



Regensburg, den 31. Mai 2007

**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 the next page of this document and
tables with the results in a bilingual style.*

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 wie gehabt 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. Bis auf wenige Ausnahmen waren die bisherigen Kommentare jedoch durchwegs positiv - vielen Dank !!

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

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

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. Um unser Spektrum an respiratorischen Pathogenen sinnvoll zu erweitern, werden wir im Laufe dieses Jahres (voraussichtlich im Zuge der kommenden Ringversuchsrunde im September 2007) einen sogenannten Probe-Ringversuch **RV 541 "Mycoplasma pneumoniae"** anbieten. Interessierte Laboratorien können sich bereits im Vorfeld bei INSTAND e.V. für eine Teilnahme anmelden - es wird in der ersten Runde nur eine limitierte Anzahl von Probensets verfügbar sein. Bei erfolgreichem Verlauf soll dieser neue Ringversuch zusammen mit den bereits etablierten Ringversuchen für *Chlamydia pneumoniae* und *Legionella pneumophila* als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen werden. Damit wäre der weltweit erste regelmäßige Ringversuch für den gezielten Nachweis von *Mycoplasma pneumoniae* DNA verfügbar und das sog. "CAP-Panel", zumindest bezüglich der bakteriellen Erreger, für die ein NAT-gestützter Nachweis in vielen Fällen sinnvoll sein kann, weitgehend abgedeckt.

Die Konzeption und Auswertung des neuen *Mycoplasma pneumoniae*-spezifischen Ringversuchs erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit **Herrn Professor Jacobs** vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2007:

Entsprechend des Grundgedankens unserer Ringversuchsaktivitäten wurde auch bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum "Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)" bei einigen Zielorganismen der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig positiv zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befinden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 71102), *Bordetella pertussis* (Probe # 71207), *Helicobacter pylori* (Probe # 71304), EHEC (Probe # 71407), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 71502), *Legionella pneumophila* (Probe # 71606), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 71411). 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.

An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

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) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. 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 prozentualen 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 immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden. 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)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit etwas höherer Menge an Zielorganismen (# 71101, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), zwei Proben mit relativ geringer Menge (# 71104, *C. trachomatis*, $\sim 5 \times 10^2$ IFU/ml, und # 71102, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^2$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 71103), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *E. coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von 95 der insgesamt 101 Teilnehmer richtig positive Ergebnisse für die Probe # 71101 mit ca. 1×10^3 IFU/ml an *C. trachomatis* mitgeteilt. Die negative Probe # 71103 wurde jedoch von 10 Teilnehmern als "fraglich" klassifiziert und von einem Teilnehmer als positiv für *C. trachomatis* befundet.

Bei den beiden Proben mit relativ geringer Menge an Zielorganismen (# 71102 und # 71104) lagen die Richtigkeitsquoten für die positiven Ergebnisse etwas niedriger als bei Probe # 71101. Interessanterweise wurde die Probe # 71102 mit der geringsten Menge an Zielorganismen ($\sim 1 \times 10^2$ IFU/ml) nur von 8 Teilnehmern, die Probe # 71104 mit etwas höherer Menge an Zielorganismen ($\sim 5 \times 10^2$ IFU/ml) dagegen von 14 Teilnehmern als (falsch-) negativ befundet.

Auch wenn mit 1×10^2 IFU/ml an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht bzw. bei einigen Testsystemen sogar etwas unterschritten zu sein scheint, sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität solche falsch-negativen Ergebnisse Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden nur sporadisch beobachtet. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, daß wir diesmal keine der Ringversuchsproben mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Die von einigen Teilnehmern mitgeteilten Inhibitionsereignisse (vor allem bei der Probe # 71103) können daher nicht auf bestimmte Komponenten der Probenmatrix zurückgeführt werden.

Bei diesem Ringversuch gab einer der Teilnehmer die Verwendung von AMPLIFIED CT Testkits der Firma Gen-Probe an. Dieses Testsystem weist die erregerspezifischen RNA-Zielsequenzen 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 wird, so wurde von diesem Teilnehmer zumindest die Probe # 71101 mit ca. 1×10^3 IFU/ml an *C. trachomatis* erfolgreich detektiert. Da dieses Ringversuchsprogramm jedoch explizit auf den DNA-Nachweis abzielt (siehe "Informationen zur Testdurchführung" im INSTAND-Begleitheft) und auch lediglich für diesen Zweck konzipiert und evaluiert wurde, kann in diesem Zusammenhang leider keine Gewähr für ein erfolgreiches Abschneiden mit kommerziellen RNA-gestützten Amplifikations- und Detektionsverfahren gegeben werden.

