



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 27. Oktober 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 2 of this document and
tables with the results in a bilingual style after the discussion in German language.*

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

SEPTEMBER 2006:

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* (Proben # 62003, # 62102, und # 62103), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 62001), EHEC (Probe # 62401), *Legionella pneumophila* (Probe # 62601), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Proben # 63412 und # 63414). 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.

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 prozentuellem 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)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

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

Trotz der relativ geringen Erregermenge in zwei der drei positiven Proben führte die Verfügbarkeit gut evaluierter und z.T. automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für beide Zielorganismen 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* (# 62003), eine Probe mit relativ geringer Menge an *N. gonorrhoeae* (# 62104), eine Probe mit *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (# 62001) sowie eine Probe ohne diese beiden Zielorganismen (# 62002).

Unter den von 85 Teilnehmern mitgeteilten 340 NAT-Ergebnissen fanden sich für *Chlamydia trachomatis* insgesamt nur 1 falsch-positives Ergebnis (das vermutlich durch laborinterne Kontaminationsereignisse hervorgerufen wurde) und 12 falsch-negative Ergebnisse. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden lediglich von zwei Teilnehmern für die negative Probe # 62002 ein falsch-positives Ergebnis mitgeteilt und 6 der 85 Teilnehmer konnten mit ihrem jeweiligen Testsystem in der Probe # 62004 (*N. gonorrhoeae*, 1×10^4 CFU/ml) keine Gonokokken DNA nachweisen. Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von 84 der 85 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet. Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche Amplicor, COBAS Amplicor, dem Becton Dickinson ProbeTec, Artus RealArt, 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 # 62001, 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 bezüglich der falsch-positiven Ergebnisse erneut im Durchschnitt etwas schlechter ab als die Gruppe der Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen. Ein Teilnehmer gab bei diesem Ringversuch die Verwendung des AMPLIFIED CT Testkits der Firma Gen-Probe an. Offensichtlich konnte diesmal mit den relativ geringen Mengen an Zielorganismen die untere Nachweisgrenze dieses RNA-gestützten Testsystems nicht erreicht werden.

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.

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
62001	+ / +	62	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 5x10 ³ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
62002	∅ / ∅	64	<i>Escherichia coli</i> K12
62003	+ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
62004	∅ / +	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)

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

n = 85	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	62001	62002	62003	62004	62001	62002	62003	62004	
Befund <i>Result</i>									
Positiv CT	2	1	74	0	n.d.	1	1	1	1
Positiv CT & GO	72	0	0	0	nein / no	84	84	84	84
Positiv GO	6	2	0	79	ja / yes	0	0	0	0
Negativ	4	82	8	6					
Fraglich / Questionable	1	0	3	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 = 33)	97	97 / 99	98	32	32 / 33	97
In house PCR assay [28] (n = 16)	48	48 / 48	100	15	15 / 16	94
BD ProbeTec [24] (n = 16)	43	43 / 48	90	16	16 / 16	100
Roche AmpliCor [22] (n = 8)	22	22 / 23 §	96	8	8 / 8	100
GenProbe Amplified CT [21] (n = 1)	0	0 / 1 §	0	1	1 / 1	100
RealArt CT [25] (n = 5)	15	15 / 15	100	5	5 / 5	100
Other commercial tests [27] (n = 10)	21	21 / 29 §	72	9	9 / 10	90
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	3	3 / 12	25	3	3 / 4	75

* 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.

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 09.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

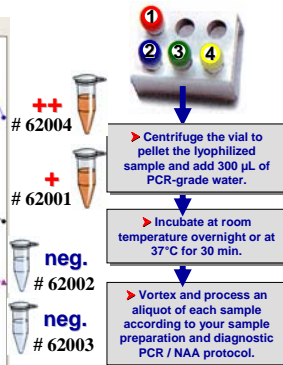
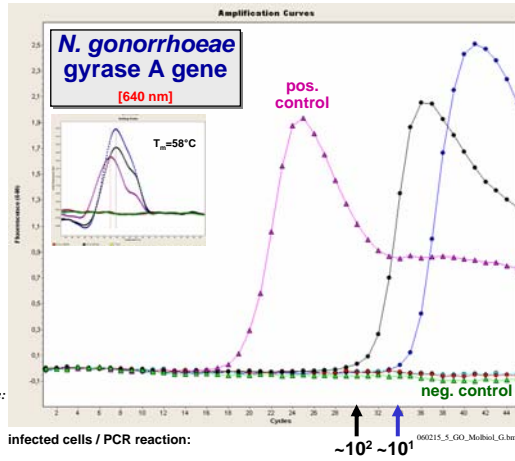
23	62001	33,54
24	62002	
25	62003	
26	62004	29,68
27	Positive <i>N.gonorrhoeae</i>	17,84
28	Negative control	



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



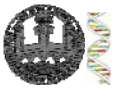
N. gonorrhoeae:
 SET: 97



U. Reischl/RIMMH/09.2006



IN STAND-A03_II/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 09.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

