



**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 534: EHEC / STEC

Wie auch bereits bei den vorhergegangenen Runden dieses Ringversuchs mehrfach diskutiert, besteht die eigentliche Herausforderung bei dem Nukleinsäure-gestützten Nachweis von EHEC/STEC prinzipiell nicht so sehr in dem Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen, sondern vielmehr in der differenzierten Analyse und der Typisierung unterschiedlicher Shiga-Toxin-Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen) von entsprechenden Zielorganismen. Aus diesem Grund werden von uns bei der Probenkonfektionierung meist nicht nur klassische "Prototyp" EHEC-Stämme (wie z.B. O157:H7), sondern relativ willkürlich auch Routineisolate aus einer inzwischen sehr umfangreichen Sammlung von *stx*-positiven *E. coli* ausgewählt.

Die zwei positiven Proben des aktuellen Probensets # 91402 (*E. coli*, klinisches Isolat, *stx*₁-positiv, *stx*₂-positiv, *eae*-negativ und *hlyA*-positiv) sowie # 91404 (*E. coli*, klinisches Isolat, *stx*₁-negativ, *stx*₂-positiv, *eae*-positiv und *hlyA*-positiv) waren diesmal mit einer relativ hohen Menge von ca. 1×10^6 CFU/ml der entsprechenden Zielorganismen versetzt. Die EHEC-negativen Proben # 91401 und # 91403 enthielten diesmal *eae*- und *hlyA*-negative Isolate von *E. coli* K12 bzw. eines *E. coli* Patientenisolats.

Die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC führte hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten - sowohl für positive als auch für negative Befunde. Aus Sicht des Ringversuchsleiters zeigten sich diesmal keine besonderen Auffälligkeiten hinsichtlich der Performance bestimmter Testkonzepte. Bis auf 3 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 91401, einem falsch-positiven Ergebnis für Probe # 91403 sowie jeweils 2 Teilnehmern mit falsch-negativem Ergebnis für Proben # 91402 bzw. # 91404 wurden durchwegs richtige PCR/NAT-Befunde übermittelt. Die wenigen falsch-positiven Ergebnisse bei Proben # 91301 und # 91403 sind wohl am ehesten mit laborinternen Kontaminationsereignissen vereinbar.

Da in den meisten der teilnehmenden Laboratorien ein NAT-gestützter Nachweis von Shiga-Toxin Genen im Umfeld der EHEC-Diagnostik primär als Kulturbestätigungstest eingesetzt wird, werden bei zukünftigen Ringversuchen auch die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten, und der Schwerpunkt bleibt auf der Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze. Werden in bestimmten Laboratorien solche Nachweisverfahren jedoch auch zum gezielten Direktnachweis von EHEC in klinischem Untersuchungsmaterial oder in Lebensmittelproben eingesetzt, so sollten falsch-negative Ergebnisse bei den relativ stark positiven Proben # 91402 und # 91404 begründeten Anlaß zur Überprüfung und Optimierung des jeweiligen Testsystems geben.

Die Mehrzahl der Teilnehmer gab die Verwendung von selbstentwickelten oder "anderen" Testsystemen mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC an, und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet. Neben den 13 Teilnehmern, die für die Testung der Ringversuchsproben den Hain GenoType EHEC Kits einsetzten, gaben weitere 9 Teilnehmer hier die Verwendung von kommerziellen NAT-Testsystemen für die Nukleinsäure-gestützte EHEC-Diagnostik an - leider wurden die Hersteller der entsprechenden Testkits nicht durchgehend spezifiziert.

Zudem wurden von 63 der insgesamt 73 Teilnehmer die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben bei den 63 Teilnehmern, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, korrekt.

RV 534: EHEC / STEC

The current set of QC samples contained two samples which were positive for EHEC: # 91402 (*E. coli*, 1×10^6 CFU/ml, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-negative and *hlyA*-positive) and # 91404 (*E. coli*, 1×10^6 CFU/ml, clinical isolate, *stx*₁-negative, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive). The EHEC-negative samples # 91401 and # 91403 contained *eae*- and *hlyA*-negative isolates of *E. coli* K12 and an *E. coli* patient isolate.

There was a pretty good diagnostic performance of the EHEC-specific assays used by the 73 participants and false-positive or false-negative results were only sporadically observed.

Only three false-positive results were observed for the "negative" sample # 91401 and one false-positive result for the "negative" sample # 991403; this may be caused by some contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection. Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples.

Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 63 laboratories and all of the reported results were correct.

**PCR-/NAT EHEC / STEC
 (RV 534) Mai 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
91401	∅	62	<i>Escherichia coli</i> (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i>)
91402	++	61 / 71, 72, 78	EHEC (~1x10 ⁶ CFU/mL) (<i>stx-1</i> , <i>stx-2</i> , <i>hlyA</i>)
91403	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i>)
91404	++	61 / 72,77,78	EHEC (~1x10 ⁶ CFU/mL) (<i>stx-2</i> , <i>eae</i> , <i>hlyA</i>)

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

n = 73	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	91401	91402	91403	91404		91401	91402	91403	91404
Befund Result									
Positiv	3	71 ¹⁾	1	71 ¹⁾	n.d.	2	2	2	2
Negativ	70	2	72	2	nein no	71	71	71	71
Fraglich Questionable	0	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
GenoType EHEC (Hain) [20] (n = 13)	25	25 / 26	96	24	24 / 26	92
Other commercial tests [27] (n = 9)	18	18 / 18	100	16	16 / 18	89
In house PCR assay [28] (n = 47)	91	91 / 94	97	94	94 / 94	100
Andere/ k.A. / other [29] (n = 4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	100

Comments:¹⁾ Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 63 laboratories. All reported results were correct.



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 05.2009

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

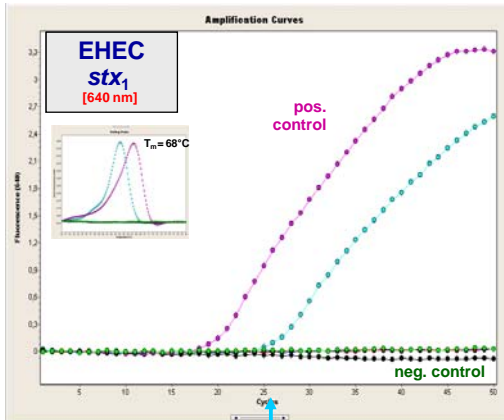
Reischl / Linde / Wolf

✓	1	91401	
✓	2	91402	25.48
✓	3	91403	
✓	4	91404	
✓	5	Pos. Ko. EHEC	18.89
✓	6	NTC	

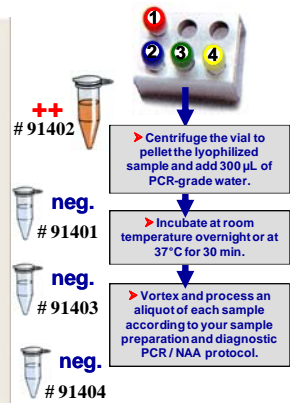


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Yousef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$



INSTAND-D03_V09



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 05.2009

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

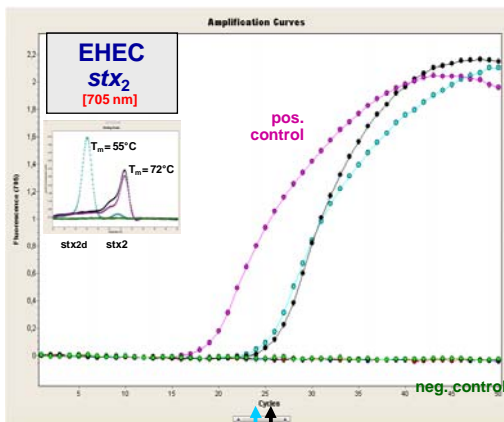
Reischl / Linde / Wolf

✓	1	91401	
✓	2	91402	24.14
✓	3	91403	
✓	4	91404	25.04
✓	5	Pos. Ko. EHEC	17.38
✓	6	NTC	

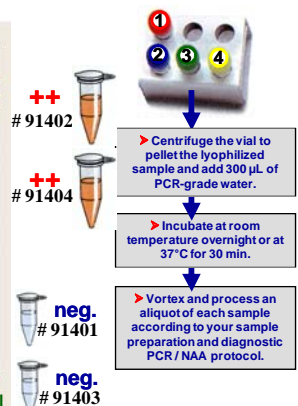


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Yousef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$



