



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 beigelegten 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 431: *Chlamydia trachomatis*

Nicht zuletzt aufgrund der relativ hohen Menge an Zielorganismen in den drei positiven Proben und der Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme wurden hier, wie auch bereits beim vorhergegangenen Ringversuch, hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Befunde ermittelt. Inhibitionsereignisse wurden nur von 7 der insgesamt 90 Teilnehmer und hier auch nur von COBAS Amplicor Anwendern beobachtet. Mögliche Ursachen dieser vermeintlichen Inhibitionsereignisse wurden bereits zuvor unter RV 430 diskutiert.

Unter den 360 mitgeteilten NAT-Ergebnissen fanden sich lediglich 7 als "fraglich" bzw. "inhibiert" eingestufte und 10 falsch-negative Ergebnisse. Ein Großteil der insgesamt 5 falsch-positiven Ergebnisse ist vermutlich auf (vermeidbare) laborinterne Kontaminationsereignisse bei der Abarbeitung der relativ stark positiven Ringversuchsproben zurückzuführen. Ansonsten waren auch im Rahmen dieses Ringversuchs keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den kommerziellen und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen zu beobachten.

**PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis*
 (RV 431) April 2004**

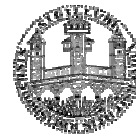


Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.
Sample composition and expected results.

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
41101	+++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁶ IFU/mL)
41102	++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 5x10 ⁵ IFU/mL)
41103	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
41104	++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 2x10 ⁵ IFU/mL)

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

n = 90	Probennummer (Sample no.)				Inhibition
	41101	41102	41103	41104	
Befund Result					
Positiv	86	85	5	86	n.d.
Negativ	3	4	81	3	nein no
Fraglich Questionable	1	1	4	1	ja yes

*Roche COBAS Amplicor CT/GO

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	%
COBAS Amplicor [23] (n = 33)	92	92 / 94	98	30	30 / 31	97
In house PCR assay [28] (n = 23)	68	68 / 69	99	22	22 / 23	96
BD ProbeTec [24] (n = 11)	33	33 / 33	100	10	10 / 11	91
Roche Amplicor [22] (n = 8)	20	20 / 24	83	7	7 / 8	88
Other commercial tests [27] (n = 11)	30	30 / 33	91	10	10 / 11	91
GenProbe AMPLIFIED [21] (n = 2)	6	6 / 6	100	2	2 / 2	100
Andere / other [29] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	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.

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



431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 04.2004

Reischl / Straube

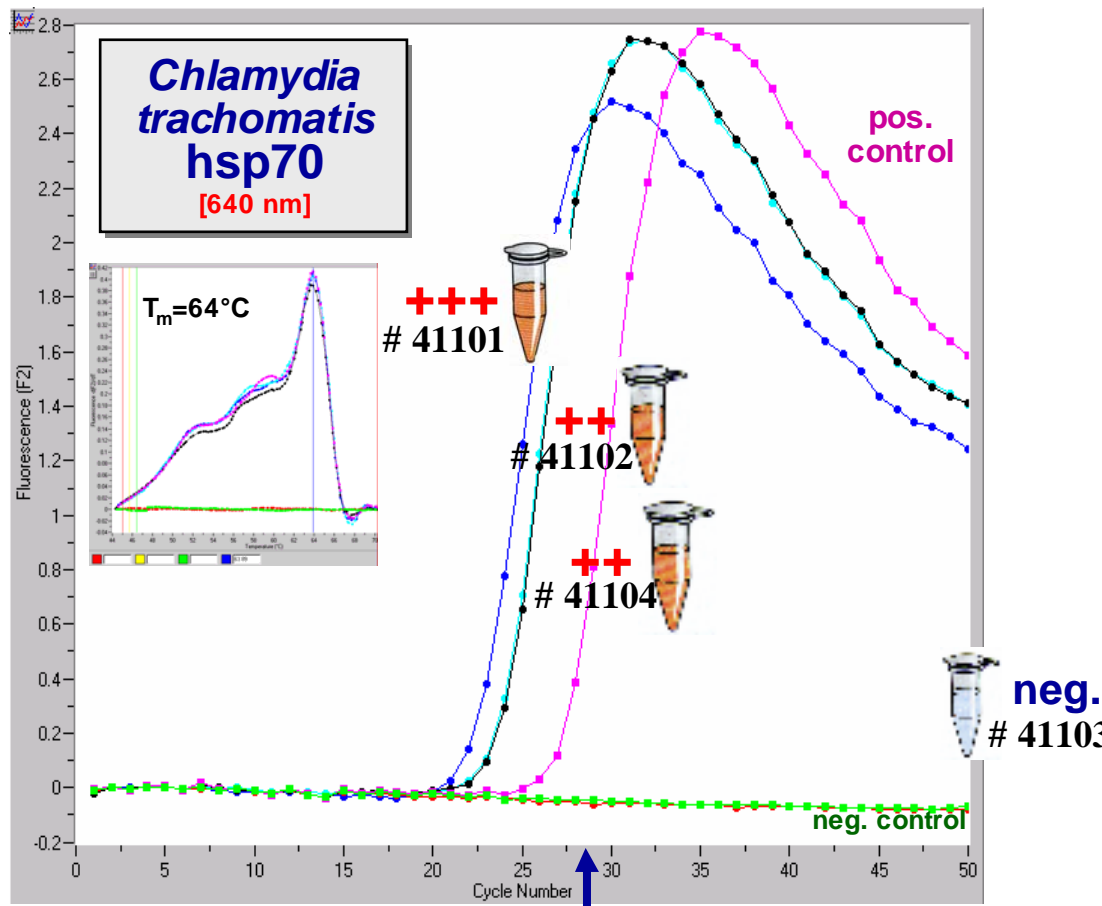
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

