



**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 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchproben enthielt zwei Proben mit einer sehr hohen und einer etwa 100-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 91201 mit 10^7 CFU/mL und # 91204 mit 10^5 CFU/mL an *B. pertussis*), eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella bronchiseptica* als verwandte Spezies (# 91203) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 91202). Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis* DNA führte diesmal sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben zu durchwegs sehr hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich von einem der insgesamt 103 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 91202 (*E. coli*) mitgeteilt. Hierbei handelt es sich offensichtlich um ein laborinternes Kontaminationsereignis oder um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung.

Unter den insgesamt 412 mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich auch lediglich 2 falsch-positive Ergebnisse für die Proben # 91203 (*B. bronchiseptica*) und ein als "fraglich" klassifiziertes Ergebnis für die negative Probe # 91202. Inhibitionskontrollen wurden von 101 der insgesamt 103 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden dabei nur von einem Teilnehmer bei 2 Einzelproben des 4-er Sets beobachtet. Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 72 Teilnehmern die Verwendung der Insertionssequenz IS481 und von 6 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Hain Lifescience GenoQuick *Bordetella* (3x), Qiagen/Artus *B. pertussis* PCR Kit (1x), TibMolbiol LightMix *Bordetella* (3x), Minerva Onar Pertussis (1x), Attomol *Bordetella* DNA-LINA (2x), *B. pertussis* Primer/Probe Set von Cepheid (1x), und Test von ImmunDiagnostic (4x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained a samples with a relatively high amount and one approximately hundred lower amount of target organisms (# 91201 with 10^7 CFU/mL and # 91204 with 10^5 CFU/mL of *Bordetella pertussis*), one sample with a clinical isolate of the closely related species *Bordetella bronchiseptica* (# 91203) as well as one negative sample (# 91202) containing 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. However, 8 participants reported false-negative results for the *B. pertussis* sample # 91204, 2 participants reported false-negative results for sample # 91201, 2 participants reported false-positive results for the *Bordetella bronchiseptica* sample and one participant reported a false-positive result for the "negative" sample # 91202 (presumably a intralaboratory cross-contamination event). All of the remaining results reported by the 103 participants were correct. Run controls were performed by 100 participants and no inhibition events were observed in the corresponding PCR assays.

**PCR-/NAT *Bordetella pertussis*
 (RV 532) Mai 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
91201	+++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12748 (~ 1x10 ⁷ CFU/mL)
91202	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
91203	∅	62	<i>Bordetella bronchiseptica</i> , clin. isolate
91204	++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12748 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)

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

n = 103	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	91201	91202	91203	91204	91201	91202	91203	91204	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	102	1	2	95	n.d.	2	2	2	2
Negativ	1	101	99	8	nein <i>no</i>	101	100	100	101
Fraglich <i>Questionable</i>	0	1	2	0	ja <i>yes</i>	0	1	1	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>	%
Other commercial tests [27] (n = 23)	45	45 / 46	98	46	46 / 46	100
In house PCR assay [28] (n = 78)	149	149 / 156	96	150	150 / 153 §	98
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	3	3 / 4	75	4	4 / 4	100

§ Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.



532 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis* status 05.2009

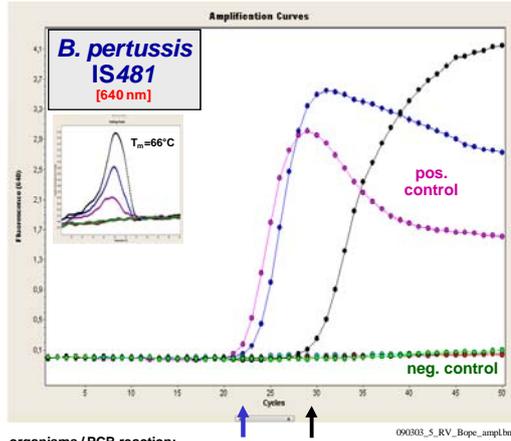
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

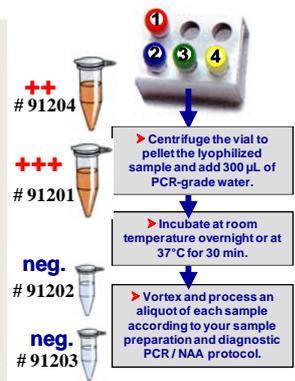
✓	19	91201	21,99
✓	20	91202	
✓	21	91203	
✓	22	91204	26,84
✓	23	Pos. Ko. B. pertussis	20,61
✓	24	NTC	[23,56]



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., K. Kösters, B. Leppmeier, H.-J. Linde, and N. Lehn (2001) Rapid detection and simultaneous differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* 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. 31-44.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^5$ $\sim 10^3$



INSTAND-B03_V09



532 Bakteriengenom-Nachweis *Bordetella pertussis* status 05.2009

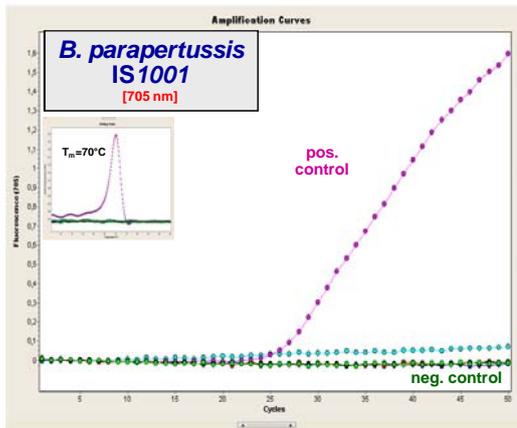
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

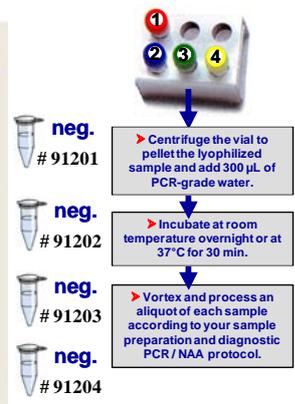
✓	25	91201	25,41
✓	26	91202	
✓	27	91203	
✓	28	91204	
✓	29	Pos. Ko. B. parapertussis	25,41
✓	30	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., K. Kösters, B. Leppmeier, H.-J. Linde, and N. Lehn (2001) Rapid detection and simultaneous differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* 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. 31-44.



organisms / PCR reaction:



INSTAND-B04_V09