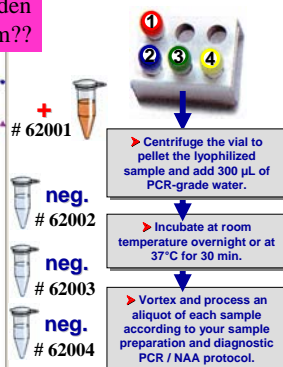
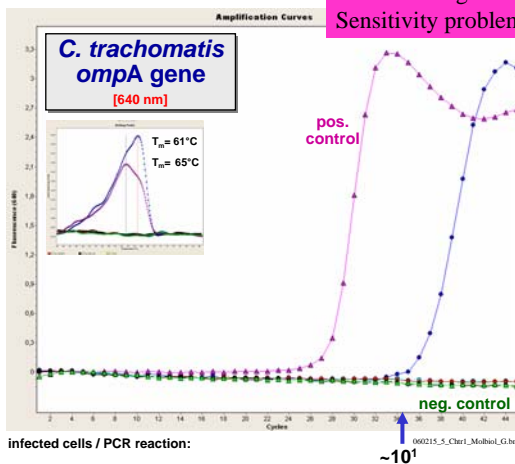
5	62001	35,10
6	62002	
7	62003	
8	62004	
17	Positive <i>C.trachomatis</i>	25,97
18	Negative control	



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



C. trachomatis:
 SET: 98



U. Reischl/RIMMH/09.2006



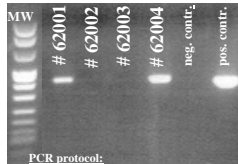
IN STAND-A04_II/06



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO status 09.2006

➤ **Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Straube

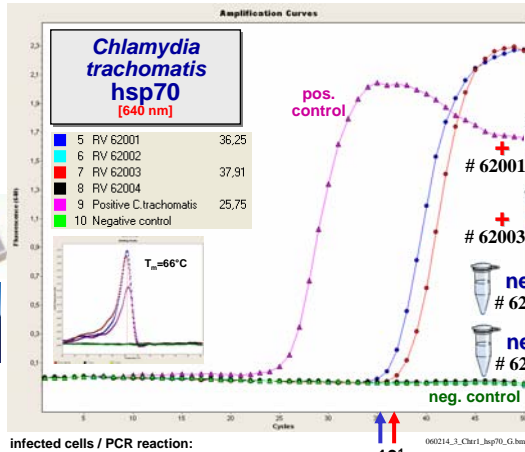


PCR protocol:
 Ho et al., J. Clin. Pathol., 1992, 45:439-442

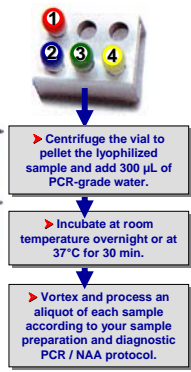
N. gonorrhoeae



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:



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-A05_II/06



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO status 09.2006

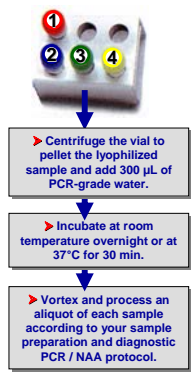
➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Straube

ROCHE COBAS Amplicor *N. gonorrhoeae*



S 62001	NG	*,***	—	POSITIVE	+
	CNC	*,***	—	POSITIVE	
S 62002	NG	0.002	—	NEGATIVE	neg.
	CNC	*,***	—	POSITIVE	
S 62003	NG	0.003	—	NEGATIVE	neg.
	CNC	*,***	—	POSITIVE	
S 62004	NG	*,***	—	POSITIVE	++
	CNC	*,***	—	POSITIVE	



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-A06_II/06



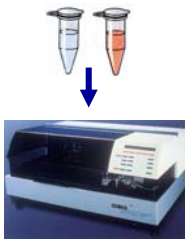
530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 09.2006

Evaluation (qualitative PCR):

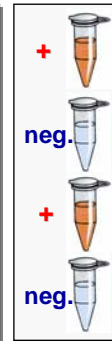
Reischl / Straube

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



S 62001	CT	*.***	±	POSITIVE
	CNC	*.***	±	POSITIVE
S 62002	CT	0.001	⊖	NEGATIVE
	CNC	*.***	✓	POSITIVE
S 62003	CT	*.***	±	POSITIVE
	CNC	*.***	±	POSITIVE
S 62004	CT	0.001	⊖	NEGATIVE
	CNC	*.***	✓	POSITIVE

000504_RV_SCAN_04.jpg + 000504_RV_SCAN_05.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/RIMMH/09.2006



INSTAND-A07_II/06



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 09.2006

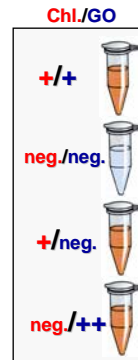
Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	GC	CT/QC	GC/QC
62001	⊕+	⊕+		
62002	⊖	⊖		
62003	⊕+	⊖		
62004	⊖	⊕+		
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK

000621_ProbeTec_Sep1_2006_01.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/RIMMH/09.2006



INSTAND-A08_II/06