INSTAND-D04_V09



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 05.2009

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

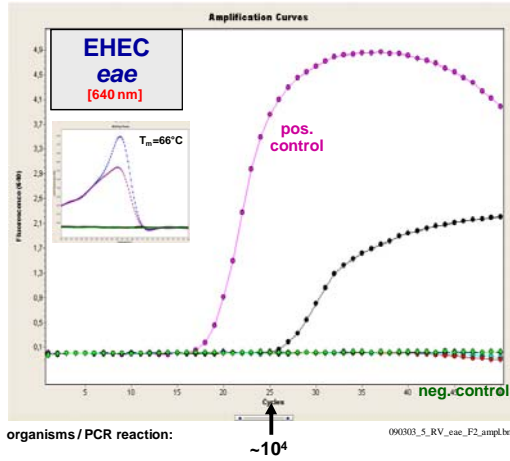
- ✓ 7 91401
- ✓ 8 91402
- ✓ 9 91403
- ✓ 10 91404
- ✓ 11 Pos. Ko. eae
- ✓ 12 NTC

25,82
17,51

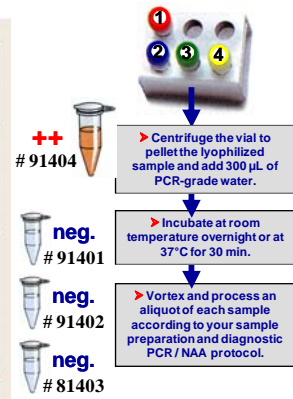


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$ 09M303_5_RV_eae_F2_ampl.bmp



INSTAND-D05_V09



534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 05.2009

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

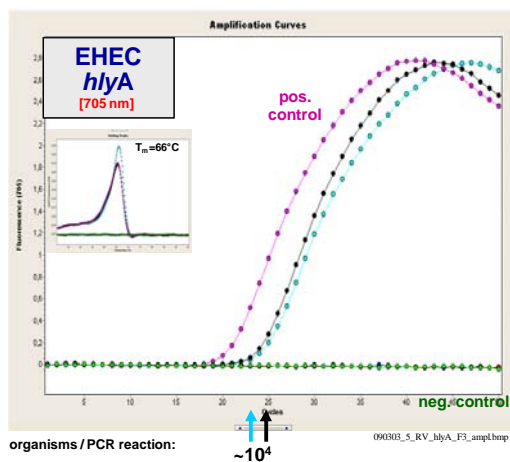
- ✓ 13 91401
- ✓ 14 91402
- ✓ 15 91403
- ✓ 16 91404
- ✓ 17 Pos. Ko. hlyA
- ✓ 18 NTC

23,85
19,77

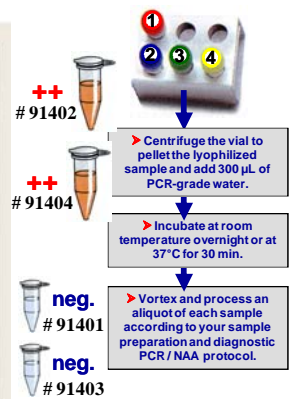


LightCycler PCR protocol:

Reischl, U., M.T. Youssef, J. Kilwinski, N. Lehn, W.L. Zhang, H.Karch, and N.A. Stroockhine (2002). Real-time fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40:2555-2565.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$ 09M303_5_RV_hlyA_F3_ampl.bmp



INSTAND-D06_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>



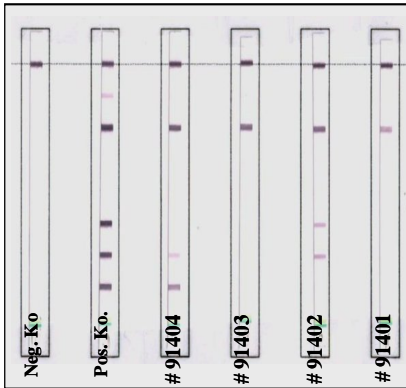
534 Bakteriengenom-Nachweis EHEC / STEC status 05.2009

➤ **Evaluation (commercial PCR assay):**

Reischl / Linde / Wolf

**GenoType EHEC
 VER 2.0**

GenoType EHEC
 Molekulargenetisches Testsystem zur Bestimmung der
 Shiga-Toxin-Gene *stx1* und *stx2*, des Intimin-Gens *eae*
 Sowie des *ipaH*-Gens



- ← Konjugatkontrolle (CC)
- ← Universalkontrolle (UC)
- ← *E. coli* / *Shigella* ssp.
- ← *ipaH* / EIEC
- ← *stx1*
- ← *stx2*
- ← *eae*



- 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.



Hain Lifescience GmbH
 Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
<http://www.hain-lifescience.de>



IN STAND-D07_V09

Hain_EHEC