3*	1
Negativ	2	1	1	59	* Roche AmpliCor CT/GO Assay				
Fraglich / <i>Questionable</i>	1	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>	%
COBAS AmpliCor [23] (n = 34)	102	102/102	100	27	27 / 34 ¹⁾	80
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 15)	42	42 / 45	93	13	13 / 15	87
BD ProbeTec [24] (n = 7)	21	21 / 21	100	5	5 / 7 ²⁾	71
Roche AmpliCor [22] (n = 7)	21	21 / 21	100	3	3 / 7 ³⁾	43
Other commercial tests [27] (n = 2)	6	6 / 6	100	2	2 / 2	100
Andere / <i>other</i> [29] (n = 6)	17	17 / 18	94	6	6 / 6	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⁾ Probably cross-contamination events: 6 participants reported 7 false-positive results for GO and/or CT.
²⁾ Probably cross-contamination events: 1 participant reported 2 false-positive results for GO and CT.
³⁾ Probably cross-contamination events: 2 participants reported 4 false-positive results for GO and CT.

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 430 to 438)

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 around \$ 150 per set of 4 samples, 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 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 on this proficiency test panel "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).

Yours sincerely,



Udo Reischl

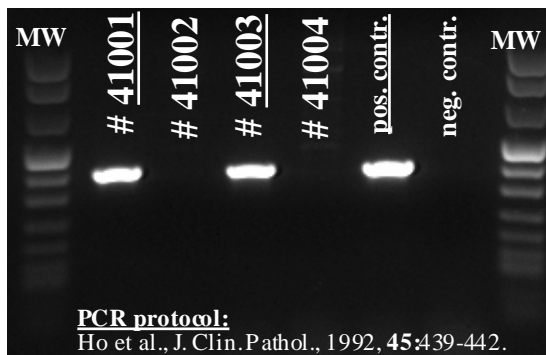


430 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

