



**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 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit höherer Menge an Zielorganismen (# 61102; *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml), eine Proben mit geringer Menge (# 61104; *C. trachomatis*, $\sim 5 \times 10^3$ IFU/ml), eine Probe mit sehr geringer Menge (# 61101; *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 61103), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *E. coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von 94 der insgesamt 96 Teilnehmer richtig positive Ergebnisse für Probe # 61102 mitgeteilt. Auch die negative Probe # 61103 wurde erfreulicherweise von nahezu allen Teilnehmern als negativ befundet.

Bei den beiden Proben mit relativ geringer Menge an Zielorganismen (# 61101 und # 61104) lagen die Richtigkeitsquoten für die positiven Ergebnisse jedoch deutlich niedriger. Interessanterweise wurde Probe # 61104 ($\sim 5 \times 10^3$ IFU/ml) nur von 10 und Probe # 61101 ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml) von 19 der insgesamt 96 Teilnehmern als falsch-negativ befundet. Die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse korreliert hier bereits mit der Menge an Zielorganismen im Probenmaterial - offensichtlich scheint mit 1×10^3 IFU/ml die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht bzw. sogar etwas unterschritten zu sein. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in den Proben # 61101 und # 61104 und dem Umstand, daß derzeit noch keine verbindlichen Untergrenzen für die analytische Sensitivität von diagnostischen Nachweissystemen für *C. trachomatis* definiert sind, wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis hier nicht als "falsch-negativ" bewertet. Unabhängig davon sollten aber bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität solche falsch-negativen Ergebnisse gegebenenfalls Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems sein.

Inhibitionsereignisse wurden lediglich von 2 der insgesamt 96 Teilnehmer und hier nur für die Probe # 61103 mitgeteilt. Die beiden schwach positiven Proben ausgenommen, fanden sich unter den 192 gewerteten NAT-Ergebnissen 2 als "fraglich" eingestufte, 2 falsch-negative und 1 falsch-positives Ergebnis. Ansonsten waren im Rahmen dieses Ringversuchs keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den kommerziellen ($n = 76$) und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen ($n = 20$) zu beobachten.

Bei diesem Ringversuch gaben zwei 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 bei einem der zwei Teilnehmern die erfolgreiche Detektion von *C. trachomatis* RNA in 2 der insgesamt 3 positiven Proben doch auf die Anwesenheit von ausreichend hohen Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin. Da dieses Ringversuchsprogramm jedoch explizit auf den DNA-Nachweis abzielt (siehe "Informationen zur Testdurchführung" im INSTAND-Begleitheft) und auch lediglich für diesen konzipiert und evaluiert wurde, kann in diesem Zusammenhang leider keine Gewähr für ein erfolgreiches Abschneiden mit kommerziellen RNA-gestützten Amplifikations- und Detektionsverfahren gegeben werden.

PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis*
(RV 531) April 2006



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
61101	(+)	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
61102	++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
61103	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
61104	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 5x10 ³ IFU/mL)

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

n = 96	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	61101	61102	61103	61104		61101	61102	61103	61104
Befund <i>Result</i>									
Positiv	75	94	1	83	n.d.	0	0	0	0
Negativ	19 ¹⁾	2	93	10	nein <i>no</i>	96	96	94	96
Fraglich <i>Questionable</i>	2	0	2	3	ja <i>yes</i>	0	0	2	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 = 35)	104	104 / 105	99	33	33 / 33	100
In house PCR assay [28] (n = 15)	35	35 / 43	81	15	15 / 15	100
BD ProbeTec [24] (n = 11)	29	29 / 32	91	11	11 / 11	100
Roche Amplicor [22] (n = 5)	15	15 / 15	100	4	4 / 5	80
Other commercial tests [27] (n = 11)	30	30 / 33	91	11	11 / 11	100
GenProbe AMPLIFIED [21] (n = 2)	4	2 / 6	33	2	2 / 2	100
RealArt CT [25] (n = 12)	27	27 / 34	79	12	12 / 12	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 5)	10	10 / 15	67	5	5 / 5	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⁾ Obviously the "limit of detection" in routine practice is now reached with sample # 61101.

