



Regensburg, den 11. Dezember 2009

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 in English on the following pages 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 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, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

December 11, 2009

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. (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 in 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. H. Wolf, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Eine kurze Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir werden im Laufe des Jahres je einen sog. **Proberingversuch** für den Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis* anbieten. Als Sollwertlabor wird hier das Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart fungieren. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen. Sollten Sie Interesse an der Teilnahme an diesem "Proberingversuch" mit limitierter Anzahl von entsprechenden Probensets haben, so bitten wir Sie um kurze Mitteilung an den Ringversuchsleiter (udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de).

NOVEMBER 2009:

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 # 92001, 92004, sowie die drei schwach positiven Proben des RV 531), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 92003), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 92504), *Salmonella enterica* (Probe # 92701), sowie cMRSA (Probe # 92903). 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 prozentuaalem 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 drei der vier positiven Proben führte die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für beide Zielorganismen hier, mit Ausnahme der Probe # 92003 (die diesmal nur Gonokokken in einer Menge von $\sim 10^3$ CFU/mL enthielt), zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive als auch für negative Befunde. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit identischen Mengen an *C. trachomatis* ($\sim 10^3$ IFU/mL; # 92002 und # 92004) und drei Proben mit 10-fach ansteigenden Mengen an *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^3$ CFU/mL in Probe # 92003, $\sim 10^4$ CFU/mL in Probe # 92002 und $\sim 10^5$ CFU/mL in Probe # 92004).

Unter den von 116 Teilnehmern mitgeteilten 464 NAT-Ergebnissen fanden sich für *C. trachomatis* insgesamt nur zwei falsch-positive Ergebnisse (die vermutlich durch laborinterne Kontaminationsereignisse hervorgerufen wurden) und 16 falsch-negative Ergebnisse. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden diesmal von 28 Teilnehmern für die schwach positive Probe # 92003, von 4 Teilnehmern für die stärker positive Probe # 92002, und immerhin noch von 6 Teilnehmern für die wirklich stark positive Probe # 92004 ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Im Gegensatz zum vorherigen Ringversuch im Mai 2009 kann bei der schwach positiven Probe # 92003 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 den beiden anderen "CT und GO-positiven" Proben #92002 und # 92004 anführen; die Zielorganismen in diesen Proben wurden aber von allen Teilnehmern mit den jeweils eingesetzten Testsystemen im Großen und Ganzen zufriedenstellend detektiert und befundet. Aufgrund der insgesamt doch relativ geringen Menge an Zielorganismen wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für Gonokokken bei der Probe # 92003 diesmal nicht als "falsch-negativ" bewertet. Die entsprechenden Teilnehmer sollten diesen Ringversuch aber dennoch zum Anlaß nehmen, die analytische Sensitivität ihrer Testsysteme für den Nachweis von Gonokokken zu optimieren.

Im Zusammenhang mit den augenscheinlich etwas geringeren Richtigkeitsquoten bestimmter kommerzieller Testsystemen 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 (zumindest in der Regel) keine großen 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. Ohne denjenigen Teilnehmern, die mit bestimmten kommerziellen Testsystemen die Zielwerte nicht

erreichen zu nahe treten zu wollen, deutet dieser Umstand in diesen Fällen dann wohl eher auf individuelle Abweichungen vom Protokoll oder bestimmte Fehler bei der Probenabarbeitung als auf intrinsische Unzulänglichkeiten der in der Regel gut evaluierten Testsysteme hin.

Ich glaube es ist auch für den Leser dieser Ringversuchsdiskussion weitgehend nachvollziehbar daß wir als Organisatoren von Testkonzept- und Testplattform-übergreifenden Ringversuchen bei der Konfektionierung unserer Probenmaterialien leider nicht jede Besonderheit im Abarbeitungsprotokoll von kommerziellen Testsystemen berücksichtigen oder unterschiedliche Arten von Ringversuchprobenmaterial für bestimmte Testsysteme bereitstellen können. 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. 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 Ringversuchproben 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 hohen Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal nur von einem Teilnehmer bei einer Einzelprobe (# 92002) beobachtet. 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 # 92003, 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. Um eine detailliertere Bewertung der *C. trachomatis*-spezifischen PCR-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen wurde diesmal eine zusätzliche Tabelle 4 angefertigt. Hier sind nur die *C. trachomatis* (CT) Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet.

Im Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurde übrigens unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: BAG Hyplex STD (3x), SORPOLine End-point PCR Kit (1x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (1x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (1x), TibMolbiol LightMix NG (3x), Artus (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (3x), HAIN Genotype CT (2x), und bioMerieux GO test (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 EQAS results in English:

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; samples # 92002 and # 92004) and three samples with various amounts of *N. gonorrhoeae* organisms ($\sim 10^3$ CFU/mL in sample # 92003, $\sim 10^4$ CFU/mL in sample # 92002 and $\sim 10^5$ CFU/mL in sample # 92004).

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 116 participants, only two false-positive (presumably caused by cross-contamination events) and 16 false-negative results were observed.

Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 28 participants for sample # 92003 which contained only *N. gonorrhoeae* target organisms in a relatively low amount of $\sim 10^3$ CFU/mL. On the other hand, 8 participants reported false-negative *C. trachomatis* results for sample # 92002 and another 8 participants reported false-negative *C. trachomatis* results for sample # 92004, which contained really significant amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms next to a low amount of $\sim 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* organisms. Obviously we have touched the lower limit of detection for several commercial and *in-house* *N. gonorrhoeae*-specific PCR assays with sample # 92003. The other two positive samples (# 92002 and # 92004), which were designed to mimic a mixed infection with CT and GO, were detected quite well by the spectrum of assays used by the participants. 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 for *C. trachomatis* organisms is slightly better than for *N. gonorrhoeae* detection. Since the effective load of *N. gonorrhoeae* target organisms was relatively low, ring trial certificates were issued even when a negative *N. gonorrhoeae* result was reported for sample # 92003. 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) November 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected	Probenzusammensetzung / Sample composition
92001	∅ / ∅	64 <i>Escherichia coli</i> K12
92002	+ / ++	62 <i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁵ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
92003	∅ / +	63 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
92004	+ / +++	62 <i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁵ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)

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

n = 116	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	92001	92002	92003	92004	92001	92002	92003	92004	
Befund Result									
Positiv CT	0	3	0	4	n.d.	0	0	0	0
Positiv CT & GO	1	103	1	104	nein / no	116	115	116	116
Positiv GO	1	7	86	6	ja / yes	0	1	0	0
Negativ	114	1	28	2					
Fraglich / Questionable	0	2	1	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 1)	0	0 / 3	0	1	1 / 1	100
LightMix CT/NG [21] (n = 7)	18	18 / 21	86	7	7 / 7	100
Roche Cobas TaqMan [22] (n = 12)	35	35 / 36	97	11	11 / 12	92
COBAS Amplicor [23] (n = 27)	79	79 / 81	98	27	27 / 27	100
BD ProbeTec [24] (n = 21)	72	37 / 63	59	20	20 / 21	95
Artus CT [25] (n = 6)	14	14 / 18	78	6	6 / 6	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 25)	74	74 / 75	99	25	25 / 25	100
Other commercial tests [27] (n = 15)	39	39 / 43 §	91	15	15 / 15	100
In house PCR assay [28] (n = 20)	51	51 / 59 §	86	19	19 / 20	95
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	5	5 / 9	56	3	3 / 3	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⁾ 28 of the 116 participants reported negative *Neisseria gonorrhoeae* (GO) results for sample # 92003. 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>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
LightMix CT/NG [21] (n = 7)	14	14 / 14	100	14	14 / 14	100
Roche Cobas TaqMan [22] (n = 12)	23	23 / 24	96	23	23 / 24	96
COBAS Amplicor [23] (n = 27)	54	54 / 54	100	54	54 / 54	100
BD ProbeTec [24] (n = 21)	34	34 / 42	81	41	41 / 42	98
Artus CT [25] (n = 6)	10	10 / 12	83	12	12 / 12	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 25)	50	50 / 50	100	50	50 / 50	100
Other commercial tests [27] (n = 15)	25	25 / 28 §	89	30	30 / 30	100
In house PCR assay [28] (n = 20)	36	36 / 40	90	40	40 / 40	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	6 / 6	100

* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.

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



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 11.2009

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

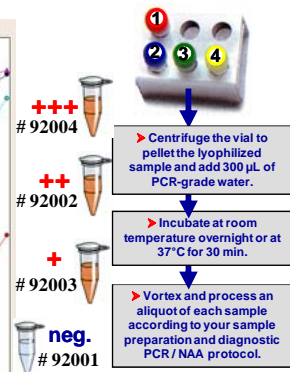
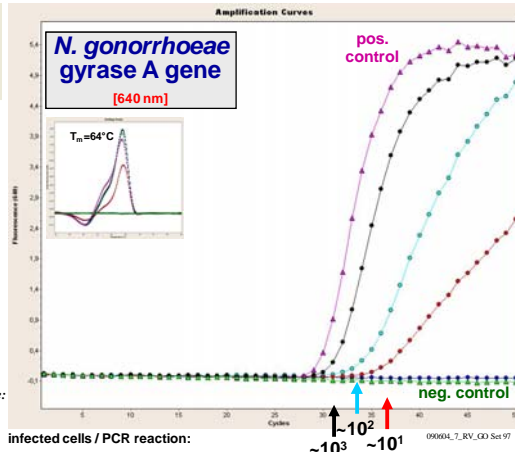
1	92001	
2	92002	33,56
3	92003	35,19
4	92004	30,13
5	Pos. Ko. <i>N. gonorrhoeae</i>	28,51
6	NTC	



