



Regensburg, den 23.5.2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a brief discussion (NEW !) of the current results in English after the German version on the following pages. As usual, tables with the results are 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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

May 23, 2008

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 541)

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.instandev.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. 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. **New in 2008:** due to the growing number of international participants, we will further include a brief discussion of the results in English (see the following pages).

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).

If you should have any further questions, please do not hesitate to contact me by e-mail: "udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de"

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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2008:

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 befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 81101), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 81003), *Helicobacter pylori* (Probe # 81304), EHEC (Probe # 81402), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 81504), *Legionella pneumophila* (Probe # 81604), *Salmonella enterica* (Probe # 81704), *Listeria monocytogenes* (Probe # 81803), sowie *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila) pneumoniae* (Probe # 81412). 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. **Rückstellprobensätze können bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden.**

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. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

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

Trotz der relativ geringen Erregermenge in drei der vier 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 eine Probe mit relativ geringer Menge an beiden Zielorganismen *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (# 81004), eine Probe mit etwas höherer Menge an *N. gonorrhoeae* (# 81002), eine mit relativ geringer Menge an *N. gonorrhoeae* (# 81003), sowie eine Probe mit relativ geringer Menge an *C. trachomatis* (# 81001). Unter den von 104 Teilnehmern mitgeteilten 416 NAT-Ergebnissen fanden sich für *Chlamydia trachomatis* insgesamt nur ein falsch-positives Ergebnis (das vermutlich durch ein laborinternes Kontaminationsereignis hervorgerufen wurde) und 8 falsch-negative Ergebnisse. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden diesmal hingegen von 9 Teilnehmern für die positiven Proben # 81002 bzw. # 81004 und für die schwach positive Probe # 81003 sogar von 53 der insgesamt 104 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Aufgrund der sehr geringen Menge an Zielorganismen wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die Probe # 81003 hier nicht als "falsch-negativ" bewertet.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von 101 der 104 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden lediglich mit dem Testsystem eines Teilnehmers 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. Mit Ausnahme der Probe # 81003, die diesmal sehr geringe Mengen an Gonokokken enthielt, wurden mit diesen kombinierten Testsystemen insgesamt relativ hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Dies wird auch in der Tabelle 4 deutlich, in der diesmal der Übersichtlichkeit halber nur die *C. trachomatis*-spezifischen Ergebnisse statistisch ausgewertet wurden. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Roche COBAS TaqMan (3x), GeneProof Ch.trachomatis PCR Kit- Rotor Gene (2x), BAG Hyplex Ct (1x) und LightMix TibMolbiol (1x).

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.

Brief discussion of the current results (English version) for the growing number of international participants:

RV 530: *Neisseria gonorrhoeae* & *Chlamydia trachomatis* (GO & CT)

The current set of QC samples contained one sample with a relatively low amount of both target organisms *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (# 81004), one sample with a slightly higher amount of *N. gonorrhoeae* (# 81002), one sample with a relatively low amount of *N. gonorrhoeae* (# 81003), and one sample with a relatively low amount of *C. trachomatis* (# 81001).

Among the *Chlamydia trachomatis*-specific results reported by the 104 participants, only one false-positive (presumably caused by a cross-contamination event) and 8 false-negative results were observed. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 9 participants for samples # 81002 and # 81004 - the weak-positive sample # 81003 was tested negative by 53 of the 104 participants. Obviously we have touched the lower limit of detection for several commercial and *in-house* PCR assays with the latter sample.

**PCR-/NAT *C. trachomatis* & GO
 (RV 530) April 2008**



Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.

Sample composition and expected results.

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
81001	+ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
81002	∅ / +	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
81003	∅ / +	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ² CFU/mL)
81004	+ / +	62	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 5x10 ² CFU/mL)

Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.

Absolute numbers of reported individual results.

n = 104	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	81001	81002	81003	81004	81001	81002	81003	81004	
Befund Result									
Positiv CT	97	0	0	5	n.d.	2	2	2	2
Positiv CT & GO	0	1	0	95	nein / no	101	101	101	101
Positiv GO	0	100	49	0	ja / yes	1	1	1	1
Negativ	6	2	53 ¹⁾	2					
Fraglich / Questionable	1	1	2	2					

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 = 37)	136	136 / 147 §	93	0	0 / 0	100
BD ProbeTec [24] (n = 23)	74	74 / 92	80	0	0 / 0	100
In house PCR assay [28] (n = 18)	57	57 / 67 §	85	0	0 / 0	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 14)	40	40 / 56	71	0	0 / 0	100
Other commercial tests [27] (n = 13)	43	43 / 52	63	0	0 / 0	100
LightMix CT/NG [21] (n = 5)	16	16 / 20	80	0	0 / 0	100
Roche AmpliCor [22] (n = 3)	12	12 / 12	100	0	0 / 0	100
Artus CT [25] (n = 1)	4	4 / 4	100	0	0 / 0	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	4	4 / 7 §	57	0	0 / 0	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: ¹⁾ 53 of the 104 participants reported negative results for sample # 81003. Due to the low number of target organisms, we have not rated them as "false-negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

Tabelle 4: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden (Anmerkung: in dieser Tabelle sind nur die Ergebnisse für *Chlamydia trachomatis* dargestellt) .

Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods (Note: only the C. trachomatis-specific results are depicted in this table).

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 = 37)	61	61 / 62	98	62	62 / 62	100
BD ProbeTec [24] (n = 23)	43	43 / 46	93	45	45 / 46	98
In house PCR assay [28] (n = 18)	35	35 / 36	97	35	35 / 36	97
Abbott RealTime CT/NG [26] (n =14)	28	28 / 28	100	28	28 / 28	100
Other commercial tests [27] (n = 13)	25	25 / 26	96	26	26 / 26	100
LightMix CT/NG [21] (n = 5)	10	10 / 10	100	10	10 / 10	100
Roche Amplicor [22] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	6 / 6	100
Artus CT [25] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	2	2 / 4	50	4	4 / 4	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>



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

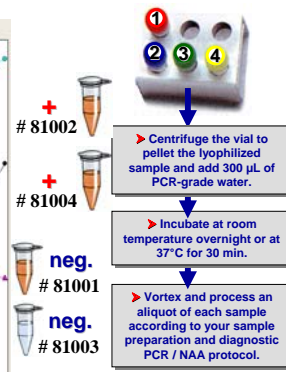
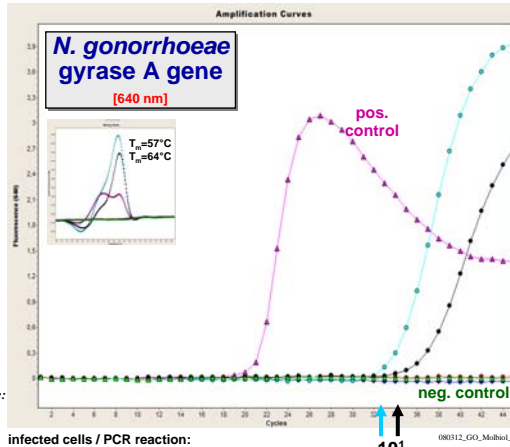
- 1 81001 32,97
- 2 81002 35,71
- 3 81003 19,20
- 4 81004
- 5 Pos. Contit. NG
- 6 NTC



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



N. gonorrhoeae:
 SET: 97



INSTAND-A03_I/08



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 04.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

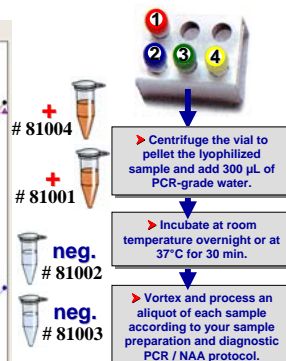
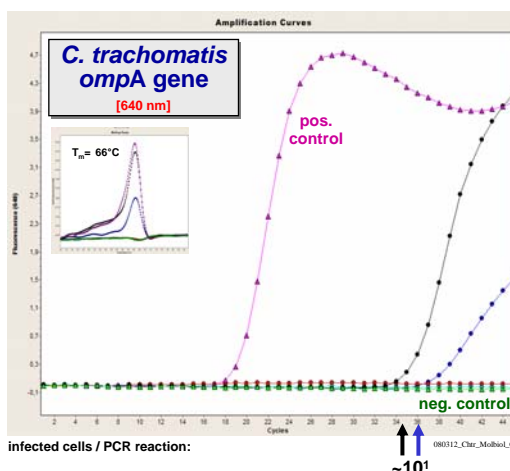
- 7 81001 36,31
- 8 81002
- 9 81003
- 10 81004 34,29
- 11 Pos. Contit. Chl. tr 17,78
- 12 NTC



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-A04_I/08



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2008

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

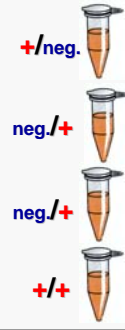
**ROCHE
 COBAS Amplicor
C. trachomatis +
*N. gonorrhoeae***



81001	CT	*.***	___	POSITIVE
	NG	0.002	___	NEGATIVE
	CNC	*.***	___	POSITIVE
81002	CT	0.001	___	NEGATIVE
	NG	*.***	___	POSITIVE
	CNC	*.***	___	POSITIVE
81003	CT	0.002	___	NEGATIVE
	NG	*.***	___	POSITIVE
	CNC	*.***	___	POSITIVE
81004	CT	*.***	___	POSITIVE
	NG	*.***	___	POSITIVE
	CNC	*.***	___	POSITIVE

Cobas_C_trachomatis

Chl./GO



- 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.

Regensburg



INSTAND-A05_I/08



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2008

➤ Evaluation (qualitative PCR):

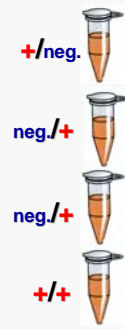
Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	GC	CT QC	GC QC
QC- (3273598)			OK	OK
QC+ (3273598)			OK	OK
81001	⊕+	⊖		
81002	⊖	⊕+		
81003	⊖	⊖		
81004	⊖⊕	⊖⊕		

ProbeTec_1-2008

Chl./GO



- 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.

Regensburg



INSTAND-A06_I/08