



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 19. Oktober 2007

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 541)**

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find a cover letter in English on page 16 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, Prof. Dr. E. Jacobs

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 ab April 2008 einen zusätzlichen Ringversuch **RV 541 "Mycoplasma pneumoniae"** anbieten. Interessierte Laboratorien konnten sich bereits im Vorfeld bei INSTAND e.V. für die Teilnahme an einem Probe-Ringversuch anmelden von dem diesmal nur eine limitierte Anzahl von Probensets verfügbar war. Eine kurze Diskussion dieses Probe-Ringversuchs findet sich in dieser Auswertung. Nach der erfolgreichen Evaluierung wird 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. Damit ist 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.

Angesichts der wachsenden Zahl an einzelnen und damit auch individuell zu diskutierenden Ringversuchen werde ich mich zukünftig bemühen, den Umfang dieser turnusmäßigen Ringversuchsauswertung in überschaubaren Grenzen zu halten und dabei dennoch versuchen alle essentiellen Informationen für die einzelnen Teilnehmer darzustellen. Ich hoffe, daß dies in zufriedenstellender Weise gelingen wird und freue mich natürlich auf jede Art von Rückmeldung aus dem Kreis der geschätzten Ringversuchsteilnehmer.

Aufgrund der überraschend hohen Anzahl an Teilnehmern wurden bei diesem Ringversuch für einige der angebotenen Parameter zwei unterschiedliche Gruppen von Probensets ausgesandt. Diese beiden Gruppen sind in den entsprechenden Tabellen separat aufgeführt und statistisch ausgewertet. Im Rahmen dieser Diskussion werden die beiden Gruppen aber nur dann gesondert diskutiert, wenn irgendwelche Auffälligkeiten in der Testperformance zu beobachten waren.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

SEPTEMBER 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* (Proben # 72002, # 72102, # 72103), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 72001), *Bordetella pertussis* (Probe # 72201 und 72207), *Helicobacter pylori* (Probe # 72303), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 72502 und # 72504), MRSA (Proben # 72901), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 72414) sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 72422). 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 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 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 530: *Neisseria gonorrhoeae* & *Chlamydia trachomatis*

Trotz der relativ geringen Erregermenge in den drei positiven Proben führte die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil 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 zwei Proben mit relativ geringer Menge an beiden Zielorganismen *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (# 72001 und # 72004), eine Probe mit relativ geringer Menge an *C. trachomatis* (# 72002) sowie eine Probe ohne beide Zielorganismen (# 72003).

Unter den von insgesamt 97 Teilnehmern mitgeteilten 388 NAT-Ergebnissen fanden sich für *Chlamydia trachomatis* insgesamt 28 falsch-negative Ergebnisse (die vermutlich durch die analytische Sensitivität des jeweiligen Testsystems begründet waren), keine falsch-positiven und 2 als "fraglich" klassifizierte Ergebnisse. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden diesmal keine falsch-positiven und lediglich 8 falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von 95 der 97 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet. Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche Amplicor, COBAS Amplicor, dem Becton Dickinson ProbeTec, RealArt CT, 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. Angesichts der relativ geringen Mengen an Zielorganismen in den positiven Proben und abgesehen von einigen "Ausreißern" 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. Die auffällig niedrige Richtigkeitsquote bei positiven Ergebnissen für das manuelle Roche Amplicor CT Testsystem sollte angesichts der geringen Anzahl von Teilnehmern ($n = 3$) in diesem Zusammenhang nicht überbewertet werden. Entsprechende Zertifikate wurden diesmal 90 Teilnehmern erteilt.

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 Inhibitor der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt.

**PCR-/NAT *C. trachomatis* & GO
 (RV 530) September 2007**

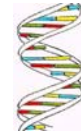


Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.

Sample composition and expected results.

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
72001	+ / +	62	Chlamydia trachomatis (~ 1x10 ³ IFU/mL) & Neisseria gonorrhoeae (~ 1x10 ² CFU/mL)
72002	+ / \emptyset	61	Chlamydia trachomatis (~ 1x10 ³ IFU/mL)
72003	\emptyset / \emptyset	64	Escherichia coli K12
72004	+ / +	62	Chlamydia trachomatis (~ 1x10 ³ IFU/mL) & Neisseria gonorrhoeae (~ 1x10 ³ CFU/mL)

Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.

