



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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 20-26 of this document. As always, result tables are depicted 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 mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Erfreulicherweise waren die Kommentare in den letzten sieben Jahren überwiegend positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

June 8, 2010

To the participants of the
INSTAND external quality assessment scheme (EQAS)
for NAATs in Diagnostic Bacteriology
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., Düsseldorf, Germany (attached to this letter).

This highly desired sheme for external quality assessment (EQAS) 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 (spring and autumn), 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 quality control and 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 since 2009:** 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 EQAS scheme 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,



PD 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. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 11 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder zwei „highlights“: zum einen wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 531 wieder die **schwedische Chlamydienvariante (nvCT)** ausgesandt und zum anderen befand sich der **sog. Züricher Drogenstamm** in einer der 4 Proben des MRSA Ringversuchs RV 539.

Eine weitere Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir beschäftigen uns gerade mit der Konfektionierung und Herstellung eines Proberingversuchs für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis*. Eine limitierte Anzahl von entsprechenden Probensets wird voraussichtlich im Rahmen der kommenden Ringversuchsrunde im November 2010 für interessierte Teilnehmer verfügbar sein. Als Sollwertlabor fungieren hier die Kollegen Dr. D. Frangoulidis und Dr. W. Splettstösser vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen.

Übrigens: das **REMMDI 2011** wird vom **14.-16. April 2011** wieder in Regensburg stattfinden. Diesen Termin eventuell schon mal vormerken... Nähere Informationen finden Sie demnächst unter www.remmdi.de

APRIL 2010:

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 Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 1015303, 1015304, sowie die schwach positive Probe des RV 531 # 1015314), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1015303), *Bordetella pertussis* (Probe # 1015324), *Helicobacter pylori* (Probe # 1015334), *Borrelia afzelii* (Probe # 1015352), *Legionella pneumophila* (Probe # 1015363), sowie *Listeria monocytogenes* (Probe # 1015381). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 1015313 dieser Ringversuchsrunde. 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 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; 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 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 kommerzieller PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

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

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Ringversuchen zum kombinierten NAT-gestützten *C. trachomatis* und Gonokokken-Nachweis. Trotz der relativ geringen Erregermenge in zwei der vier positiven Proben führte die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für beide Zielorganismen hier, mit Ausnahme der Probe # 1015303 (die neben *C. trachomatis* diesmal Gonokokken in einer Menge von nur $\sim 10^3$ CFU/mL enthielt), zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive als auch für negative Befunde. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt drei Proben mit verschiedenen Mengen an *C. trachomatis* ($\sim 10^3$ IFU/mL in den Proben # 1015303 und # 1015304; sowie $\sim 10^4$ IFU/mL in der Probe # 1015302) und zwei Proben mit einer hohen und einer etwa 10-fach geringeren Menge an *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^4$ CFU/mL in Probe # 1015301 und $\sim 10^3$ CFU/mL in Probe # 1015303).

Unter den von 135 Teilnehmern mitgeteilten 540 NAT-Ergebnissen fanden sich für *C. trachomatis* diesmal keine falsch-positiven Ergebnisse und 10 falsch-negative Ergebnisse, die vermutlich in einer unzureichenden analytischen Sensitivität der eingesetzten Testsysteme begründet sind.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden diesmal von 11 Teilnehmern für die schwach positive Probe # 1015303 und von 4 Teilnehmern für die stärker positive Probe # 1015301 ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Im Gegensatz zu einigen früheren Ringversuchen kann bei der GO-positiven Probe # 1015301 diesmal nicht argumentiert werden, daß ein negatives Ergebnis für *N. gonorrhoeae* DNA durch die gleichzeitige Anwesenheit von *C. trachomatis* bei einigen kombinierten Testsystemen verursacht wurde. Diese Probe enthielt ausschließlich *N. gonorrhoeae*, und die restlichen Bestandteile unserer Probenmatrix sollten aus amplifikations-technischer Sicht nicht mit der erreichbaren analytischen Sensitivität für *N. gonorrhoeae* interferieren. Dieses Argument könnte man eventuell bei der anderen "CT und GO-positiven" Probe # 1015303 anführen; die Zielorganismen in diesen Proben wurden aber von allen Teilnehmern mit den jeweils eingesetzten Testsystemen im Großen und Ganzen zufriedenstellend detektiert und befundet.

