



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

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find **a brief discussion of the current results in English** after the section in German language. 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 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, Prof. Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

MAI 2009:

Highlights der aktuellen Ringversuchsrunde waren zweifelsohne der RV 531 (*Chlamydia trachomatis*), der diesmal auch ein Isolat der viel diskutierten **schwedischen C. trachomatis Mutante** enthielt, sowie der RV 539 (MRSA), bei dem ein "heimisches" **MRSA-Isolat mit ungewöhnlicher SCCmec Integrationsstelle** versandt wurde. Aber dazu später mehr.

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 # 91001), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 91502, # 91503), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 91414), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 91424). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 91104 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 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 erneut 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 531: *Chlamydia trachomatis*

Wie in der Einführung bereits kurz erwähnt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal auch eine Probe mit der zumindest in Fachkreisen mittlerweile hinlänglich bekannten *C. trachomatis* Mutante aus Schweden (nvCT). Um bei der Auswertung dieses Ringversuchs möglichen falsch-negativen Ergebnissen durch mangelnde analytische Sensitivität der eingesetzten PCR-gestützten Testsysteme entgegenzutreten, befand sich dieses spezielle Isolat in relativ hoher Menge von $\sim 1 \times 10^5$ IFU/ml in Probe # 91104. Darüberhinaus enthielt das aktuelle Ringversuchsset noch zwei weitere Proben mit identischer (wenn auch relativ geringer) Menge an Zielorganismen (# 91101 und # 91103, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 91102), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei den beiden positiven Proben # 91101 und # 91103 mit geringen Mengen eines *C. trachomatis* Wildtyp-Isolats lediglich von je 5 bzw. 10 der insgesamt 122 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bei Probe # 91104, die eine relativ hohe Menge der *C. trachomatis* Mutante aus Schweden enthielt, wurden jedoch bei 19 Teilnehmern falsch-negative Befunde erhalten. In Anbetracht der verwendeten Testsysteme ist das nicht allzusehr verwunderlich. Ein Großteil dieser Teilnehmer gab die Verwendung des Roche COBAS Amplicor CT/NG Testsystems an, dessen ursprüngliche Version die schwedische Variante bekanntermaßen nicht erfasst und mittlerweile durch das COBAS TaqMan CT v2.0 Testsystem ersetzt wurde. Vergleichbares gilt für die ursprüngliche Version des Abbott m2000rt CT/NG Testsystems.

Im Zusammenhang mit dem PCR-gestützten Nachweis der schwedischen Variante von *C. trachomatis* möchte ich hier auf eine aktuelle und frei zugängliche Publikation des Kollegen Magnus Unemo von der Universitätsklinik Örebro, Schweden, hinweisen. Gleichzeitig möchte ich mich bei Herrn Dr. Unemo recht herzlich für die exklusive Zusendung des entsprechenden Chlamydienisolats sowie seine Bemühungen bei dem dafür erforderlichen "Papierkrieg" bedanken. Referenz: Unemo, M., A. Rossouw, V. James and C. Jenkins (2009) Can the Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) be detected by UK NEQAS participants from seventeen European countries and five additional countries/regions in 2009 ? *Eurosurveillance*, Issue 19, 14 May 2009 (www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N19/art19206.pdf)

Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 91104 differenziert betrachtet, dann wird schnell deutlich, welche der derzeit verfügbaren kommerziellen Testsysteme diese *C. trachomatis* Mutante aus Schweden (nvCT) nicht erfassen: Hain Lifescience GenoQuick CT (13 von 13 Teilnehmern), TIB Molbiol LightMix CT (1 von 1 Teilnehmern), Roche COBAS TaqMan CT/NG (33 von 33 Teilnehmern), Roche COBAS Amplicor CT/NG (0 von 15 Teilnehmern), BD ProbeTec CT (19 von 19 Teilnehmern), Qiagen Artus CT (11 von 11 Teilnehmern), Abbott m200rt CT/NG oder Abbott *RealTime* CT/NG (6 von 7 Teilnehmern), Onar CT (1 von 1 Teilnehmern), GeneProof CT (2 von 2 Teilnehmern), BAG Hyplex CT (1 von 1 Teilnehmern) und AmpliSens CT (1 von 1 Teilnehmern).

Aufgrund des (zumindest im deutschsprachigen Raum) in klinischem Probenmaterial nur sporadisch zu erwartenden Auftretens dieser Chlamydienvariante wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis bei der Probe # 91104 diesmal nicht als "falsch-negativ" bewertet. Die 19 Ringversuchsteilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für diese Probe sollten aber die verwendeten Zielsequenzen sowie die Hybridisierungsregionen der verwendeten Primer und/oder Sonden ihrer etablierten Testsysteme überprüfen und gegebenenfalls nachbessern, um von der 377-bp Deletion im kryptischen Plasmid nicht mehr beeinträchtigt zu werden. Sollte dieses schwedische Isolat in einem der zukünftigen Ringversuche erneut zur Aussendung kommen, so wird es für den Ringversuchsleiter aus nachvollziehbaren Gründen schwierig werden, erneut "ein Auge zuzudrücken".