5	RV 41101	21.81
6	RV 41102	23.10
7	RV 41103	
8	RV 41104	23.20
9	Positive <i>C. trachomatis</i>	26.90
10	Negative control	

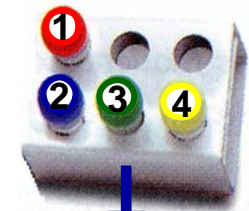


LightCycler PCR protocol:

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.), ISBN 3-540-41881-4, 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/RIMM/04.2004





431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 04.2004

Reischl / Straube

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

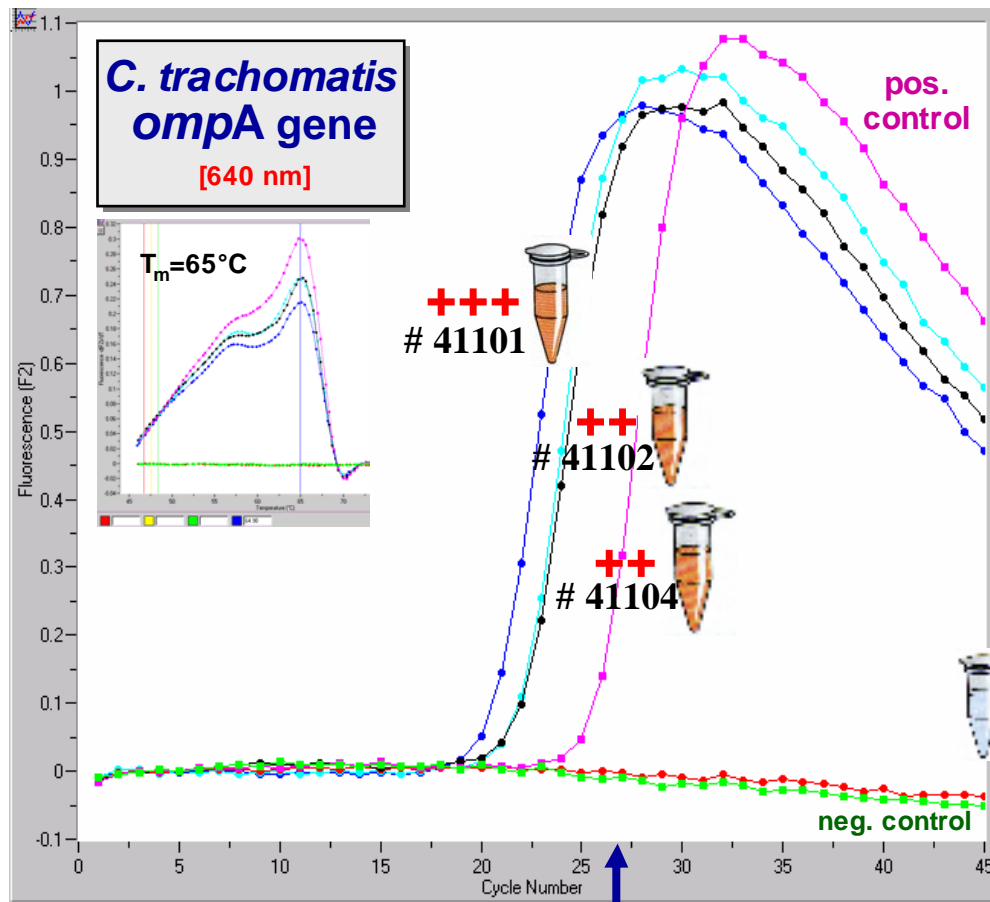
5	RV 41101 Tib Molbiol	19.83
6	RV 41102 Tib Molbiol	21.15
7	RV 41103 Tib Molbiol	
8	RV 41104 Tib Molbiol	21.34
9	Positive <i>C. trachomatis</i>	24.93
10	Negative control	