Im Zusammenhang mit den augenscheinlich etwas geringeren Richtigkeitsquoten bestimmter kommerzieller Testsysteme bei schwach positiven Proben soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die maximal erreichbare analytische Sensitivität auch zu einem gewissen Teil durch die entsprechend vorgegebenen Prozeduren zur Probenaufarbeitung und -prozessierung bedingt wird. So wird das eingesetzte klinische Probenmaterial beispielsweise im Rahmen der vorschriftsmäßigen Abarbeitung des CT/GO-spezifischen BD ProbeTec Testsystems relativ stark verdünnt. Dies geschieht möglicherweise auch präventiv zur Verringerung der Konzentration von bestimmten Substanzen in Urinproben oder anderem geeigneten Untersuchungsmaterial, die das proprietäre isotherme Amplifikationsverfahren dieses Testsystems inhibieren könnten. Da unsere standardisierten Ringversuchsproben jedoch auf Probeneinsatzvolumina von 100 bis 200 μ l ausgelegt sind, auf allen uns zur Verfügung stehenden Testplattformen erfolgreich vorgetestet sind, und auch keine nennenswerten Mengen an inhibitorischen Substanzen enthalten, könnten Verdünnungen in Extraktions- oder Lysepuffern hier zu unnötigen Einbußen in der Sensitivität führen. Diese Effekte sollten gegebenenfalls herstellerseitig abgeklärt und mit den betroffenen Kunden diskutiert werden. Angesichts der streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen bleibt es für den Ringversuchsleiter jedesmal aufs Neue verwunderlich, daß ein nennenswerter Anteil der teilnehmenden Laboratorien mit den betroffenen Testsystemen erfolgreich die vorgegebenen Zielwerte erreicht.

Demgegenüber sollte aber die Ergebnislage bei den Testsystemen der Fa. Gen-Probe differenziert betrachtet werden. Hierbei handelt es sich um NAT-Testsysteme, die bekanntermaßen erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen und in der Praxis an nativem Probenmaterial gute Leistungsdaten aufweisen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden

Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Dies deutet, zumindest indirekt, auf ausreichend hohe Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin. Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal auf keinem der 135 ausgewerteten Ergebnisbögen mitgeteilt. Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG 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 # 1015303, die diesmal relativ geringe Mengen an *C. trachomatis* und Gonokokken enthielt, wurden mit diesen kombinierten Testsystemen insgesamt relativ hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Um eine detailliertere Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen wurden die zusätzlichen Tabellen 4 und 5 angefertigt. In Tabelle 4 sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in Tabelle 5 nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet. **Anmerkung:** Bevor durch einen kurzen Blick auf die prozentualen Richtigkeitsquoten in diesen Tabellen ein eventuell etwas zu voreiliger Rückschluß auf die diagnostischen Qualitäten bestimmter kommerzieller Testsysteme gezogen wird, sollten erst die effektiven Teilnehmerzahlen berücksichtigt werden, die arithmetisch zu den dargestellten Richtigkeitsquoten geführt haben.

Im Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurde übrigens unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: BAG Hyplex STD (4x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae* Real-TM (3x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (3x), TibMolbiol LightMix NG (2x), SORPOLine *N. gonorrhoeae* End-point PCR Kit (1x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (1x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (1x), Euroclone Duplica Real Time *N. gonorrhoeae* Detection Kit (1x), und HAIN GenoQuick CT (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 Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt.