Die negative Probe # 91102 wurde diesmal von allen Teilnehmern als richtig negativ befundet und von den insgesamt 488 mitgeteilten Ergebnissen wurde lediglich eines von dem entsprechenden Teilnehmer als "fraglich" klassifiziert.

Wie auch bereits in früheren Ringversuchsrunden beobachtet, scheint mit 1×10^3 IFU/ml an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht ganz erreicht zu sein. Ringversuchsteilnehmer mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität sollten falsch-negative Ergebnisse daher zum Anlaß einer Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems nehmen. Angesichts der aktuellen Diskussion um das "poolen" von Untersuchungsmaterial gewinnt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme wohl noch zusätzlich an Bedeutung. Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden in der aktuellen Ringversuchsrunde nicht beobachtet.

Bis auf die diagnostische Erfassung der schwedischen *C. trachomatis* Variante waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen zu beobachten. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), Minerva Biolabs Onar CT (1x) und AmpliSens (1x) und BAG Hyplex CT (1x).

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen hinsichtlich der Erfassung der neuen schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) interessiert sind, stehen mit dem aktuellen Ringversuch standardisierte Rückstellproben mit definierter Menge an Zielorganismen zur Verfügung, die direkt über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained two almost identical samples with a relatively low amount of *C. trachomatis* target organisms (# 91101 and # 91103, *C. trachomatis*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), and one sample without target organisms (# 91102; only non-infected human cells and *Escherichia coli*). Sample # 91104 of the current set contained $\sim 1 \times 10^5$ IFU/ml of the new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT), discovered in Sweden in 2006. This strain is distinguished by a 377 bp deletion in the cryptic plasmid, which includes the targets for the Roche COBAS Amplicor/TaqMan CT/NG and Abbott m2000rt CT/NG tests.

The nvCT strain strain was also included in a recent QC trial in England. Further details can be found at: www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N19/art19206.pdf.

As depicted in table 2, no false-positive result and only a few false-negative results were reported for the first three samples of the current set. Sample # 91104, which contained significant amounts of the new CT variant, was definitely missed by participants using the former versions of the ROCHE COBAS Amplicor CT/NG and the Abbott CT assay. As expected, participants using the current versions of these test systems observed positive CT results for this particular sample.

In order to illustrate the individual performance of the assays applied by the participants, here are the number of true positive results for nvCT sample # 91104 by indicated commercial NAT test systems: Hain Lifescience GenoQuick CT (13 of 13 participants), TIB Molbiol LightMix CT (1 of 1), Roche COBAS TaqMan CT/NG (33 of 33), Roche COBAS Amplicor CT/NG (0 of 15), BD ProbeTec CT (19 of 19), Qiagen Artus CT (11 of 11), Abbott m200rt CT/NG or oder Abbott *RealTime* CT/NG (6 of 7), Onar CT (1 of 1), GeneProof CT (2 of 2), BAG Hyplex CT (1 of 1) and AmpliSens CT (1 of 1).

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

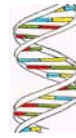


Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.
Sample composition and expected results.

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
91101	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
91102	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
91103	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
91104	+++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ⁵ IFU/mL)

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

n = 122	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	91101	91102	91103	91104	91101	91102	91103	91104	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	116	0	112	103	n.d.	2	2	2	2
Negativ	5	122	10	19	nein no	120	120	120	120
Fraglich <i>Questionable</i>	1	0	0	0	ja yes	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>	%
GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 13)	39	39 / 39	100	13	13 / 13	100
LightMix CT [21] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 30)	88	88 / 90	98	30	30 / 30	100
COBAS Amplicor [23] (n = 15)	30	30 / 45	67	15	15 / 15	100
BD ProbeTec [24] (n = 19)	51	51 / 56 [§]	91	19	19 / 19	100
Artus CT [25] (n = 11)	33	33 / 33	100	11	11 / 11	100
Abbott CT/NG [26] (n = 7)	18	18 / 21	86	7	7 / 7	100
Other commercial tests [27] (n = 11)	30	30 / 33	91	11	11 / 11	100
In house PCR assay [28] (n = 15)	40	40 / 45	89	15	15 / 15	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	5	5 / 6	83	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.



