



Regensburg, den 28. April 2005

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438)**

Dear Participant, dear Colleague,
Please find a cover letter in English on page 11 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

AKTUELLER HINWEIS:

Wie bereits erwähnt, sind wir bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche stets bemüht den Anregungen und Wünschen von Seiten der Teilnehmer möglichst zeitnah und professionell Rechnung zu tragen. Daher wird das derzeitige Panel an erregerspezifischen Ringversuchen um "*Chlamydia pneumoniae*" und "MRSA bzw. cMRSA" (sog. community-associated Methicillin-resistente *S. aureus*) erweitert.

Die Konzeption und Auswertung der *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen Ringversuche erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Maaß, Universität Lübeck, der hier auch als Ringversuchsleiter fungieren wird. Mit der Einbeziehung der beiden letztgenannten Erreger bzw. Erregergruppen wollen wir vor allem den zahlreichen Anfragen seitens humandiagnostisch orientierter mikrobiologischer Laboratorien und aktuellen infektiologischen Notwendigkeiten nachkommen.

Die Konfektionierung entsprechenden Probenmaterials ist bereits abgeschlossen und alle an unserer Ringversuchsreihe teilnehmenden Laboratorien werden demnächst von INSTAND e.V. ein Anmeldeformular für die Teilnahme an einem probeweisen Ringversuch bekommen.

Einen erfolgreichen Ablauf dieser Prototyp-Ringversuche vorausgesetzt, werden sie dann ab 2006 als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen.

Organisatorische Anmerkung: ab 2006 werden die Ringversuche zum "Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken" (jetzt RV 430 bis RV 438) aus organisatorischen Gründen der 500er-Nummerngruppe zugeordnet. Die entsprechenden Ringversuchsnummern ändern sich dann wie folgt: RV 430 > RV 530; RV 431 > RV 531; u.s.w. Die beiden zusätzlichen Ringversuche werden dann unter der Nummer RV 539 für "MRSA bzw. cMRSA" und der Nummer RV 540 für "*Chlamydia pneumoniae*" aufgeführt.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

MÄRZ 2005:

Nachdem in der vorhergegangenen Runde dieser Ringversuchs-Serie (September 2004) vorwiegend Proben mit relativ hoher Keimzahl versandt wurden, wurde bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) bei einigen Zielorganismen wieder der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

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

Auch in den aktuellen Ringversuchssets befinden sich wieder einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 51101), EHEC (Probe # 51402), *L. pneumophila* (Probe # 51604), *Salmonella typhimurium* (Probe # 51702), sowie *L. monocytogenes* (Probe # 51801). Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze beispielsweise 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 diesen 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.

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 430: *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 relativ hoher Menge an *C. trachomatis* (# 51001), eine Probe mit relativ hoher Menge an *N. gonorrhoeae* (# 51004), eine Probe mit etwas geringeren Mengen an *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (# 51002) sowie eine Probe ohne diese beiden Zielorganismen (# 51003).

Unter den von 84 Teilnehmern mitgeteilten 336 NAT-Ergebnissen fanden sich für *Chlamydia trachomatis* insgesamt nur 2 falsch-positive Ergebnisse (die vermutlich durch laborinterne Kontaminationsereignisse hervorgerufen wurden) und 14 falsch-negative Ergebnisse. Dabei wurden 8 der insgesamt 14 falsch-negativen Ergebnisse bei der schwach positiven Probe # 51002 beobachtet. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurde lediglich von zwei Teilnehmern für die Probe # 51003 ein falsch-positives Ergebnis mitgeteilt. Im Gegensatz zur Ringversuchsprobe # 51002 sind die 6 falsch-negativen Ergebnisse bei der Probe # 51001, die mit 1×10^5 IFU/ml eine relativ hohe Menge an *Chlamydia trachomatis* enthielt, nicht mit "marginalen" Sensitivitätsproblemen der einzelnen Testsysteme zu entschuldigen. 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 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 Probe # 51002, die etwas geringere Mengen an beiden Zielorganismen enthielt, wurden mit diesen kombinierten Testsystemen insgesamt relativ hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Interessanterweise schnitt die Gruppe der eigenentwickelten "in house" Assays etwas schlechter ab als die der kommerziellen Testsysteme. Inhibitionsereignisse wurden nur von 4 Teilnehmern und hier nur bei der Probe # 51004 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 Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt.

Bei den Ringversuchen RV 430 und RV 431 gaben insgesamt drei der Teilnehmer die Verwendung von AMPLIFIED CT Testkits der Firma Gen-Probe an. Dieses Testsystem weist die erregerspezifischen RNA-Zielsequenzen bekanntermaßen über einen RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification) nach. Auch wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so weist die erfolgreiche Detektion von *C. trachomatis* RNA in 6 der insgesamt 8 positiven Proben doch auf die Anwesenheit von ausreichend hohen Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin.

