



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 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit etwas höherer Menge an Zielorganismen (# 62104; *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml), zwei identische Proben mit geringer Menge (# 62102 und # 62103; *C. trachomatis*, je $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 62101), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *E. coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von 86 der insgesamt 88 Teilnehmer richtig positive Ergebnisse für die Probe # 62104 mit ca. 1×10^4 IFU/ml an *C. trachomatis* mitgeteilt. Die negative Probe # 62101 wurde jedoch von 3 Teilnehmern als "fraglich" klassifiziert und von 2 Teilnehmern als positiv für *C. trachomatis* befundet.

Bei den beiden identischen Proben mit relativ geringer Menge an Zielorganismen (# 62102 und # 62103) lagen die Richtigkeitsquoten für die positiven Ergebnisse etwas niedriger als bei Probe # 62104. Interessanterweise wurde Probe # 62102 ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml) von 81 und Probe # 62103 ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml) nur von 76 der insgesamt 88 Teilnehmer als positiv befundet. Auch wenn mit 1×10^3 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 allen Teilnehmern durchgeführt und Inhibitionsergebnisse wurden lediglich von 3 der insgesamt 88 Teilnehmern und hier nur für die negative Probe # 62101 mitgeteilt.

Bei diesem Ringversuch gaben 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 wird, so wurde von diesen Teilnehmern zumindest die Probe # 62104 mit ca. 1×10^4 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 konzipiert und evaluiert wurde, kann in diesem Zusammenhang leider keine Gewähr für ein erfolgreiches Abschneiden mit kommerziellen RNA-gestützten Amplifikations- und Detektionsverfahren gegeben werden.

Ansonsten waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den kommerziellen ($n = 73$) und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen ($n = 15$) zu beobachten.

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



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

Gruppe A	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
62101	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
62102	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
62103	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
62104	++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)

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

<i>n = 88</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	62101	62102	62103	62104		62101	62102	62103	62104
Befund <i>Result</i>									
Positiv	2	81	76	86	n.d.	0	0	0	0
Negativ	83	5	9	2	nein <i>no</i>	85	88	87	88
Fraglich <i>Questionable</i>	3	2	3	0	ja <i>yes</i>	3	0	1	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 = 29)	86	86 / 87	99	28	28 / 29	97
In house PCR assay [28] (n = 11)	29	29 / 33	88	11	11 / 11	100
BD ProbeTec [24] (n = 12)	32	32 / 34 §	94	12	12 / 12	100
Roche Amplicor [22] (n = 5)	14	14 / 14 §	100	5	5 / 5	100
Other commercial tests [27] (n = 15)	44	44 / 44 §	100	14	14 / 15	93
GenProbe AMPLIFIED [21] (n = 3)	4	4 / 9	44	3	3 / 3	100
RealArt CT [25] (n = 12)	33	33 / 35 §	94	12	12 / 12	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	3	3 / 6	50	2	2 / 2	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.

Comments: ---



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 09.2006

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

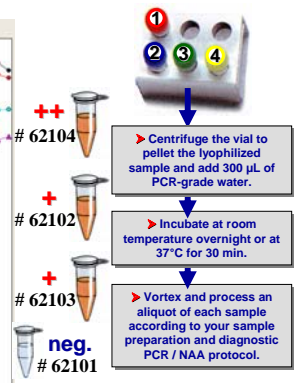
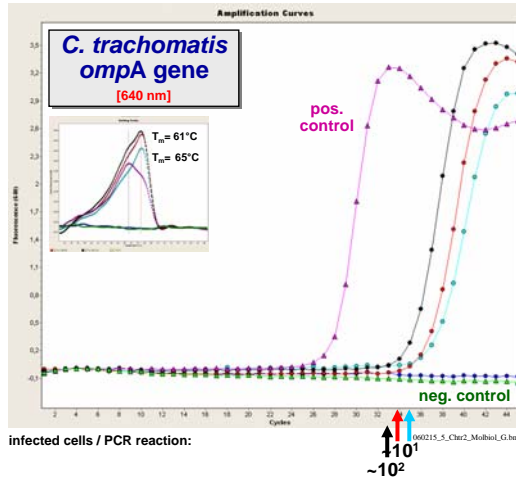
13	62101	
14	62102	35,83
15	62103	35,08
16	62104	33,65
17	Positive <i>C. trachomatis</i>	25,97
18	Negative control	



