



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 31. Mai 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 15 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: 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.

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

AKTUELLE HINWEISE:

Nach dem sehr erfolgreichen Verlauf der initialen "Probe-Ringversuche" wurden RV 539 "MRSA bzw. cMRSA" (sog. *community-associated* Methicillin-resistente *S. aureus*) und RV 540 "*Chlamydia pneumoniae*" nun als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen. Die Konzeption und Auswertung der *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen Ringversuche erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Maaß vom Universitätsklinikum Salzburg, der hier auch als Ringversuchsleiter fungiert.

Ab der aktuellen Ringversuchsreihe zum "Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken" werden die einzelnen Ringversuche bei INSTAND e.V. aus organisatorischen Gründen jetzt der 500er-Nummerngruppe zugeordnet. Die entsprechenden Ringversuchsnummern (ehemals RV 430 bis RV 438) ändern sich dann wie folgt: RV 430 > RV 530; RV 431 > RV 531; u.s.w. Wir bitten dies bei der Anmeldung zu beachten.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2006:

Nachdem in einigen der vorhergegangenen Runden dieser Ringversuchs-Serie vorwiegend Proben mit relativ hoher Keimzahl versandt wurden, wird bei der Konzeption des aktuellen und der zukünftigen Ringversuche zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) bei einigen Zielorganismen auch der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets an Rückstellproben enthalten u.a. 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).

Auch in den aktuellen Ringversuchssets befinden sich wieder einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 52101), *B. pertussis* (Probe # 52204), EHEC (Probe # 52401), *L. pneumophila* (Probe # 52603), *L. monocytogenes* (Probe # 52801), MRSA (Probe # 52903), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 52411). 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.

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten "grenzwertig positiven" Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von "durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten" eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: 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).

Bei den meisten Probenmaterialien der aktuellen Ringversuchsrunde stellen falsch-negative Ergebnisse damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar.

Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel 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 (Sollwert). 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)" als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 530: *Neisseria gonorrhoeae* & *Chlamydia trachomatis*

Die relativ hohe Erregermenge in zwei der 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. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit einer etwas geringeren Menge an *C. trachomatis* (# 61004), eine Probe mit etwas geringerer Menge an *N. gonorrhoeae* (# 61003), eine Probe mit *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (# 61002) sowie eine Probe ohne diese beiden Zielorganismen (# 61001).

Unter den von 87 Teilnehmern mitgeteilten 348 NAT-Ergebnissen fanden sich für *Chlamydia trachomatis* insgesamt nur 1 falsch-positives Ergebnis (das vermutlich durch laborinterne Kontaminationsereignisse hervorgerufen wurde) und 16 falsch-negative Ergebnisse. Dabei wurden 8 der insgesamt 16 falsch-negativen Ergebnisse bei der schwach positiven Probe # 61004 und 8 bei Probe # 61002 beobachtet, die relativ hohe Mengen (ca. 10^4 CFU /ml) an beiden Zielorganismen enthielt. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden lediglich von jeweils einem Teilnehmer für die Proben # 61001 und # 61004 ein falsch-positives Ergebnis mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche Amplicor, COBAS Amplicor, dem Becton Dickinson ProbeTec oder anderen Testsystemen muß berücksichtigt werden, daß im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in Tabelle 3 nicht zwischen dem spezifischen Nachweis von Chlamydien und Gonokokken differenziert wurde. Mit Ausnahme der beiden Proben # 61003 und # 61004, die etwas geringere Mengen an beiden Zielorganismen enthielten, wurden mit diesen kombinierten Testsystemen insgesamt relativ hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Interessanterweise schnitt auch diesmal die Gruppe der eigenentwickelten "in house" Assays bezüglich der falsch-positiven Ergebnisse im Durchschnitt etwas schlechter ab als die Gruppe der Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen.

Inhibitionsereignisse wurden von keinem der Teilnehmer beobachtet. Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems soll 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.