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

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 05.2009

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

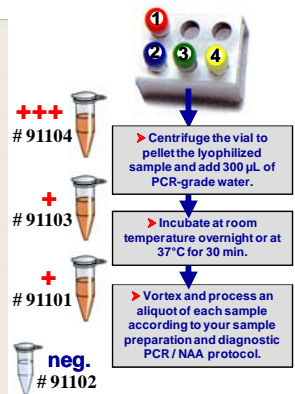
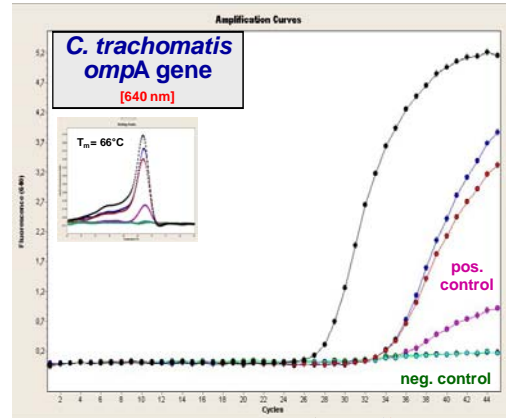
✓	11	pos. Ko. <i>Chl. trachomatis</i>	36,68
✓	12	NTC	
✓	13	91101	34,03
✓	14	91102	
✓	15	91103	34,07
✓	16	91104	27,59



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-A10_V09



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

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 05.2009

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

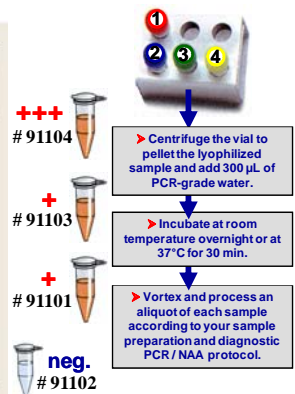
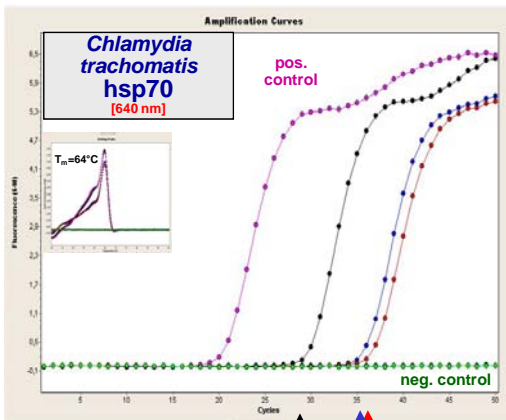
✓	7	91101	34,60
✓	8	91102	
✓	9	91103	35,57
✓	10	91104	28,57
✓	11	Pos.Ko. <i>Chtrach. hsp70</i>	19,33
✓	12	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Wood, H. U., Reischl, U., 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:
 SET: 98



INSTAND-A11_V09



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

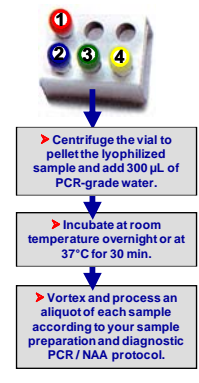
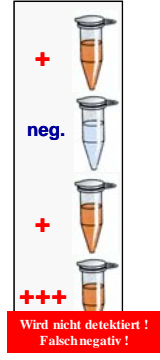
status 05.2009

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube



S 91101	CT	3.975	POSITIVE
	CNC	3.976	POSITIVE
S 91102	CT	0.002	NEGATIVE
	CNC	3.976	POSITIVE
S 91103	CT	3.975	POSITIVE
	CNC	3.675	POSITIVE
S 91104	CT	0.003	NEGATIVE
	CNC	3.976	POSITIVE



INSTAND-A12_V09

Cobas_C_trachomatis

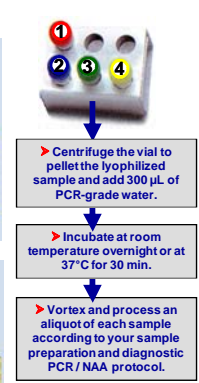
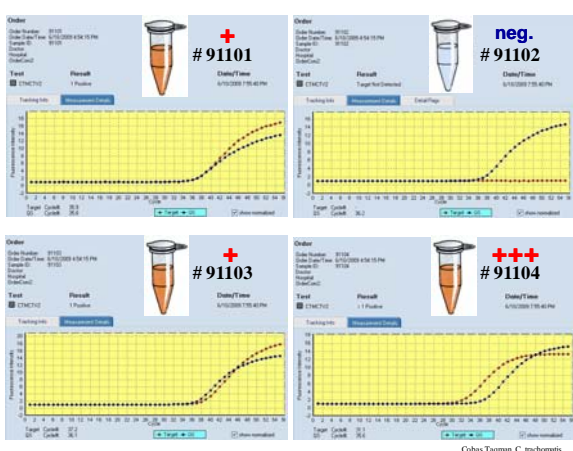


531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 05.2009

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube



INSTAND-A13_V09

Cobas Taqman_C_trachomatis



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 05.2008

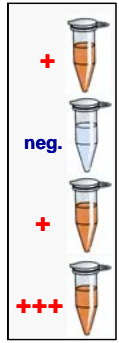
➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Straube

**Becton Dickinson
 ProbeTec CT/GC**

Probennummer	CT	CT QC
QC- (8282633)		OK
QC+ (8282633)		OK
91101	⊕+	
91102	⊖	
91103	⊕+	
91104	⊕+	

ProbeTec, J-2008



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37° C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