ENGLISCH:

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

The current set of QC samples contained two samples with various amounts of *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^4$ CFU/mL in sample # 1015301; $\sim 10^3$ CFU/mL in sample # 1015303) and three samples with various amounts of *C. trachomatis* organisms ($\sim 10^4$ IFU/mL in sample # 1015302, $\sim 10^3$ IFU/mL in samples # 1015303 and # 1015304).

Despite the relatively low amounts of target organisms in the current set of QC samples, the availability of well-established commercial or *in-house* NAT-assays has led to a high portion of correct results. Among the *Chlamydia trachomatis*-specific results reported by the 135 participants, no false-positives and only 10 false-negative results were observed.

Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 11 participants for sample # 1015303 which contained only *N. gonorrhoeae* target organisms in a relatively low amount of $\sim 10^3$ CFU/mL. Four participants reported a false-negative result for sample # 1015301 which contained a 10-fold higher amount of *N. gonorrhoeae* target organisms. With respect to the number of target organisms present in the current set of QC samples, it seems that the analytical sensitivity of some combined PCR / NAT assay concepts is slightly better for *C. trachomatis* organisms than for *N. gonorrhoeae* detection. This is further illustrated in tables 4 and 5, where the results are depicted by target organism (*C. trachomatis* and GO-specific detection). The practical significance of the slightly lower rates of true positive results observed with some commercial or prefabricated test concepts remains unclear. When these effects are associated with the intrinsic diagnostic performance of such well-evaluated and well-standardized test concepts, it is astonishing that a remarkable portion of participants report correct results with the "affected" assays. So individual deviations from the recommended kit or test protocols or the recommended sample workup procedures is a more likely explanation for the observed variations in the overall diagnostic performance of particular assays with the current set of distributed QC samples. One last comment with respect to the use of RNA-based assays: due to the production scheme and microbial composition of our standardized QC matrices, we can not guarantee the stability or the integrity of RNA target molecules within the lyophilized sample materials. This aspect should be considered when new participants want to enroll in our comprehensive external quality assessment scheme (EQAS) for NAATs in diagnostic bacteriology.

PCR-/NAT *C. trachomatis* & GO (RV 530) April 2010



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

Gruppe A	Erwartet / expected	Probennummer	Probenzusammensetzung / Sample composition
1015301	∅ / +++	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1015302	++ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
1015303	+ / +	62	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
1015304	+ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)

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

n = 135	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	1015301	1015302	1015303	1015304	1015301	1015302	1015303	1015304	
Befund Result									
Positiv CT	0	131	9	130	n.d.	0	0	0	0
Positiv CT & GO	0	1	119	2	nein / no	135	135	135	135
Positiv GO	131	0	3	0	ja / yes	0	0	0	0
Negativ	4	2	2	3					
Fraglich / questionable	0	1	2	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>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 2)	5	5 / 8	63	0	0 / 0	100
LightMix CT/NG [21] (n = 10)	37	37 / 40	93	0	0 / 0	100
Roche Cobas TaqMan [22] (n = 16)	58	58 / 64	91	0	0 / 0	100
COBAS AmpliCor [23] (n = 26)	103	103 / 104	99	0	0 / 0	100
BD ProbeTec [24] (n = 28)	104	104/111 §	94	0	0 / 0	100
Artus CT [25] (n = 4)	15	15 / 16	94	0	0 / 0	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 32)	128	128 / 128	100	0	0 / 0	100
Other commercial tests [27] (n = 18)	70	70 / 72	97	0	0 / 0	100
In house PCR assay [28] (n = 21)	78	78 / 83 §	94	0	0 / 0	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	7	7 / 7 §	100	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.

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 (nur CT) [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>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 2)	5	5 / 6	83	2	2 / 2	100
LightMix CT/NG [21] (n = 10)	28	28 / 30	93	10	10 / 10	100
Roche Cobas TaqMan [22] (n = 16)	47	47 / 48	98	16	16 / 16	100
COBAS AmpliCor [23] (n = 26)	78	78 / 78	100	26	26 / 26	100
BD ProbeTec [24] (n = 28)	77	77 / 83 §	93	28	28 / 28	100
Artus CT [25] (n = 4)	11	11 / 12	92	4	4 / 4	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 32)	96	96 / 96	100	32	32 / 32	100
Other commercial tests [27] (n = 18)	54	54 / 54	100	18	18 / 18	100
In house PCR assay [28] (n = 21)	58	58 / 62 §	94	21	21 / 21	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	5	5 / 5 §	100	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.