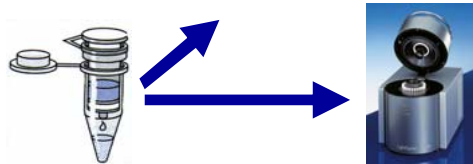
status 04.2004

Reischl / Straube

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

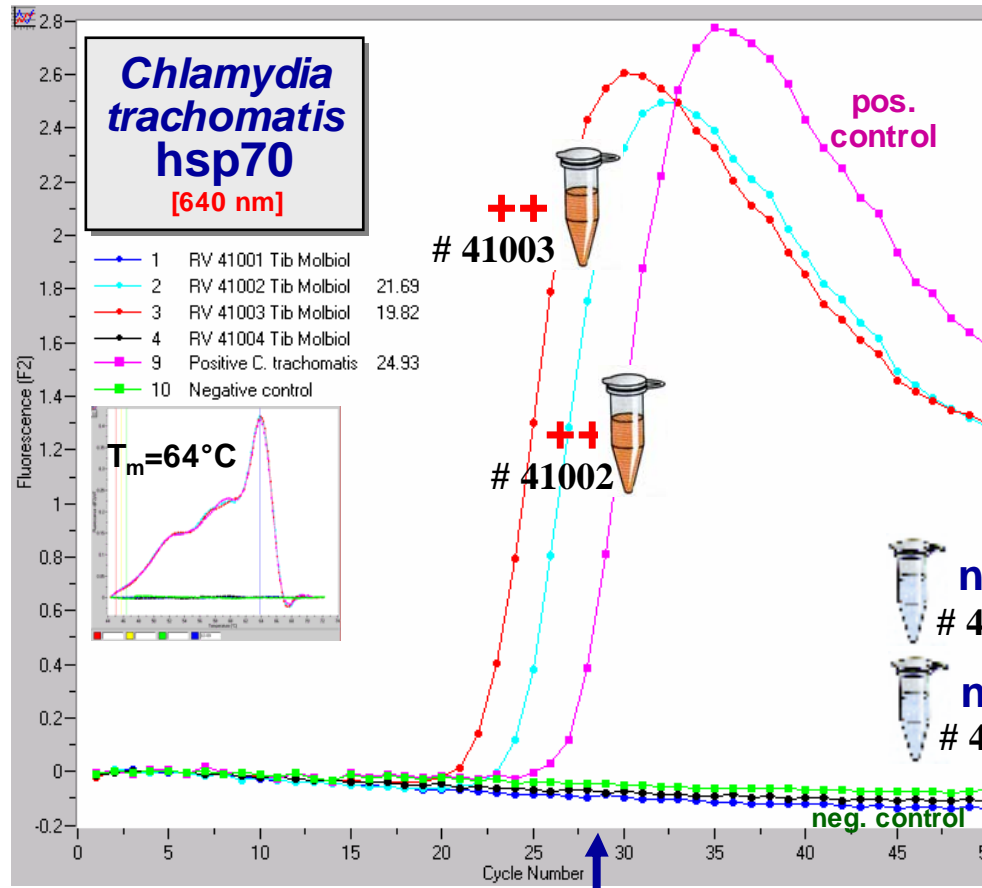


N. gonorrhoeae



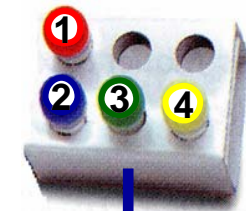
LightCycler PCR protocol:

Wood, H., U. Reischl, and R. Peeling (2001) Rapid detection and quantification of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Reischl, U., Wittwer, C., and Cockerill, F., eds.), Springer Press, Heidelberg, pp. 115-132.



infected cells / PCR reaction:

$\sim 10^1$



➤ 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.

U. Reischl/RIMMH/04.2004





430 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2004

Reischl / Straube

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

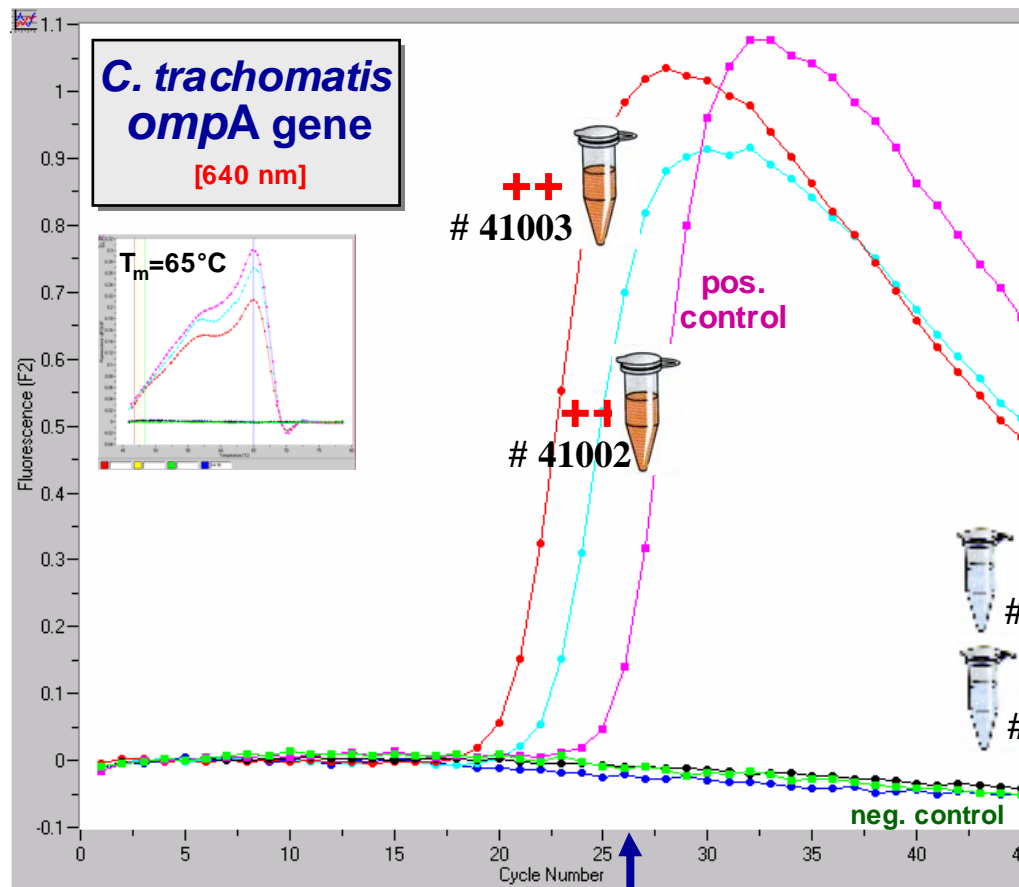
- 1 RV 41001 Tib Molbiol
- 2 RV 41002 Tib Molbiol 21.69
- 3 RV 41003 Tib Molbiol 19.82
- 4 RV 41004 Tib Molbiol
- 9 Positive *C. trachomatis* 24.93
- 10 Negative control



LightCycler PCR protocol:
 Proprietary *C. trachomatis*-specific
 LightCycler assay developed by
 TIB Molbiol; Berlin, Germany
 (<http://www.tib-molbiol.de>):



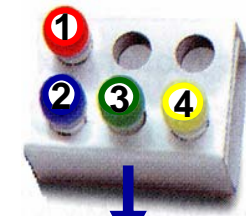
C. trachomatis:
 SET: 287



infected cells / PCR reaction:

~10¹

040331_3_41001_Molbiol_G.bmp



➤ 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.