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 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 as the program continues, it is our challenge (and duty) to rise at least some of the hurdles with every round of external validation. Please note that our current panel of pathogen-specific QC sets will be expanded by "*Chlamydia pneumoniae*" and "MRSA / CA-MRSA" within the next few months.

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

PCR-/NAT *C. trachomatis* & GO (RV 430) März 2005

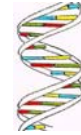


Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.
Sample composition and expected results.

Gruppe A	Erwartet / expected	Probenzusammensetzung / Sample composition
51001	++ / ∅	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁵ IFU/mL)
51002	+ / +	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 5x10 ⁵ CFU/mL)
51003	∅ / ∅	<i>Escherichia coli</i> K12
51004	∅ / ++	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)

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

n = 84	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	51001	51002	51003	51004	51001	51002	51003	51004	
Befund Result									
Positiv CT	78	0	0	1	n.d.	0	0	0	0
Positiv CT & GO	0	76	1	0	nein / no	84	84	84	80
Positiv GO	0	0	1	79	ja / yes	0	0	0	4*
Negativ	6	8	82	0	*Roche AmpliCor CT/GO Assay				
Fraglich / Questionable	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 <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 = 46)	137	137 / 138	99	46	46 / 46	100
In house PCR assay [28] (n = 10)	29	29 / 30	96	6	6 / 10 ¹⁾	60
BD ProbeTec [24] (n = 11)	33	33 / 33	100	11	11 / 11	100
Roche AmpliCor [22] (n = 9)	26	26 / 27	96	6	6 / 9 ²⁾	66
GenProbe Amplified CT [21] (n = 1)	1	1 / 2	50	2	2 / 2	100
Other commercial tests [27] (n = 4)	10	10 / 12	83	4	4 / 4	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	5	5 / 12	41	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.

Comments: ¹⁾ Probably cross-contamination events: 2 participants reported false-positive results for CT.
²⁾ Inhibition: 4 participants reported Inhibition for sample # 51004.



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>



430 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2005

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

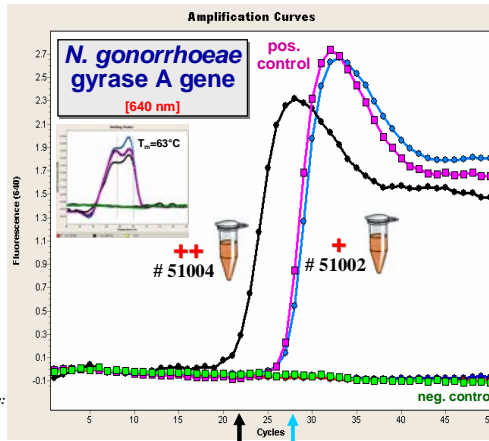
- 11 51001 25.21
- 12 51002 25.21
- 13 51003 20.02
- 14 51004 24.78
- 19 Nego Tib Molbiol 24.78
- 20 Neg control



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



N. gonorrhoeae:
 SET: 97



▶ 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/RMMH/04.2005



INSTAND-A03_I/05



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>



430 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2005

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

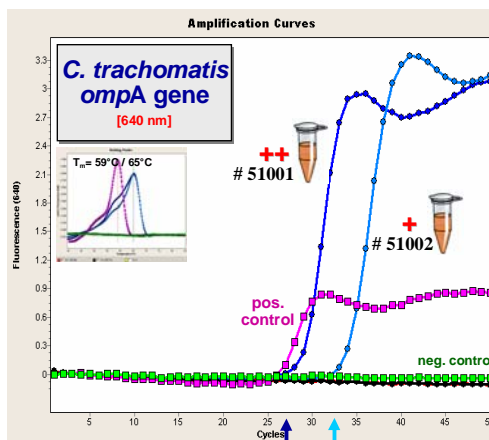
- 1 51001 27.26
- 2 51002 32.46
- 3 51003
- 4 51004
- 9 Chl Tib Molbiol 24.19
- 10 Neg control



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



C. trachomatis:
 SET: 98



▶ 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/RMMH/04.2005



INSTAND-A04_I/05



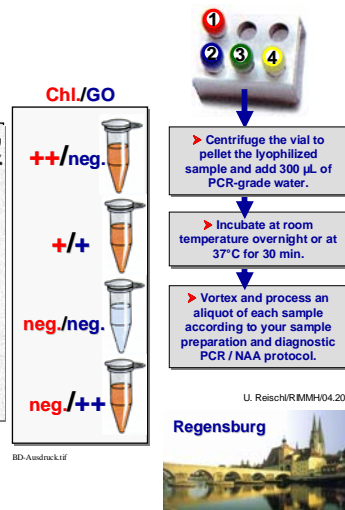
430 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO status 04.2005

➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	GC	CT QC	GC QC
51001	⊕+	⊖		
51002	⊕+	⊕+		
51003	⊖	⊖		
51004	⊖	⊕+		
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK



INSTAND-A05_I/05