Tabelle 5: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden. Anmerkung: in dieser Tabelle sind nur die Ergebnisse für Neisseria gonorrhoeae dargestellt.

Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods

Note: only the *N. gonorrhoeae*-specific results are depicted in this table.

NAT-Methode (nur GO) [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>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 2)	1	1 / 4	25	4	4 / 4	100
LightMix CT/NG [21] (n = 10)	17	17 / 20	85	20	20 / 20	100
Roche Cobas TaqMan [22] (n = 16)	26	26 / 32	81	30	30 / 32	94
COBAS Amplicor [23] (n = 26)	51	51 / 52	98	51	51 / 52	98
BD ProbeTec [24] (n = 28)	53	53 / 56	95	55	55 / 56	98
Artus CT [25] (n = 4)	7	7 / 8	88	8	8 / 8	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 32)	64	64 / 64	100	64	64 / 64	100
Other commercial tests [27] (n = 18)	34	34 / 36	94	36	36 / 36	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 21)	40	40 / 42	95	42	42 / 42	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	4	4 / 4	100	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.
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
 in medizinischen Laboratorien e.V.
<http://www.instand-ev.de>



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2010

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

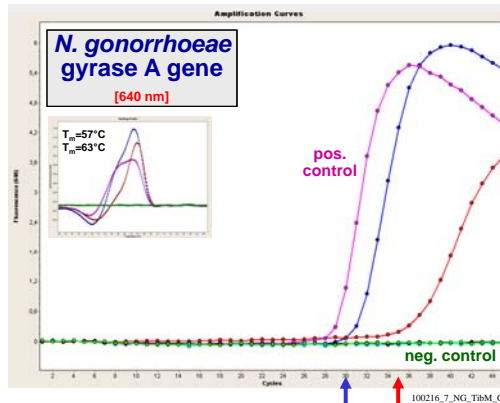
- 1 1015301 29,68
- 2 1015302 35,78
- 3 1015303
- 4 1015304
- 5 Pos. Ko. *N. gonorrhoeae* 27,43
- 6 NTC



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

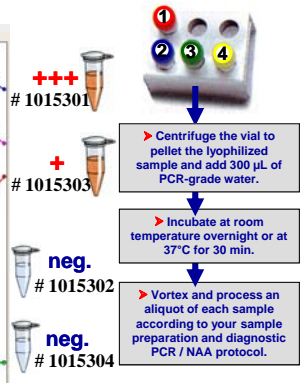


N. gonorrhoeae:
 SET: 97



infected cells / PCR reaction:

~10² ~10¹



INSTAND-A03_I/10



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

INSTAND e. V.
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
 in medizinischen Laboratorien e.V.
<http://www.instand-ev.de>



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2010

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

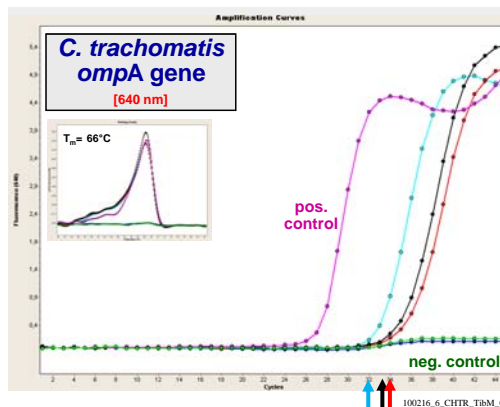
- 1 1015301 31,63
- 2 1015302 34,70
- 3 1015303 34,02
- 4 1015304 25,63
- 5 Pos. Ko. *Chl. trachomatis*
- 6 NTC



