



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 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal zwei Probe mit relativ geringer Menge an Zielorganismen (# 72102 und # 72103, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 72101 und # 72104), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *E. coli* enthielten. Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von 79 der insgesamt 85 Teilnehmer richtig positive Ergebnisse für die Probe # 72102 und von 82 Teilnehmern richtig positive Ergebnisse für die Probe # 72102 mitgeteilt. Eine der beiden negativen Proben (# 72104) wurde von einem Teilnehmer als positiv für *C. trachomatis* befundet (was vermutlich durch ein laborinternes Kontaminationsereignis hervorgerufen wurde). Angesichts der relativ geringen Mengen an Zielorganismen lagen die Richtigkeitsquoten für die positiven Ergebnisse dennoch in einem durchaus akzeptablen Bereich. 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 bzw. einer Optimierung des entsprechenden Verfahrens zur DNA-Präparation aus den Ringversuchsproben geben.

Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden bei keiner der untersuchten Proben beobachtet.

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 im Rahmen der vergangenen Ringversuche mit diesem Testsystem zumindest eine untere Nachweisgrenze von ca. 1×10^4 IFU/ml an *C. trachomatis* zuverlässig erreicht. Leider lagen die Proben des aktuellen Ringversuchs eine Zehnerpotenz unter diesem Schwellenwert. Da unser 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.

Bei diesem Ringversuch waren 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. Entsprechende Zertifikate wurden diesmal 83 Teilnehmern erteilt.

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
72101	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
72102	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
72103	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
72104	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 85	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	72101	72102	72103	72104		72101	72102	72103	72104
Befund <i>Result</i>									
Positiv	0	79	82	1	n.d.	0	0	0	0
Negativ	85	6	3	84	nein <i>no</i>	85	85	85	85
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	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 = 20)	38	38 / 40	95	39	39 / 40	98
In house PCR assay [28] (n = 15)	28	28 / 30	93	30	30 / 30	100
BD ProbeTec [24] (n = 12)	22	22 / 24	92	24	24 / 24	100
Roche Amplicor [22] (n = 5)	10	10 / 10	100	10	10 / 10	100
Other commercial tests [27] (n = 19)	37	37 / 38	97	38	38 / 38	100
GenProbe AMPLIFIED [21] (n = 1)	0	0 / 2	0	2	2 / 2	100
RealArt CT [25] (n = 10)	19	19 / 20	95	20	20 / 20	100
AmpliWell CT [26] (n = 2)	4	4 / 4	100	4	4 / 4	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	6 / 6	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.

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>

531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Legend:
 19 72101 Tb 37,15
 20 72102 21 72103 22 72104
 23 Positive *C. trachomatis* 26,83
 24 Negative control

Amplification Curves
***C. trachomatis ompA* gene**
 [640 nm]
 T_m = 69°C

Infected cells / PCR reaction:
 -10¹

Legend:
 17 Positive *C. trachomatis* 27,37
 18 Negative control
 19 72101
 20 72102
 21 72103
 22 72104

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

C. trachomatis SET: 98

Regensburg

U. Reischl/IRMB/109.2007

INSTAND-A10_II/07

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>

531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Legend:
 17 Positive *C. trachomatis* 27,37
 18 Negative control
 19 72101
 20 72102
 21 72103
 22 72104

Amplification Curves
Chlamydia trachomatis hsp70
 [640 nm]
 T_m = 69°C
 T_m = 64°C

Infected cells / PCR reaction:
 -10¹

LightCycler PCR protocol:
 Wenzl W., U. Reischl, and R. Puffing (2001) Rapid detection and quantification of *Chlamydia trachomatis* genital specimens by LightCycler PCR. In: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Reischl, U., Wenzl, C., and Coker, F., eds.) ISBN 3-540-41861-4. Springer Press, Heidelberg, pp 115-112.

Regensburg

U. Reischl/IRMB/109.2007

INSTAND-A11_II/07

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>

531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (qualitative PCR):

ROCHE COBAS AmpliCor *Chlamydia trachomatis*

S 72101	CT 0.006	NEGATIVE
	CNC *	POSITIVE
S 72102	CT *	POSITIVE
	CNC *	POSITIVE
S 72103	CT *	POSITIVE
	CNC *	POSITIVE
S 72104	CT 0.006	NEGATIVE
	CNC 3.705	POSITIVE

Regensburg

U. Reischl/IRMB/109.2007

INSTAND-A12_II/07

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>

531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* 09.2007
 Reischl / Straube

Evaluation (qualitative PCR):

Becton Dickinson ProbeTec CT/GC

Probennummer	CT	GC	CT QC	GC QC
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK
72101	+	+		
72102	+	+		
72103	+	+		
72104				

Regensburg

U. Reischl/IRMB/109.2007

INSTAND-A13_II/07