Absolute numbers of reported individual results.

n = 97	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	72001	72002	72003	72004		72001	72002	72003	72004
Befund Result									
Positiv CT	4	89	0	2	n.d.	2	2	2	2
Positiv CT & GO	87	0	0	79	nein / no	95	95	95	95
Positiv GO	3	0	0	16	ja / yes	0	0	0	0
Negativ	2	7	97	0					
Fraglich / Questionable	1	1	0	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 = 41)	118	118 / 123	96	41	41 / 41	100
In house PCR assay [28] (n = 16)	37	37 / 48	77	16	16 / 16	100
BD ProbeTec [24] (n = 16)	37	37 / 47 §	79	16	16 / 16	100
Roche AmpliCor [22] (n = 2)	3	3 / 5 §	60	2	2 / 2	100
AmpliWell CT [26] (n = 11)	33	33 / 33	100	11	11 / 11	100
RealArt CT [25] (n = 3)	6	6 / 9	67	3	3 / 3	100
Other commercial tests [27] (n = 13)	34	34 / 39	87	13	13 / 13	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	6	6 / 9	67	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.

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, F.JS-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* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

N. gonorrhoeae gyrase A gene [640 nm]

Amplification Curves

Legend:
 1 72001 Tb 35,66
 2 72002 31,56
 3 72003 31,56
 4 72004 36,20
 5 Positive Go 10² 36,20
 6 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

Infected cells / PCR reaction: -10² 10¹

Reagents: # 72001, # 72004, # 72002, # 72003, pos. control, neg. control

Procedures:
 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-A03_II07

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, F.JS-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* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

***C. trachomatis ompA* gene [640 nm]**

Amplification Curves

Legend:
 7 72001 Tb +41,0X
 9 72002 +41,0X
 10 72003 40,80
 11 Positive *C. trachomatis* 29,75
 12 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

Infected cells / PCR reaction: -10¹

Reagents: # 72001, # 72002, # 72004, # 72003, pos. control, neg. control

Procedures:
 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-A04_II07

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, F.JS-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* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

***C. trachomatis hsp70* [640 nm]**

Amplification Curves

Legend:
 7 72001 35,57
 8 72002 36,09
 9 72004 27,89
 11 Positive *C. trachomatis* 27,89
 12 Negative control

LightCycler PCR protocol:
 World Health Organization (WHO) Rapid Detection and Specificity of Chlamydia Infections in Genital Specimens by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Reischl, U., Wörner, C., and Ullrich, T., eds.), Springer Press, Heidelberg, pp. 115-132.

N. gonorrhoeae

Infected cells / PCR reaction: -10¹

Reagents: # 72001, # 72002, # 72004, # 72003, pos. control, neg. control

Procedures:
 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-A05_II07

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, F.JS-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* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (qualitative PCR):

ROCHE COBAS Amplicor *C. trachomatis* + *N. gonorrhoeae*

ChI/GO

72001	CT +,***	POSITIVE
	CNC 3,704	POSITIVE
	NG +,***	POSITIVE
72002	CT +,***	POSITIVE
	CNC 3,704	POSITIVE
	NG 0,008	NEGATIVE
72003	CT 0,006	NEGATIVE
	CNC +,***	POSITIVE
	NG 0,008	NEGATIVE
72004	CT +,***	POSITIVE
	CNC +,***	POSITIVE
	NG +,***	POSITIVE

Infected cells / PCR reaction: +/+, +/neg, neg/neg, +/++

Procedures:
 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-A06_II07

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, F.JS-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* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (qualitative PCR):

Becton Dickinson ProbeTec CT/GC

Probennummer	CT	GC	CT/GC	GC/GC
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK
72001	+	+		
72002	+	+		
72003	-	-		
72004	+	+		

72004 nicht detektiert

ChI/GO

Reagents: +/+, +/neg, neg/neg, +/++

Procedures:
 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-A07_II07