



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 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 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal drei Proben mit identischer (wenn auch relativ geringer) Menge an Zielorganismen (# 92101, # 92102 und # 92104, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 92103), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei den Proben # 92101 und # 92102 lediglich von je 3 der insgesamt 110 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bei Probe # 92104 wurden 4 falsch-negative Befunde erhalten. Die negative Probe # 92103 wurde diesmal von 108 der insgesamt 110 Teilnehmer als richtig negativ befundet und von den insgesamt 440 mitgeteilten Ergebnissen wurde kein einziges als "fraglich" befundet oder von den Teilnehmern im Ergebnisbogen als "inhibiert" klassifiziert.

Im Rahmen des Ringversuchs November 2008 wurde ein Probenstet mit nahezu identischer Konstellation und Menge an Zielorganismen versandt. Interessanterweise wurden damals auch nahezu identische Befundkonstellationen beobachtet: bei den Proben # 82101 und # 82102 wurden lediglich von je 2 der insgesamt 106 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bei Probe # 82104 wurden 4 falsch-negative Befunde erhalten. Die negative Probe # 82103 wurde damals von 103 der insgesamt 106 Teilnehmer als richtig negativ befundet. Diese markante Übereinstimmung der beiden Ergebniskonstellationen kann, zumindest indirekt, als Beleg für eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz der eingesetzten Testsysteme und der Probenabarbeitung aufgeführt werden.

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 immer noch hochaktuellen Diskussion um das "pooling" von entsprechendem 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 dabei nicht beobachtet. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, daß wir auch diesmal keine der Ringversuchsproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. 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. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchwegs auf hohem Niveau mit geringer statistischer Streuung. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (3x), Minerva Biolabs Onar CT (1x) BAG Hyplex CT (1x) und Roche COBAS TaqMan CT (2x).

Brief discussion of the current EQAS results in English:

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three identical samples with a relatively low amount of *C. trachomatis* target organisms (# 92101, # 92102 and # 92104, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), and one sample without target organisms (# 92103; only non-infected human cells and *Escherichia coli*). As depicted in table 2, only 2 false-positive and a few false-negative results were reported. All in all, a very good diagnostic performance was observed for the *C. trachomatis*-specific PCR assays used by the 110 participants.

It is worth to mention that an almost identical set of QC samples was sent out in the November 2008 ring trial. Interestingly, an almost identical constellation of reported results was observed at that time. This indicated a high level of sensitivity and robustness of the currently established PCR/NAT-based assay concepts for the detection of *C. trachomatis* DNA.

**PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis*
 (RV 531) November 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
92101	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
92102	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
92103	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
92104	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)

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

n = 110	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	92101	92102	92103	92104	92101	92102	92103	92104	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	107	107	2	106	n.d.	0	0	0	0
Negativ	3	3	108	4	nein <i>no</i>	110	110	110	110
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	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>	%
GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 16)	48	48 / 48	100	15	15 / 16	94
LightMix CT [21] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 29)	86	86 / 87	99	28	28 / 29	97
COBAS Amplicor [23] (n = 10)	30	30 / 30	100	10	10 / 10	100
BD ProbeTec [24] (n = 16)	45	45 / 48	94	16	16 / 16	100
Artus CT [25] (n = 8)	24	24 / 24	100	8	8 / 8	100
Abbott CT/NG [26] (n = 7)	20	20 / 21	95	7	7 / 7	100
Other commercial tests [27] (n = 9)	25	25 / 27	93	9	9 / 9	100
In house PCR assay [28] (n = 13)	36	36 / 39	92	13	13 / 13	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	6	6 / 6	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



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>



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 11.2009

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

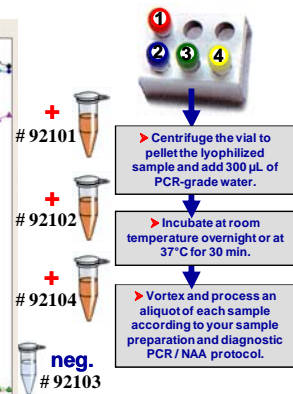
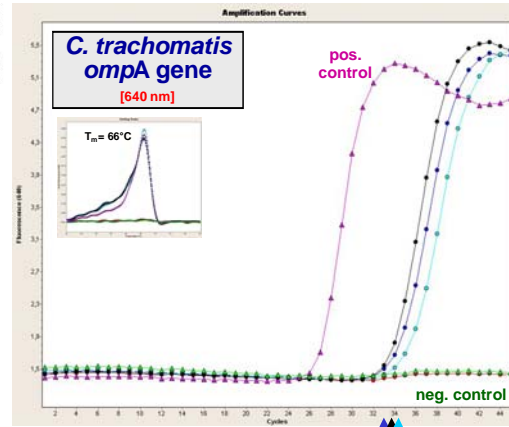
13	92101	33,99
14	92102	34,95
15	92103	
16	92104	33,64
17	pos. Ko. Ch. trachomatis	26,90
18	NTC	