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



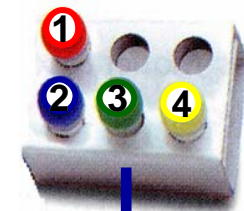
C. trachomatis:
 SET: 287



infected cells / PCR reaction:

~10¹

040331_3_41101_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/RIMM/04.2004



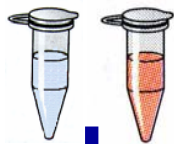


431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 04.2004

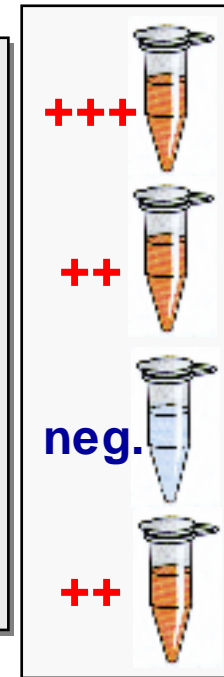
Reischl / Straube

➤ Evaluation (qualitative PCR):

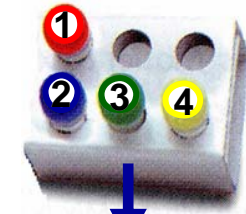
**ROCHE
 COBAS AmpliCor
 Chlamydia trachomatis**



C	-CT	0.003	---	
C	+CT	*.***	---	
S 41101	CT	3.726	---	POSITIVE
	CNC	0.128	---	NEGATIVE
S 41102	CT	3.726	---	POSITIVE
	CNC	0.380	---	POSITIVE
S 41103	CT	0.009	---	NEGATIVE
	CNC	*.***	---	POSITIVE
S 41104	CT	3.851	---	POSITIVE
	CNC	0.415	---	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





431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 04.2004

Reischl / Straube

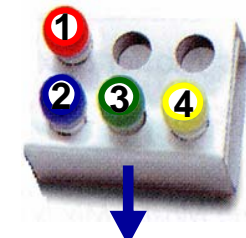
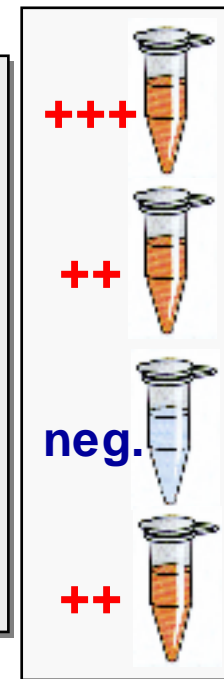
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Milenia Biotec
Chlamydia trachomatis

pos.		11.	41101	11
pos.		12.	41102	12
neg.		13.	41103	13
pos.		14.	41104	14
pos.		16.	Positive	16
neg.		17.	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





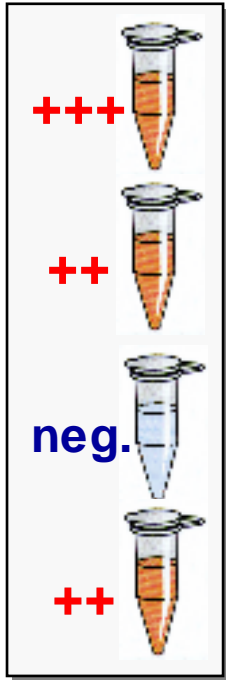
431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 04.2004

Reischl / Straube

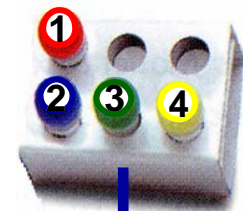
➤ **Evaluation** (qualitative PCR):

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

<u>Probennummer</u>	<u>CT</u>	<u>CT QC</u>
RV-41101	⊕←	
RV-41102	⊕←	
RV_41103	⊖	
RV-41104	⊕←	
QC- (3273598)		OK
QC+ (3273598)		OK



040401_Scan ProbeTec_2.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