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/09



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 11.2009

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

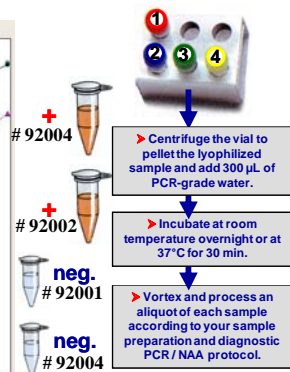
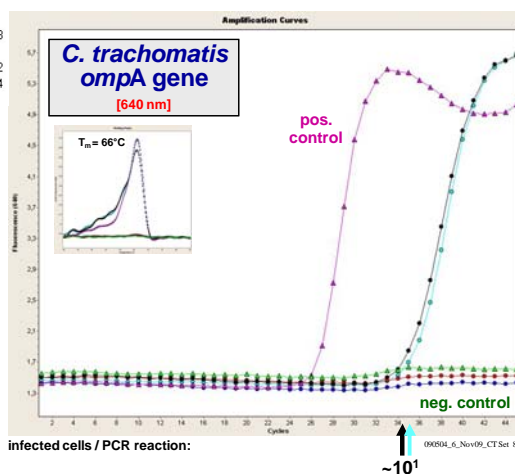
7	92001	
8	92002	34,93
9	92003	
10	92004	34,22
11	pos. Ko. <i>C. trachomatis</i>	26,54
12	NTC	



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/09



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO status 11.2009

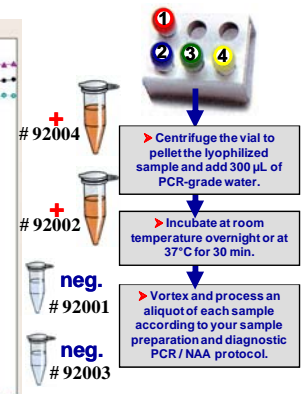
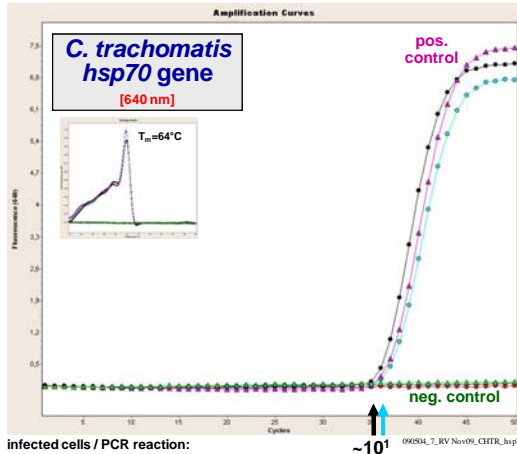
➤ **Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Straube

- 1 92001 36,00
- 2 92002 34,91
- 3 92003 35,73
- 4 92004
- 5 pos. Ko. Ch. trachomatis
- 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_II/09

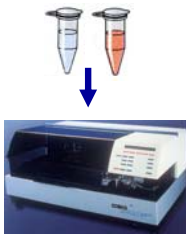


530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO status 11.2009

➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

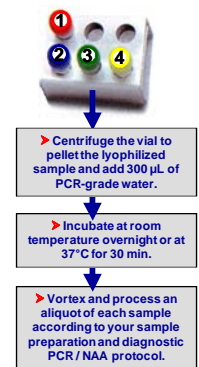
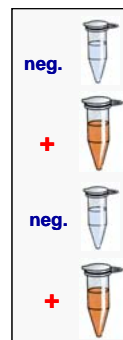
Reischl / Straube

ROCHE COBAS AmpliCor *C. trachomatis*



S 92001	CT 0.003	NEGATIVE
	CNC 3.975	POSITIVE
S 92002	CT 3.674	POSITIVE
	CNC 3.674	POSITIVE
S 92003	CT 0.003	NEGATIVE
	CNC 3.975	POSITIVE
S 92004	CT 3.975	POSITIVE
	CNC 3.975	POSITIVE

Cobas AmpliCor_C.trachomatis



IN STAND-A06_II/09



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 11.2009

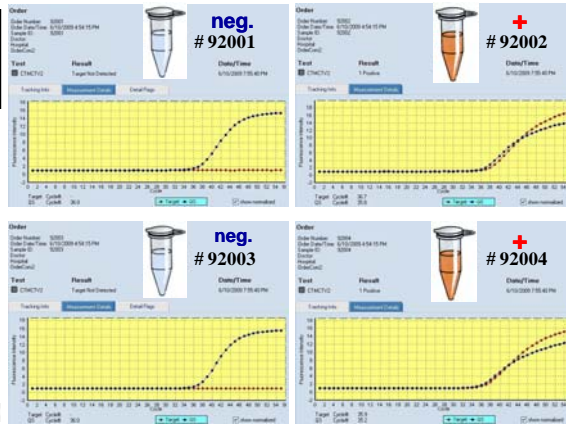
➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Straube

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



COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0



- 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-A07_II/09



530 Bakteriengenom-Nachweis *C. trachomatis* & GO

status 11.2009

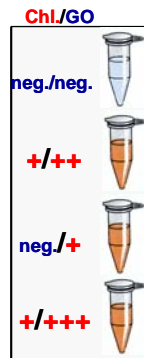
➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	GC	CT QC	GC QC
QC- (8282633)			OK	OK
QC+ (8282633)			OK	OK
92001	⬇	⬇		
92002	⬆+	⬇⬆		
92003	⬇	⬇		
92004	⬆+	⬆+		

ProbeTec_2-2009



- 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-A08_II/09