



**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](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. ([www.instandev.de](http://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 536: *Legionella pneumophila***

Aufgrund zahlreicher Anfragen hier eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Legionella pneumophila* aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Einzelne Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets können daher typischerweise auch relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila* etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal zwei relativ stark positive Proben: Proben # 91602 und # 91603 wurden mit einer relativ hohen Menge von ca.  $10^6$  CFU/ml an *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 versetzt, die auch von nahezu allen der insgesamt 70 teilnehmenden Laboratorien als positiv befundet wurde. Lediglich 2 Teilnehmer berichteten bei einer der beiden hoch positiven Proben ein falsch-negatives NAT-Ergebnis. Vermutlich wurden hier Probenaufbereitungsverfahren und/oder Testsysteme mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt. Angesichts der relativ hohen Menge an *L. pneumophila* in diesem Probenmaterial sollten die entsprechenden Ringversuchsteilnehmer die verwendeten Zielsequenzen und ihre eingesetzten Testkonzepte überprüfen und dringend nachbessern.

Die Probe # 91601 des aktuellen Sets enthielt eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen (ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL *L. pneumophila*), die erfreulicherweise von 64 der insgesamt 70 Teilnehmer mit ihren NAT-gestützten Testsystemen zuverlässig nachgewiesen werden konnten. Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch einmal die mögliche Verschleppung von hochpositivem Probenmaterial während der Probenaufarbeitung und des Komplettierens entsprechender NAT-Reaktionsansätze abprüfen zu können, enthielt die letzte der 4 Proben (# 91604) diesmal nur *E. coli*. Erfreulicherweise führte diese Konstellation bei keinem der Teilnehmer zu einem falsch-positiven Ergebnis – wenngleich von 2 Teilnehmern ein als "fraglich" klassifiziertes Ergebnis für diese Probe berichtet wurde.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs zeigten sich bei keinem der Teilnehmer offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurde hier viermal die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR Protokolls sowie von einem Teilnehmer die Verwendung eines kommerziellen Testsystems mit dem *mip* Gen als *L. pneumophila*-spezifische Zielsequenzen angegeben.

Kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial kamen bei 17 Teilnehmern zum Einsatz - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits im Auswertungsbogen nicht durchgehend spezifiziert.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof LP PCR detection Kit (1x), Argene Chlamylege (1x), TibMolbiol LightMix *Legionella* (3x), LCD Array Kit (1x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x), Minerva Onar Lp *L. pneumophila* (2x) und AID CAP Bac Kit (2x). Es wird auch weiterhin interessant sein zu verfolgen, inwieweit sich im Laufe der nächsten Ringversuchsrunden Unterschiede in der analytischen Sensitivität von selbstentwickelten und kommerziellen Testsystemen abzeichnen. Von den übrigen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (*in house*) NAT Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet, und lediglich von einem der 70 Teilnehmer wurde bei einer einzelnen Probe des 4-er Sets ein vermeintliches Inhibitionsereignis bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

**RV 536: *Legionella pneumophila***

The current set of QC samples contained three positive samples. A relatively high amount of *L. pneumophila* serogroup 1 ( $\sim 1 \times 10^6$  CFU/mL) was present in samples # 91603 and # 91602. Sample # 91601 contained a tenfold lower amount of *L. pneumophila* serogroup 1 ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL). The "negative" sample # 91604 of this set contained only non-infected human cells and *Escherichia coli*. The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. With the exception of 2 false-negative results for the strong positive sample # 91602 and 6 false-negative results for sample # 91601, all of the samples containing *L. pneumophila* were tested positive by the 70 participating laboratories. No false-positive results were observed with the "negative" sample # 91604.

