



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 beigegeführten 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 prozentualen 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 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei Proben mit identischer (wenn auch relativ geringer) Menge an Zielorganismen (# 81101, # 81102, # 81104, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 81103), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei der Probe # 81101 von 6 Teilnehmern und bei den Proben # 81102 sowie # 81104 lediglich von je 3 der insgesamt 112 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Die negative Probe # 81103 wurde diesmal von allen Teilnehmern als richtig negativ befundet und unter den insgesamt 448 mitgeteilten Ergebnissen wurden nur 2 als "fraglich" klassifiziert.

Auch wenn mit 1×10^3 IFU/ml an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht zu sein scheint, sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität falsch-negative Ergebnisse Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Angesichts der aktuellen Diskussion um das "poolen" von Untersuchungsmaterial gewinnt auch der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme wohl noch zusätzlich an Bedeutung. Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden nur sporadisch beobachtet. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, daß wir diesmal keine der Ringversuchsproben mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Das von einem Teilnehmer mitgeteilte Inhibitionsereignis (bei der Probe # 81101) kann daher nicht auf bestimmte Komponenten der Probenmatrix zurückgeführt werden. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen zu beobachten. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Roche COBAS TaqMan (19x), GeneProof Ch.trachomatis PCR Kit- Rotor Gene (2x) und BAG Hyplex Ct (2x).

Kommentar zum "poolen" von klinischem Probenmaterial für anschließende NAT-Untersuchungen von Univ.-Prof. Dr. Eberhard Straube (Universitätsklinikum Jena, Konsiliarlaboratorium für Chlamydien): Das "poolen" von Untersuchungsproben zum Nachweis von Erregern mittels Nukleinsäure-Amplifikations-Tests (NAT) ist nur gerechtfertigt, wenn in zumindest einer der Proben mit einer sehr großen Anzahl von Kopien des Zielgens für die Amplifikation gerechnet werden kann. Das ist für verschiedene virale Infektionen gegeben. Mit entsprechenden Erregerzahlen von *Chlamydia trachomatis* kann nur bei produktiven bzw. symptomatischen Infektionen gerechnet werden. Für den Nachweis von *Chlamydia trachomatis* in „gepoolten“ Urinproben von Frauen fehlen bisher belastbare Studienergebnisse. Bei Urinproben muss zudem in bis zu 7 % der Fälle mit Inhibitoren der NAT gerechnet werden. Bei Frauen ist der Zervixabstrich das am besten geeignete Untersuchungsmaterial zum Nachweis von *Chlamydia trachomatis*. Auch von den Frauen selbst gewonnene Scheidenabstriche haben für diesen Erregernachweis eine höhere Sensitivität als Urinproben.

Trotz Kritik am empfohlenen Untersuchungsverfahren ist der Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses, sexuell aktiven Frauen bis zum 25. Lebensjahr ein jährliches *Chlamydia trachomatis* Screening anzubieten, ein Schritt in die richtige Richtung und ist in der vorliegenden Form möglicherweise geeignet, die „Spitze des Eisberges“ der unerkannten *Chlamydia trachomatis* Infektionen zu erfassen.

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

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three (almost identical) samples with a relatively low amount of *C. trachomatis* (# 81101, # 81102, # 81104, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), and one sample without target organisms (# 81103; only non-infected cells and *E. coli*). As depicted in table 2, no false-positive and only a few false-negative results were reported by the 104 participants.

PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis* (RV 531) April 2008



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
81101	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
81102	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
81103	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12
81104	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)

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

n = 112	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	81101	81102	81103	81104	81101	81102	81103	81104	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	105	108	0	109	n.d.	2	2	2	2
Negativ	6	3	112	3	nein <i>no</i>	109	110	110	110
Fraglich <i>Questionable</i>	1	1	0	0	ja <i>yes</i>	1	0	0	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 = 20)	59	59 / 59 §	100	20	20 / 20	100
BD ProbeTec [24] (n = 20)	57	57 / 60	95	20	20 / 20	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 15)	44	44 / 45	98	15	15 / 15	100
Artus CT [25] (n = 15)	43	43 / 45	96	15	15 / 15	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 7)	21	21 / 21	100	7	7 / 7	100
Roche AmpliCor [22] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	100
Other commercial tests [27] (n = 28)	81	81 / 83 §	98	28	28 / 28	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	9	9 / 12	75	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.

