



Regensburg, den 21. Dezember 2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion (NEW !) of the current results after the corresponding sections in German language. As usual, tables with the results are presented 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

December 22, 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,



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. 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

NOVEMBER 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 Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 82002), EHEC (Proben # 82401, # 82402), MRSA (Probe # 82902), *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila pneumoniae* (Probe # 82412), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 82424). 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.

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. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem geschätzten Kollegen Herrn Dr. Christoph Schoerner, Erlangen, für seine zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

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 Analysensysteme für beide Zielorganismen hier, mit Ausnahme der Probe # 82002, zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive als auch für negative Befunde. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal zwei Proben mit identischen Mengen an *C. trachomatis* ($\sim 10^3$ IFU/mL; # 82002 und # 82004), zwei Proben mit identischen Mengen an *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^3$ CFU/mL; # 82002 und # 82003), sowie eine Probe ohne Chlamydien und Gonokokken (# 82001).

Unter den von 102 Teilnehmern mitgeteilten 408 NAT-Ergebnissen fanden sich für *C. trachomatis* insgesamt nur 2 falsch-positive Ergebnisse (die vermutlich durch laborinterne Kontaminationsereignisse hervorgerufen wurden) und 6 falsch-negative Ergebnisse. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden diesmal hingegen von 42 Teilnehmern für die schwach positive Probe # 82002 und für die schwach positive Probe # 82003 von 7 der insgesamt 102 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Offensichtlich interferiert bei einigen kombinierten Testsystemen die gleichzeitige Anwesenheit von *C. trachomatis* mit der erreichbaren analytischen Sensitivität für *N. gonorrhoeae*. Aufgrund der insgesamt doch relativ geringen Menge an Zielorganismen wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für Gonokokken bei der Probe # 82002 diesmal nicht als "falsch-negativ" bewertet.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal bei keinem der eingesetzten Testsysteme 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 # 82002, 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. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Roche COBAS TaqMan (3x), GeneProof *Chlamydia trachomatis* PCR Kit- Rotor Gene (1x), BAG Hyplex Ct (3x).

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.

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

The current set of QC samples contained two samples with almost identical amounts of *C. trachomatis* ($\sim 10^3$ IFU/mL; sample # 82002 and sample # 82004), two samples with almost identical amounts of *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^3$ CFU/mL; sample # 82002 and sample # 82003), and one sample without *C. trachomatis* or gonococci (# 82001).

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 102 participants, only two false-positive (presumably caused by cross-contamination events) and 6 false-negative results were observed.

Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 7 participants for sample # 82003. On the other hand, 42 participants reported false-negative results for sample # 82002 which contained both target organisms in a relatively low amount. Obviously we have

touched the lower limit of detection for several commercial and *in-house* PCR assays with the latter sample which should mimic a mixed infection.

It seems that the analytical sensitivity for *N. gonorrhoeae* detection is negatively influenced by the presence of *C. trachomatis* organisms with some of the combined PCR assays. Since the effective load of target organisms was relatively low, ring trial certificates were issued even when a negative *N. gonorrhoeae* result was reported for sample # 82002.

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected	Probenzusammensetzung / Sample composition
82001	∅ / ∅	64 <i>Escherichia coli</i> K12
82002	+ / +	62 <i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
82003	∅ / +	63 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
82004	+ / ∅	61 <i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) &

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

n = 102	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	82001	82002	82003	82004	82001	82002	82003	82004	
Befund Result									
Positiv CT	1	40 ¹⁾	0	98	n.d.	0	0	0	0
Positiv CT & GO	0	59	1	1	nein / no	102	102	102	102
Positiv GO	2	1	94	0	ja / yes	0	0	0	0
Negativ	99	2 ¹⁾	7	3					
Fraglich / Questionable	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 = 34)	88	88 / 102	86	34	34 / 34	100
BD ProbeTec [24] (n = 21)	55	55 / 63	87	20	20 / 21	95
In house PCR assay [28] (n = 17)	41	41 / 51	80	13	13 / 17	76
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 14)	26	26 / 42	62	14	14 / 14	100
Other commercial tests [27] (n = 7)	23	23 / 24	96	8	8 / 8	100
LightMix CT/NG [21] (n = 7)	16	16 / 21	76	7	7 / 7	100
Roche Amplicor [22] (n = 6)	15	15 / 18	83	1	1 / 1	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 5)	13	13 / 15	87	5	5 / 5	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.

Comments: ¹⁾ 42 of the 102 participants reported negative results for *Neisseria gonorrhoeae* in the sample # 82002. 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.