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

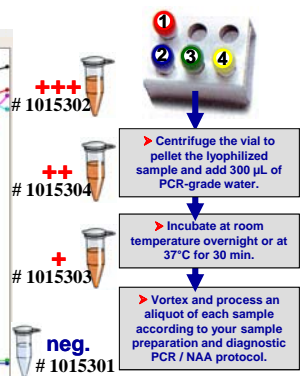


C. trachomatis:
 SET: 98



infected cells / PCR reaction:

~10¹



INSTAND-A04_I/10



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2010

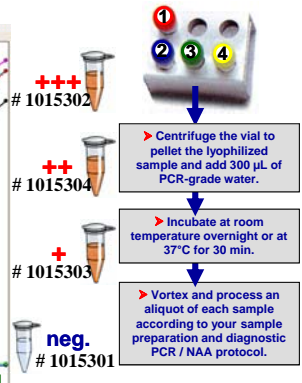
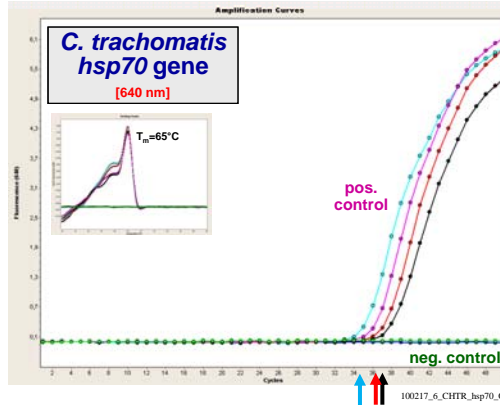
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

- 1 1015301
- 2 1015302 33,73
- 3 1015303 35,97
- 4 1015304 36,79
- 5 Pos. Ko. Chl. trachomatis 34,91
- 6 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.), Springer Press, Heidelberg, pp. 115-
 132.



IN STAND-A05_I/10



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 04.2010

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

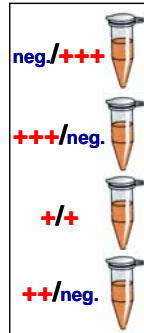
**ROCHE
 COBAS AmpliCor
*C. trachomatis***



1015301	CT	0.002	NEGATIVE
	NG	3.677	POSITIVE
	CNC	3.677	POSITIVE
1015302	CT	3.979	POSITIVE
	NG	0.004	NEGATIVE
	CNC	3.978	POSITIVE
1015303	CT	3.979	POSITIVE
	NG	1.974	POSITIVE
	CNC	3.979	POSITIVE
1015304	CT	3.979	POSITIVE
	NG	0.003	NEGATIVE
	CNC	3.979	POSITIVE

Cobas ampliCor CT GO

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.



IN STAND-A06_I/10



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

INSTAND e. V.
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
 in medizinischen Laboratorien e.V.
<http://www.instand-ev.de>



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO status 04.2010

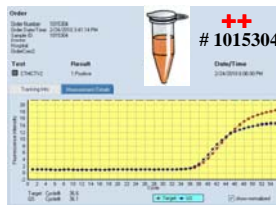
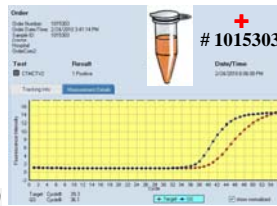
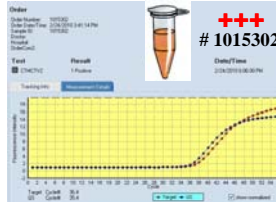
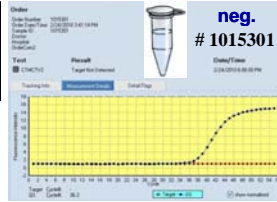
➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Straube

**ROCHE
 COBAS TaqMan
*C. trachomatis***



COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0



COBAS TaqMan_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.

Regensburg



INSTAND-A06_I/10