§ 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, 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*

status 04.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

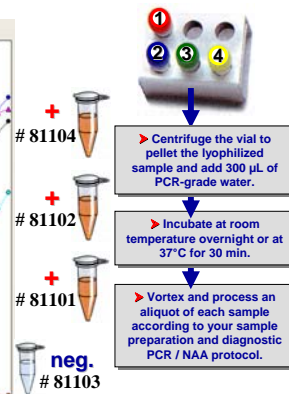
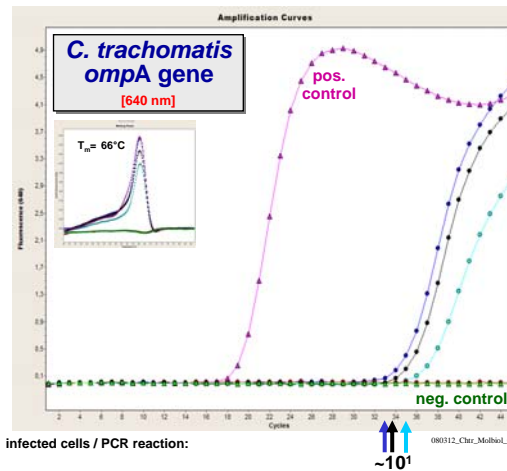
13	81101	33,67
14	81102	35,70
15	81103	
16	81104	34,25
17	Pos. Contr. Chl. tr	17,82
18	NTC	



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



C. trachomatis:
 SET: 98



INSTAND-A09_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>



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2008

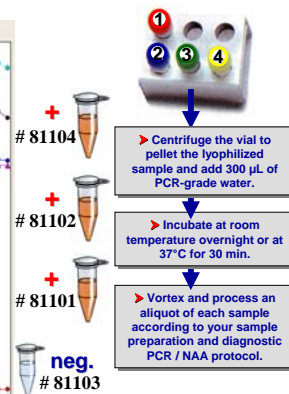
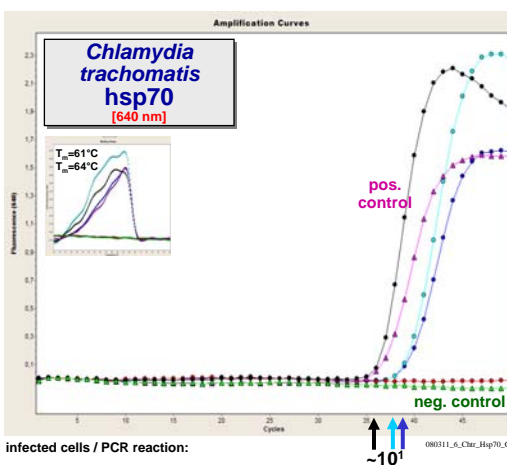
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

7	81101	38,05
8	81102	38,06
9	81103	
10	81104	34,88
11	Pos. Contr. Chl. trachom.	35,47
12	NTC	



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.



INSTAND-A10_I/08



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2008

➤ Evaluation (qualitative PCR):

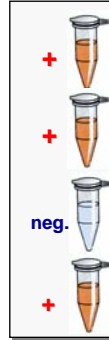
Reischl / Straube

ROCHE COBAS Amplicor *Chlamydia trachomatis*



81101	CT	*,***	___	POSITIVE
	CNC	*,***	___	POSITIVE
81102	CT	*,***	___	POSITIVE
	CNC	*,***	___	POSITIVE
81103	CT	0.002	___	NEGATIVE
	CNC	*,***	___	POSITIVE
81104	CT	*,***	___	POSITIVE
	CNC	*,***	___	POSITIVE

Cobas_C_trachomatis



- 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.



INSTAND-A11_I/08



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2008

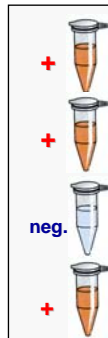
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

Becton Dickinson ProbeTec CT/GC

Probennummer	CT	CT QC
QC- (3273598)		OK
QC+ (3273598)		OK
81101	⊕+	
81102	⊖⊕	
81103	⊖	
81104	⊕+	

ProbeTec_1-2008



- 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.



INSTAND-A12_I/08