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-A11_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>



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 11.2009

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

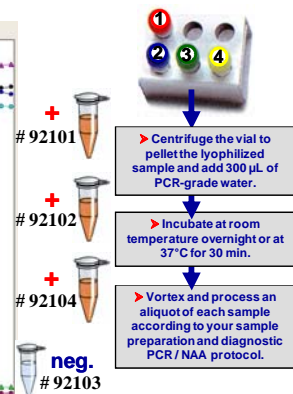
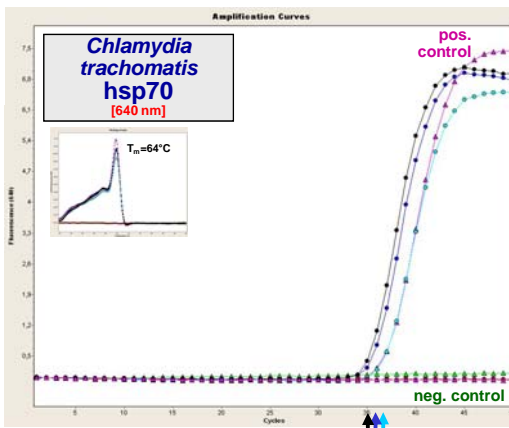
5	pos. Ko. Ch. trachomatis	35,73
6	NTC	
7	92101	34,23
8	92102	35,48
9	92103	
10	92104	33,81



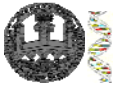
LightCycler PCR protocol:
 Wood, H. U., Reischl, and R. Peeling
 (2001) Rapid detection and quantification
 of *Chlamydia trachomatis* in clinical
 specimens by LightCycler PCR. In: Rapid
 Cycle Real-Time PCR: Methods and
 Applications (Reischl, U., Wittwer, C.,
 and Cockerill, F., eds.), ISBN 3-540-
 41881-4, Springer Press, Heidelberg, pp.
 115-132.



Chlamydia trachomatis
 hsp70



INSTAND-A12_II/09



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 11.2009

➤ Evaluation (qualitative PCR):

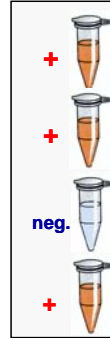
Reischl / Straube

ROCHE COBAS Amplicor *Chlamydia trachomatis*



S 92101	CT	3.975	POSITIVE
	CNC	3.674	POSITIVE
S 92102	CT	3.975	POSITIVE
	CNC	3.674	POSITIVE
S 92103	CT	0.004	NEGATIVE
	CNC	3.975	POSITIVE
S 92104	CT	3.674	POSITIVE
	CNC	3.975	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.

Regensburg



INSTAND-A13_II/09

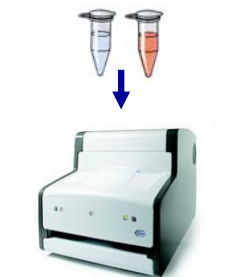


531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 11.2009

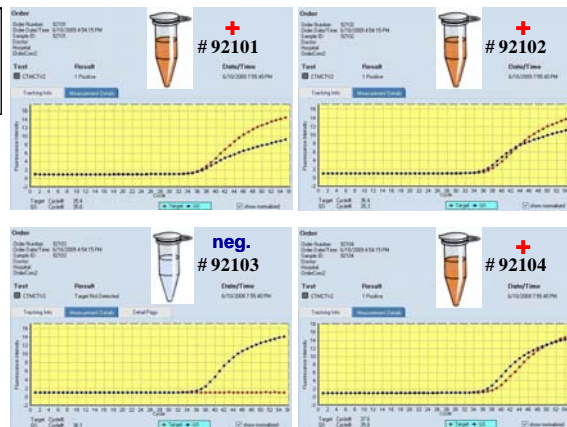
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

ROCHE COBAS TaqMan *Chlamydia 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-A14_II/09



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 11.2009

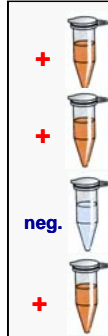
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

Becton Dickinson ProbeTec CT/GC

Probennummer	CT	CT QC
QC- (8282633)		OK
QC+ (8282633)		OK
92101	⊕+	
92102	⊖⊕	
92103	⊖	
92104	⊕+	

ProbTec_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.