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



C. trachomatis:
 SET: 98



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-A011_II/06



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 09.2006

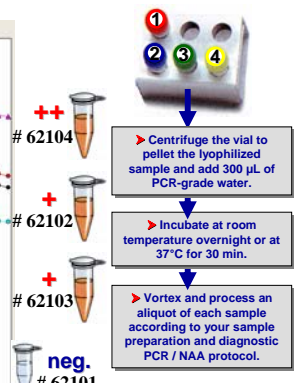
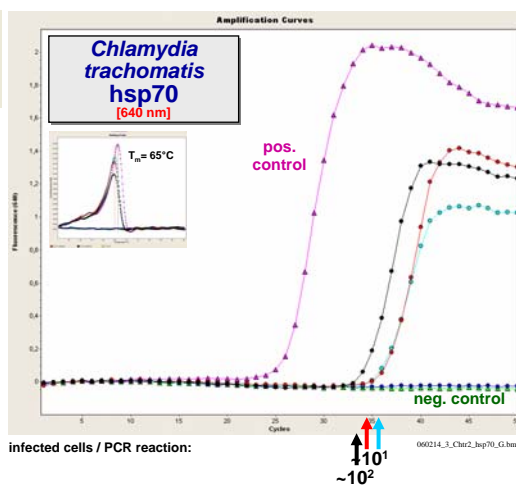
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

9	Positive <i>C. trachomatis</i>	25,75
10	Negative control	
15	PV 62101	
16	PV 62102	35,54
17	PV 62103	36,10
18	PV 62104	33,87



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.



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-A012_II/06



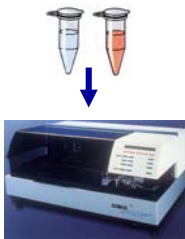
531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 09.2006

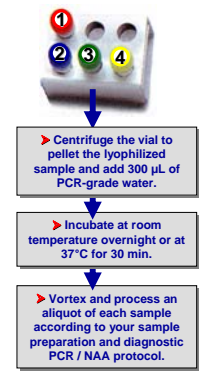
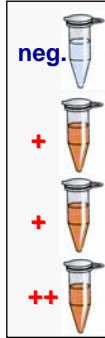
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

**ROCHE
 COBAS Amplicor
 Chlamydia trachomatis**



S 62101	CT 0.001	⊖	NEGATIVE
	CNC *.***	✓	POSITIVE
S 62102	CT *.***	⊕	POSITIVE
	CNC *.***	⊕	POSITIVE
S 62103	CT *.***	⊕	POSITIVE
	CNC *.***	⊕	POSITIVE
S 62104	CT *.***	⊕	POSITIVE
	CNC *.***	⊕	POSITIVE



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-A13_II/06



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

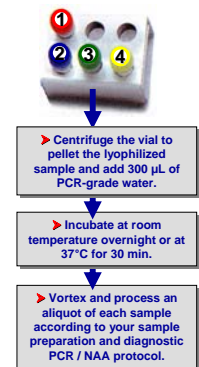
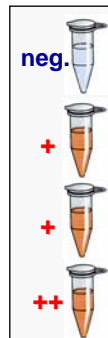
status 09.2006

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	GC	/	CT QC	GC QC
62101	⊖	⊖			
62102	⊕+	⊖			
62103	⊕+	⊖			
62104	⊕+	⊖			
QC- (3273598)				OK	OK
QC+ (3273598)				OK	OK



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-A14_II/06