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



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2006

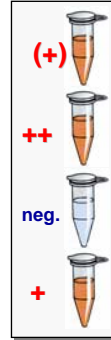
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube



S 61101	CT	*.***	+	POSITIVE
	CNC	*.***	+	POSITIVE
S 61102	CT	*.***	+	POSITIVE
	CNC	*.***	+	POSITIVE
S 61103	CT	0.001	⊖	NEGATIVE
	CNC	*.***	+	POSITIVE
S 61104	CT	*.***	+	POSITIVE
	CNC	*.***	+	POSITIVE

000504_RV_SCAN_03.jpg + 000504_RV_SCAN_04.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/RMMH-04.2006



INSTAND-A13_I/06



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2006

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	GC	CTQC	GCQC
61101	⊕+	⊖		
61102	⊕+	⊖		
61103	⊖	⊖		
61104	⊕+	⊖		
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK



- 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-04.2006



INSTAND-A14_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>



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

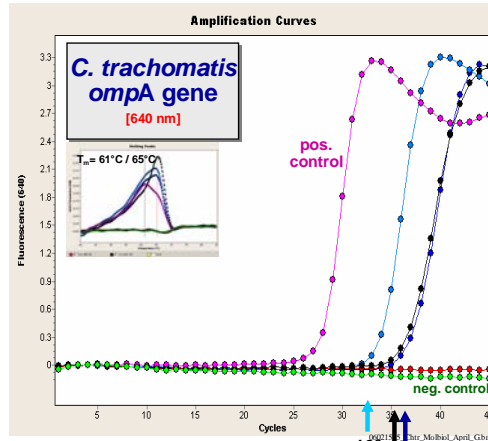
9	61101	35.48
10	61102	32.15
11	61103	
12	61104	35.09
17	pos.Kon. Chlam.tr.	25.97
18	neg.Kon.	



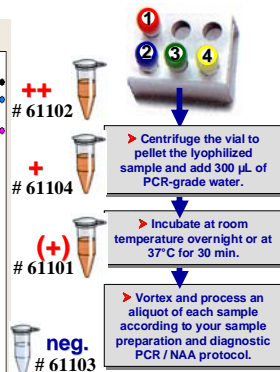
LightCycler PCR protocol:
 Proprietary *C. trachomatis*-specific
 LightCycler assay developed by
 TIB Molbiol, Berlin, Germany
 (<http://www.tib-molbiol.de>)



C. trachomatis:
 SET: 98



infected cells / PCR reaction:



U. Reischl/RMMH-04.2006



INSTAND-A11_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>



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2006

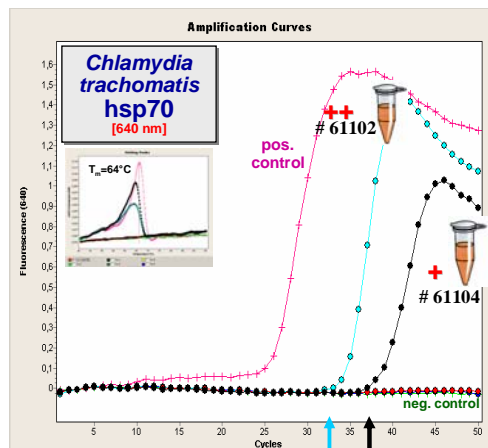
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

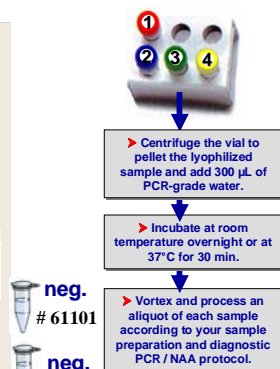
9	Pos. <i>C. trachomatis</i>	25,76
10	Neg control	
11	RV 61101	
12	RV 61102	34,03
13	RV 61103	
14	RV 61104	38,49



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:



U. Reischl/RMMH-04.2006



INSTAND-A12_I/06