**PCR-/NAT *Legionella pneumophila*  
 (RV 536) Mai 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
91601	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
91602	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
91603	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
91604	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 70	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	91601	91602	91603	91604		91601	91602	91603	91604
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	64	68	70	0	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	6	2	0	68	nein <i>no</i>	69	69	69	68
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	2	ja <i>yes</i>	0	0	0	1

**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>	%
Other commercial tests [27] (n = 17)	47	47 / 51	92	16	16 / 16 <sup>§</sup>	100
In house PCR assay [28] (n = 52)	153	153 / 156	98	51	51 / 51 <sup>§</sup>	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>



## 536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila* status 05.2009

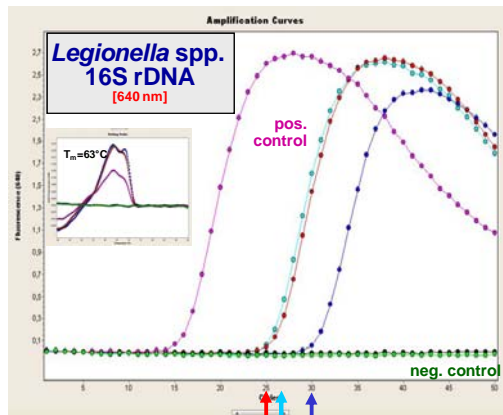
### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

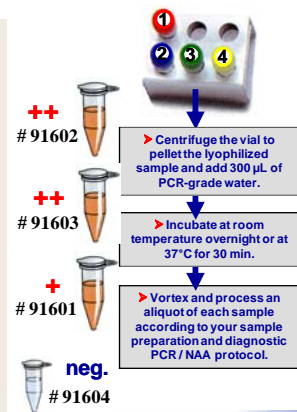
✓	1	91601	29,65
✓	2	91602	24,57
✓	3	91603	25,06
✓	4	91604	
✓	5	pos. Control L. gdm	14,99
✓	6	NTC	



**LightCycler PCR protocol:**  
 Reischl, U., H.-J. Linde, N. Lehn, O. Landt, K. Barrat, and N. Wellinghausen (2002). Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40:3814-3817



organisms / PCR reaction: ~10<sup>4</sup> ~10<sup>3</sup> 090303\_RV\_Legio 16s\_F2\_ampl.jpg



INSTAND-F03\_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>



## 536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila* status 05.2009

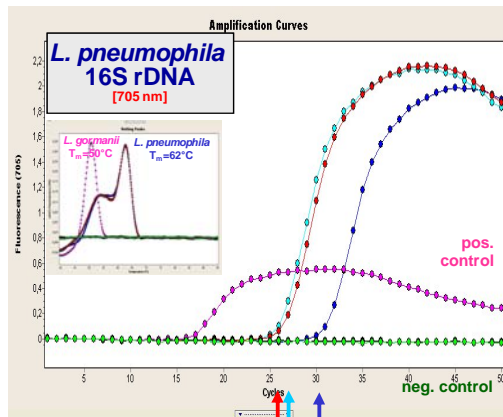
### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

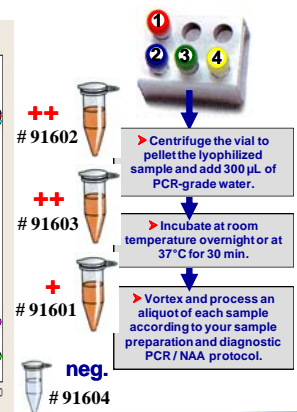
✓	1	91601	23,75
✓	2	91602	24,75
✓	3	91603	25,25
✓	4	91604	
✓	5	pos. Control L. gdm	15,13
✓	6	NTC	



**LightCycler PCR protocol:**  
 Reischl, U., H.-J. Linde, N. Lehn, O. Landt, K. Barrat, and N. Wellinghausen (2002). Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40:3814-3817



organisms / PCR reaction: ~10<sup>4</sup> ~10<sup>3</sup> 090303\_RV\_Legio 16s\_F3\_ampl.jpg



INSTAND-F04\_V09



**536 Bakteriengenom-Nachweis *Legionella pneumophila*** status 05.2009

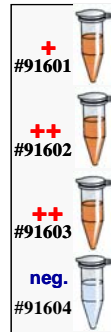
➤ **Evaluation (qualitative PCR):**

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs

**Becton Dickinson  
 ProbeTec *Legionella pneumophila***

Probennummer	LP	LP QC
QC- (8031525)		OK
QC+ (8031525)		OK
91601	⊕+	
91602	⊕+	
91603	⊕+	
91604	⊖	

BD\_Leg6\_Apr09



- 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.