**PCR-/NAT *C. trachomatis* & GO
 (RV 530) April 2006**



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

Gruppe A	Erwartet / expected	Probennummer	Probenzusammensetzung / Sample composition
61001	∅ / ∅	64	<i>Escherichia coli</i> K12
61002	++ / +	62	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
61003	∅ / +	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
61004	+ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)

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

n = 87	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	61001	61002	61003	61004	61001	61002	61003	61004	
Befund Result									
Positiv CT	1	4	0	78	n.d.	1	1	1	1
Positiv CT & GO	0	75	0	0	nein / no	86	86	86	86
Positiv GO	1	3	80	1	ja / yes	0	0	0	0
Negativ	85	5	7	8					
Fraglich / Questionable	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	%
COBAS Amplicor [23] (n = 40)	117	117 / 120	98	39	39 / 40	98
In house PCR assay [28] (n = 15)	38	38 / 45	84	13	13 / 15	87
BD ProbeTec [24] (n = 16)	46	46 / 48	96	16	16 / 16	100
Roche Amplicor [22] (n = 7)	20	20 / 21	95	7	7 / 7	100
GenProbe Amplified CT [21] (n = 1)	1	1 / 3	33	1	1 / 1	100
Other commercial tests [27] (n = 6)	17	17 / 18	94	6	6 / 6	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	1	1 / 3	33	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: ---



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>

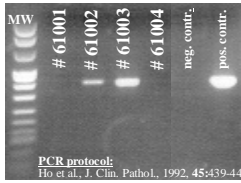


530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

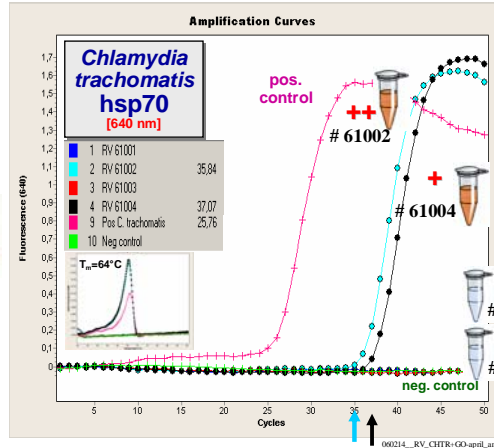
Reischl / Straube



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: $\sim 10^2 \sim 10^1$



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 μ L 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/RMMH#04.2006



INSTAND-A05_I/06



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>



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

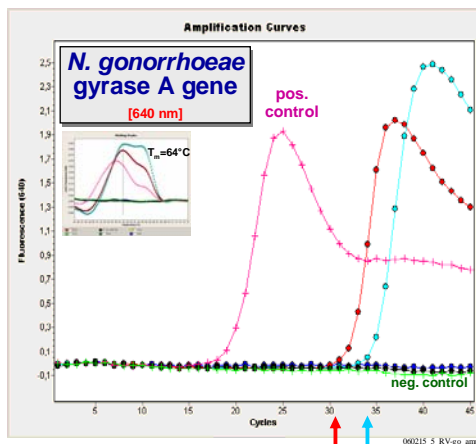
19 61001 N.go	
20 61002	33,04
21 61003	30,13
22 61004	
27 pos.Kon. Neiss.Go	17,84
28 neg.Kon.	



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



N. gonorrhoeae:
 SET: 97



infected cells / PCR reaction: $\sim 10^2 \sim 10^1$



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 μ L 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/RMMH#04.2006



