



Regensburg, den 19. Oktober 2005

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT**
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438 und 539 bis 540)

Dear Participant, dear Colleague,
Please find a cover letter in English on page 2 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

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 430 to 438 and 539 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 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" by April 2006.

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. Nach dem erfolgreichen Verlauf der aktuellen Probe-Ringversuche werden 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, Universitätsklinikum Salzburg, 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.

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 neu hinzukommenden 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

SEPTEMBER 2005:

Nachdem in einigen der vorhergegangenen Runden dieser Ringversuchs-Serie 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 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 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 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 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 431: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal zwei Proben mit höherer Menge an Zielorganismen (# 52102 und # 52103), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 52101), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 52104), die ausschließlich *E. coli* enthielt. Wurden bei den vorhergegangenen Ringversuchen noch durchwegs sehr hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Befunde ermittelt, so lagen diesmal vor allem bei der niedriger konzentrierten Probe # 52101 die Richtigkeitsquoten für die positiven Ergebnisse deutlich niedriger. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in der Probe # 52101 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 des jeweiligen NAT-gestützten Testsystems sein.

Im Gegensatz zur vorhergegangenen Runde dieses Ringversuchs gab es diesmal leider wieder 3 falsch-positive Ergebnisse für die negative Probe # 52104, was bei den betroffenen Teilnehmern auch indirekt für ein Versagen von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen sprechen könnte. Diese Problematik muß umso mehr hervorgehoben werden, da sich unter den 4 Proben des aktuellen Ringversuchs keine hochpositiven und damit kontaminationsträchtigen Einzelproben befanden

Inhibitionsereignisse wurden von keinem der insgesamt 83 Teilnehmer mitgeteilt. Die schwach positive Probe # 52101 ausgenommen, fanden sich unter den 332 mitgeteilten NAT-Ergebnissen 3 als "fraglich" eingestufte, 20 falsch-negative und 3 falsch-positive Ergebnisse. Ansonsten waren im Rahmen dieses Ringversuchs keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den kommerziellen (n = 67) und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen (n = 16) zu beobachten.

Bei den Ringversuchen RV 430 und RV 431 gaben insgesamt drei der Teilnehmer die Verwendung von AMPLIFIED 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 2 der insgesamt 5 positiven Proben doch auf die Anwesenheit von ausreichend hohen Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin. Interessanterweise konnten mit den AMPLIFIED Testkits im Rahmen der aktuellen Ringversuchsrunde aber nur diejenigen Proben mit mindestens 10^4 IFU / ml positiv getestet werden. Offensichtlich wurde mit dieser Erregermenge die untere Nachweisgrenze dieses Testsystems erreicht. Die niedriger konzentrierten Proben (# 52001, # 52002 und # 52101; *C. trachomatis* ~ 10^3 IFU/ml) konnten von keinem der 3 Teilnehmer mit dem AMPLIFIED Testkit der Firma Gen-Probe positiv getestet werden.

**PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis*
 (RV 431) September 2005**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
52101	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
52102	++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
52103	++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
52104	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 83	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	52101	52102	52103	52104		52101	52102	52103	52104
Befund <i>Result</i>									
Positiv	70	81	75	3	n.d.	2	2	2	2
Negativ	12	1	7	80	nein <i>no</i>	81	81	81	81
Fraglich <i>Questionable</i>	1	1	1	0	ja <i>yes</i>	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 = 36)	100	103 / 108	95	35	35 / 35	100
In house PCR assay [28] (n = 15)	40	40 / 45	88	14	14 / 15	93
BD ProbeTec [24] (n = 9)	25	25 / 27	93	9	9 / 9	100
Roche Amplicor [22] (n = 7)	21	21 / 21	100	7	7 / 7	100
Other commercial tests [27] (n = 8)	22	22 / 24	92	7	7 / 8	87
GenProbe AMPLIFIED [21] (n = 2)	4	4 / 6	66	2	2 / 2	100
RealArt CT [25] (n = 10)	25	25 / 30	83	9	9 / 10	90
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 3	66	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>