Abgesehen von einer insgesamt etwas geringeren analytischen Sensitivität des BD ProbeTec Testsystems bei Probe # 71102 (die aufgrund der geringen Menge an Zielorganismen diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate einbezogen wurde), waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den kommerziellen ($n = 82$) und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen ($n = 15$) zu beobachten.

**PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis*
(RV 531) April 2007**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
71101	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
71102	(+)	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ² IFU/mL)
71103	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
71104	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 5x10 ² IFU/mL)

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

n = 101	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	71101	71102	71103	71104	71101	71102	71103	71104	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	95	87	1	83	n.d.	3	3	3	3
Negativ	2	8 ¹⁾	90	14	nein no	97	94	89	95
Fraglich <i>Questionable</i>	4	6	10	4	ja yes	1	4	9	3

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 = 26)	74	74 / 76 [§]	97	22	22 / 23 [§]	96
In house PCR assay [28] (n = 15)	39	39 / 42 [§]	93	13	13 / 13 [§]	100
BD ProbeTec [24] (n = 14)	33	33 / 40 [§]	83	12	12 / 12 [§]	100
Roche Amplicor [22] (n = 6)	18	18 / 18	100	6	6 / 6	100
Other commercial tests [27] (n = 18)	49	49 / 50 [§]	98	16	16 / 16 [§]	100
GenProbe AMPLIFIED [21] (n = 1)	1	1 / 3	33	1	1 / 1	100
RealArt CT [25] (n = 15)	43	43 / 44 [§]	98	14	14 / 14 [§]	100
AmpliWell CT [26] (n = 3)	9	9 / 9	100	3	3 / 3	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	11	11 / 11 [§]	100	3	3 / 3 [§]	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.

§ Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

¹⁾ 8 of the 101 participants reported negative results for sample # 71102. Due to the low number of target organisms, we have not rated it as "false-negative", but the participant may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assay.

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reitschl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>

531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* 04.2007
 Reitschl / Straube

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Legend:
 13 71101 T₀ 36,45
 14 71102 39,29
 15 71103 38,02
 16 71104 38,02
 17 Positive *C. trachomatis* 27,99
 18 Negative control

C. trachomatis ompA gene [640 nm]
 T_m = 65°C

pos. control
 # 71101
 # 71102
 # 71103
 # 71104
 neg. control # 71103

Instructions:
 1. Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µl of PCR-grade water.
 2. Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
 3. Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

Regensburg

INSTAND-A10_I07

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reitschl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>

531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* 04.2007
 Reitschl / Straube

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Legend:
 13 71101 35,06
 14 71102 36,02
 15 71103 42,07
 16 71104 42,07
 17 Positive *C. trachomatis* 27,97
 18 Negative control

Chlamydia trachomatis hsp70 [640 nm]
 T_m = 49°C
 T_m = 48°C

pos. control
 # 71101
 # 71102
 # 71103
 # 71104
 neg. control # 71103

Instructions:
 1. Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µl of PCR-grade water.
 2. Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
 3. Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

Regensburg

INSTAND-A11_I07

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reitschl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>

531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* 04.2007
 Reitschl / Straube

Evaluation (qualitative PCR):

ROCHE COBAS AmpliCor *Chlamydia trachomatis*

71101	CT	+	***	POSITIVE
	CNC	3.704		POSITIVE
71102	CT	+	***	POSITIVE
	CNC	+	***	POSITIVE
71103	CT	0.007		NEGATIVE
	CNC	+	***	POSITIVE
71104	CT	3.704		POSITIVE
	CNC	+	***	POSITIVE

Instructions:
 1. Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µl of PCR-grade water.
 2. Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
 3. Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

Regensburg

INSTAND-A12_I07

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reitschl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>

531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* 04.2007
 Reitschl / Straube

Evaluation (qualitative PCR):

Becton Dickinson ProbeTec CT/GC

Probennummer	CT	GC	CT QC	GC QC
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK
71101	+	+		
71102	+	+		
71103	+	+		
71104	+	+		

Instructions:
 1. Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µl of PCR-grade water.
 2. Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
 3. Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

Regensburg

INSTAND-A13_I07