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 11.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

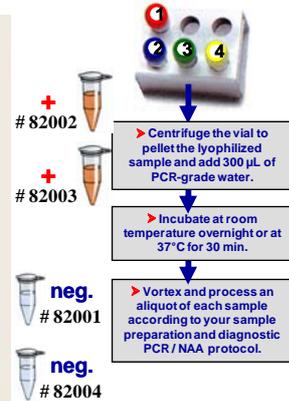
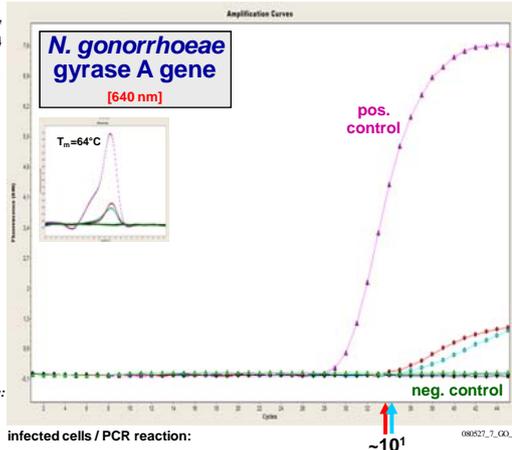
- 1 82001 35,17
- 2 82002 33,54
- 3 82003
- 4 82004
- 5 pos. Ko. *N. gonorrhoeae* 28,71
- 6 NTC



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_II/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 11.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

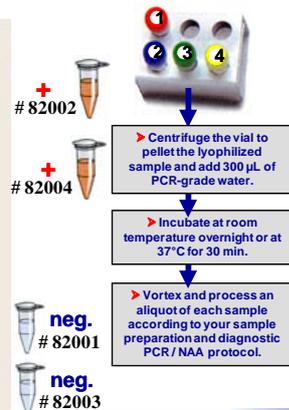
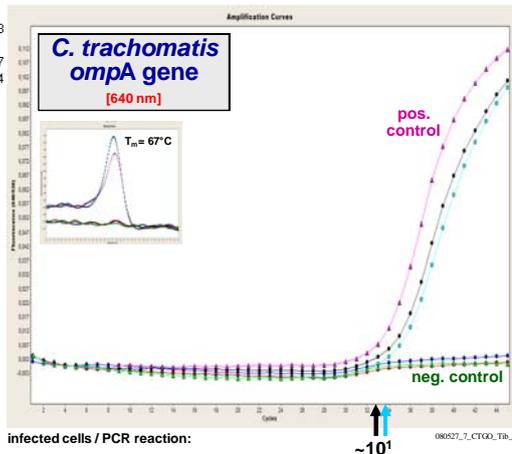
- 7 82001 34,03
- 8 82002
- 9 82003
- 10 82004 33,67
- 11 pos. Ko. *Chl. trachomatis* 32,64
- 12 NTC



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_II/08



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO status 11.2008

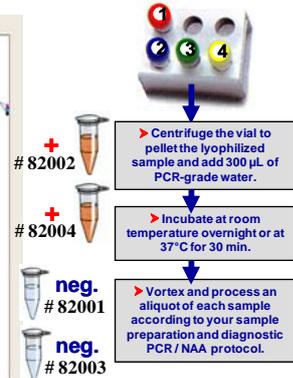
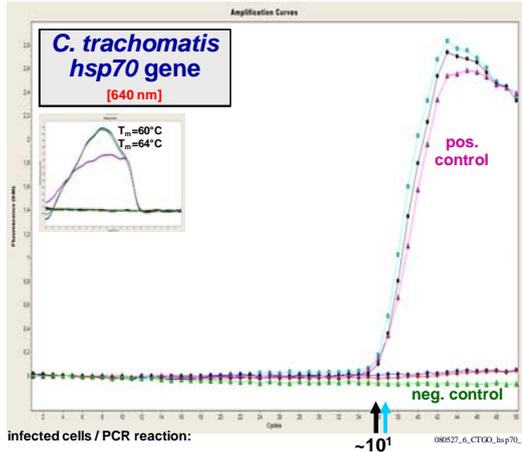
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

- 1 82001 34,65
- 2 82002 34,96
- 3 82003 35,20
- 4 82004 35,20
- 5 pos. Ko. Chl. trachomatis 35,20
- 6 NTC



LightCycler PCR protocol:
 Wood, H., U. Reischl, and R. Peeting (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.



INSTAND-A05_II/08

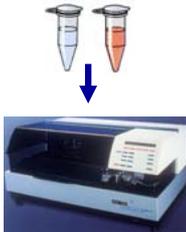


530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO status 11.2008

Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

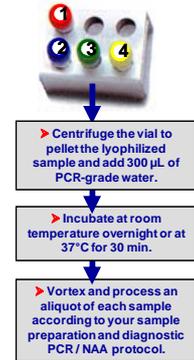
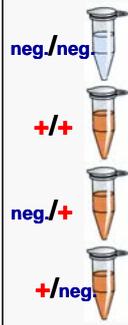
ROCHE COBAS AmpliCor *C. trachomatis* + *N. gonorrhoeae*



82001	CT	0.000	---	NEGATIVE
	NG	0.000	---	NEGATIVE
82002	CT	3.516	---	POSITIVE
	CNC	3.692	---	POSITIVE
82003	CT	0.000	---	NEGATIVE
	NG	3.993	---	POSITIVE
82004	CT	3.516	---	POSITIVE
	NG	0.000	---	NEGATIVE
	CNC	3.516	---	POSITIVE

CTCO Cobas

Chl./GO



INSTAND-A06_II/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 stand 11.2008

➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

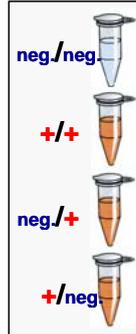
Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

<u>Probennummer</u>	<u>CT</u>	<u>GC</u>
82001		
82002		
82003		
82004		

CT BD

ChI/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.



INSTAND-A07_II/08