431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 09.2005

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

5	RV 52101	36,82
6	RV 52102	34,76
7	RV 52103	36,14
8	RV 52104	
9	Pos Chr 10E3	29,27
10	Neg control	

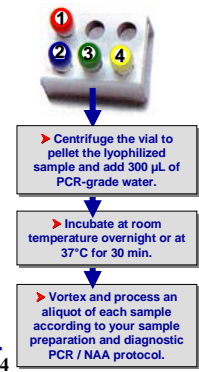
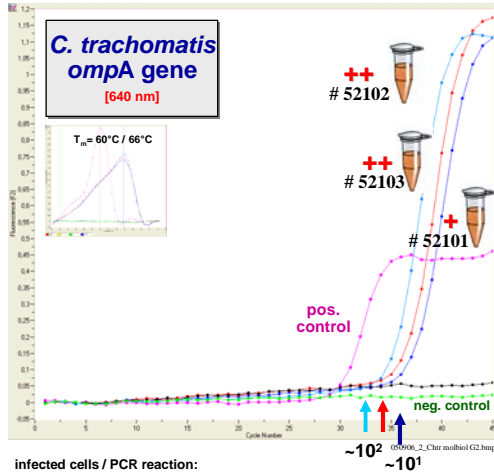


LightCycler PCR protocol:
 Proprietary *C. trachomatis*-specific
 LightCycler assay developed by
 TIB Molbiol, Berlin, Germany
 (<http://www.tib-molbiol.de>)



C. trachomatis:
 SET: 98

INSTAND-A11_II/05



U. Reischl/RIMMH/09.2005



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>



431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 09.2005

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

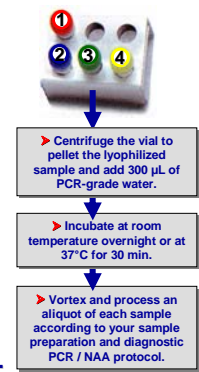
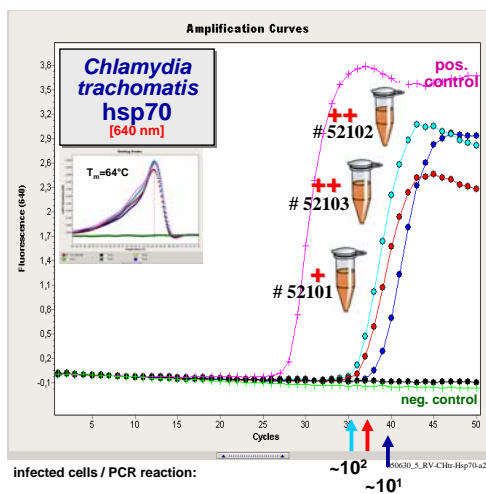
Reischl / Straube

✓	5	52101	37,11
✓	6	52102	34,69
✓	7	52103	35,11
✓	8	52104	
✓	9	Pos control	26,30
✓	10	Neg 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.

INSTAND-A12_II/05



U. Reischl/RIMMH/09.2005



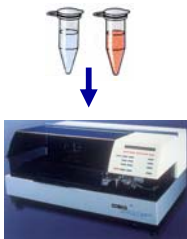


431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 09.2005

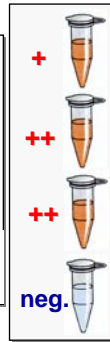
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

**ROCHE
 COBAS Amplicor
*Chlamydia trachomatis***



S 52101	CT	*.***	___	POSITIVE
	CNC	*.***	___	POSITIVE
S 52102	CT	*.***	___	POSITIVE
	CNC	*.***	___	POSITIVE
S 52103	CT	*.***	___	POSITIVE
	CNC	*.***	___	POSITIVE
S 52104	CT	0.003	___	NEGATIVE
	CNC	*.***	___	POSITIVE



- 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/09.2005



INSTAND-A13_II /05



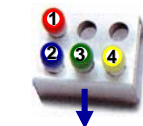
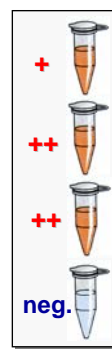
431 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 09.2005

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	GC	CT QC	GC QC
52101	⊕+	⊖		
52102	⊕+	⊖		
52103	⊕+	⊖		
52104	⊖	⊖		
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/RIMM/09.2005



INSTAND-A14_II /05