U. Reischl/RIMMH/04.2004

Regensburg





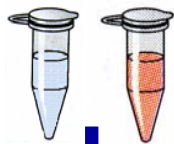
430 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2004

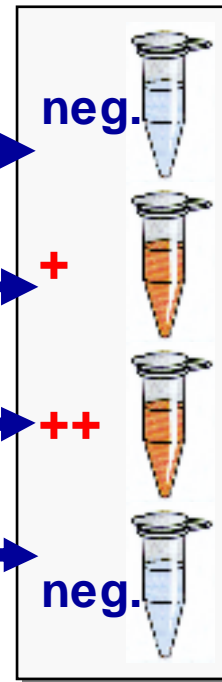
Reischl / Straube

➤ Evaluation (qualitative PCR):

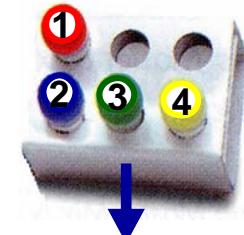
**ROCHE
 COBAS AmpliCor
C. trachomatis & GO**



S 41001	CT 0.033	___	NEGATIVE	➔
	CNC 1.150	___	POSITIVE	
S 41002	CT 3.425	___	POSITIVE	➔ +
	CNC 0.322	___	POSITIVE	
S 41003	CT 3.483	___	POSITIVE	➔ ++
	CNC 0.097	___	NEGATIVE	
S 41004	CT 0.004	___	NEGATIVE	➔
	CNC *.***	___	POSITIVE	



040401_Scan COBAS_1.jpg



➤ 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.

U. Reischl/RIMMH/04.2004





430 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2004

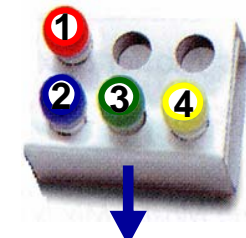
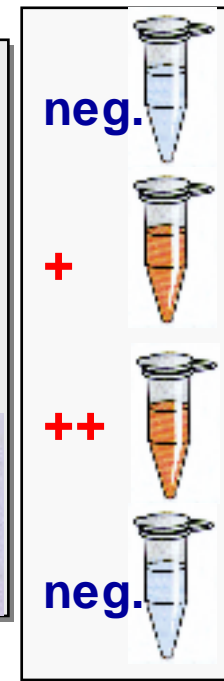
Reischl / Straube

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Milenia Biotec
Chlamydia trachomatis

neg.		41001	7
pos.		41002	8
pos.		41003	9
neg.		41004	10
pos.		Positive	16
neg.		Negative	17

Test line ↑ ↑ Assay Control



- 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.

U. Reischl/RIMM/04.2004





430 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

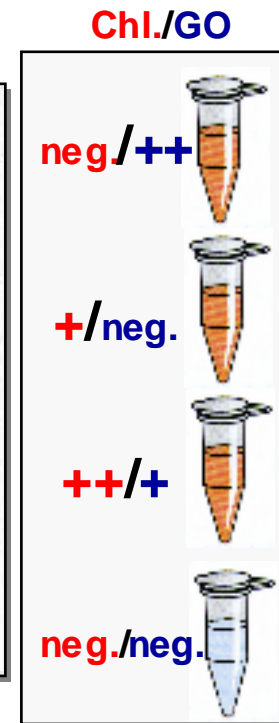
status 04.2004

Reischl / Straube

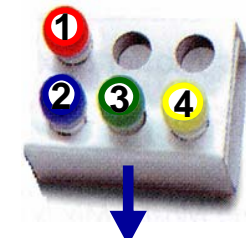
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC

Probennummer	CT	GC	CT QC	GC QC
RV-41001	⊖	⊕+		
RV-41002	⊕+	⊖		
RV-41003	⊕+	⊕+		
RV-41004	⊖	⊖		
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK



040401_Scan ProbeTec_1.jpg



- 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.

U. Reischl/RIMMH/04.2004