INSTAND-A03_I/06



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>



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

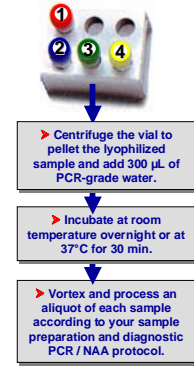
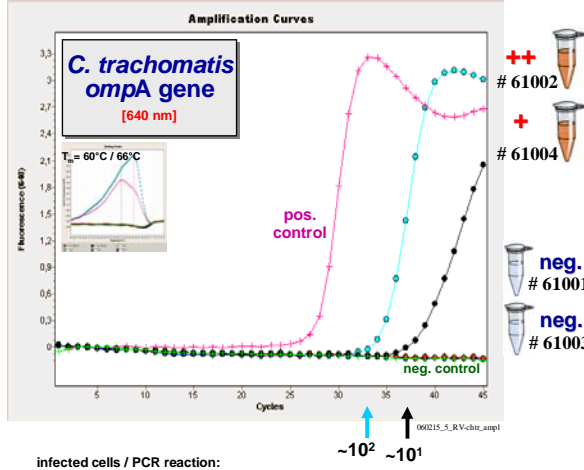
- 1 61001 Chlamt. 33,11
- 2 61002 33,11
- 3 61003 37,43
- 4 61004 37,43
- 17 pos.Kon. Chlamt. 25,97
- 18 neg.Kon.



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



C. trachomatis:
 SET: 98



U. Reischl/RMMH/04.2006



INSTAND-A04_I/06



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>



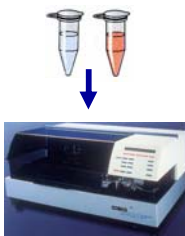
530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2006

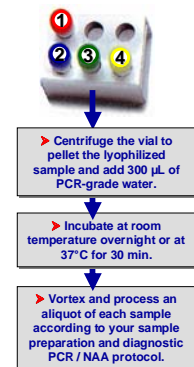
Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

**ROCHE
 COBAS Amplicor
*N. gonorrhoeae***



S RV61001	NG 0.002	NEGATIVE
	CNC *,***	POSITIVE
S 61002	NG *,***	POSITIVE
	CNC *,***	POSITIVE
S 61003	NG *,***	POSITIVE
	CNC *,***	POSITIVE
S 61004	NG 0.002	NEGATIVE
	CNC *,***	POSITIVE



U. Reischl/RMMH/04.2006



INSTAND-A06_I/06



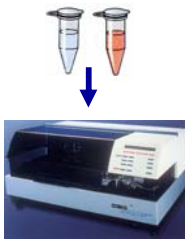
530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2006

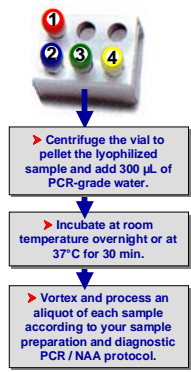
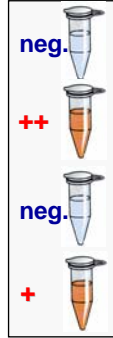
➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Straube

**ROCHE
 COBAS Amplicor
*C. trachomatis***



S 61001	CT 0.001	☉	NEGATIVE
	CNC *.***	✓	POSITIVE
S 61002	CT *.***	✗	POSITIVE
	CNC *.***	✗	POSITIVE
S 61003	CT 0.002	☉	NEGATIVE
	CNC *.***	✓	POSITIVE
S 61004	CT *.***	✗	POSITIVE
	CNC *.***	✗	POSITIVE



U. Reischl/RMMH/04.2006



INSTAND-A07_I/06



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

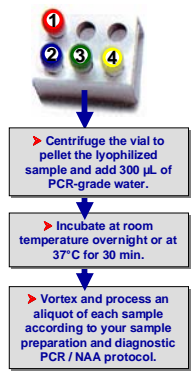
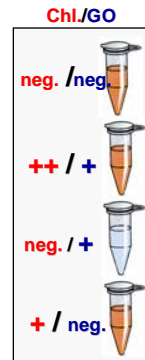
status 04.2006

➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	GC	CT QC	GC QC
61001	☉	☉		
61002	☉+	☉+		
61003	☉	☉+		
61004	☉+	☉		
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK



U. Reischl/RMMH/04.2006



INSTAND-A08_I/06