



**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 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt je eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 91703; *Salmonella enterica* Serovar Tennessee, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 91702; *Salmonella enterica* Serovar Tennessee, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), eine Probe mit relativ geringer Menge (# 91701; *Salmonella enterica* Serovar Tennessee, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 91704), die ausschließlich *E. coli* enthielt.

Die hohe Menge an Zielorganismen in den Proben # 91703 und # 91702 sowie die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal (zumindest bei 3 der 4 Proben) zu relativ hohen Richtigkeitsquoten. Ein zuverlässiger Nachweis der geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 91701 bereitete jedoch 3 der insgesamt 6 Teilnehmer Schwierigkeiten. Wie bereits im vorhergegangenen Ringversuch diskutiert, scheint mit einer Konzentration von $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml an Zielorganismen die Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver NAT-gestützter Testsysteme für die zuverlässige Detektion von *Salmonella enterica* definitiv noch nicht unterschritten zu sein. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit der Probe # 91701 dieses Ringversuchs wieder Rückstellproben zur Verfügung, die eine "grenzwertig" geringe Menge von ca. 10^3 CFU/mL an *Salmonella enterica* Serovar Tennessee enthalten.

Im Gegensatz zu den früheren *Salmonella enterica* PCR/NAT-Ringversuchen waren diesmal keine falsch-positiven Ergebnisse bei der "negativen Probe" zu beobachten. Dies deutet auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 6 Teilnehmern lediglich 3 falsch-negative Befunde für eine relativ schwach positive Probe mitgeteilt. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: SureFood PATHOGEN Salmonella Plus Kit der Fa. Congen (1x).

In enger Abstimmung mit unseren Sollwert-Laboratorien werden wir weiterhin versuchen, ab und an ein etwas exotischeres Serovar von *Salmonella enterica* zu versenden und zumindest eine der 4 Proben mit einer relativ geringen Menge an Zielorganismen zu versetzen - auch wenn im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften und/oder Richtlinien der einzelnen Fachgesellschaften derzeit noch keine genauen unteren Nachweisgrenzen für den NAT-gestützten Salmonellen-Nachweis festgelegt wurden.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained a kind of *Salmonella enterica* dilution series. A relatively high amount of the corresponding target organism was present in sample # 91703 (*Salmonella enterica* serovar Tennessee, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), an approximately tenfold lower amount was present in sample # 91702 (*Salmonella enterica* serovar Tennessee, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), and sample # 91701 contained an approximately hundredfold lower number of *Salmonella enterica* serovar Tennessee organisms ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml). No target organisms but only *E. coli* cells were present in sample # 91704. No false-positives and only 2 false-negatives were among the 24 results reported by the 6 participating laboratories. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays.

**PCR-/NAT *Salmonella enterica*
 (RV 537) Mai 2009**



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

Gruppe A	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
91701	(+)	61	<i>S. enterica</i> Tennessee (~ 1x10 ³ CFU/mL)
91702	++	61	<i>S. enterica</i> Tennessee (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
91703	+++	61	<i>S. enterica</i> Tennessee (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
91704	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 6</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	91701	91702	91703	91704		91701	91702	91703	91704
<i>Befund Result</i>									
Positiv	3	6	6	0	n.d.	0	0	0	0
Negativ	3	0	0	6	nein no	6	6	6	6
Fraglich Questionable	0	0	0	0	ja yes	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>	%
Other commercial tests [27] (n = 1)	2	2 / 3	67	1	1 / 1	100
In house PCR assay [28] (n = 5)	13	13 / 15	87	5	5 / 5	100



537 Bakteriengenom-Nachweis *Salmonella enterica* status 05.2009

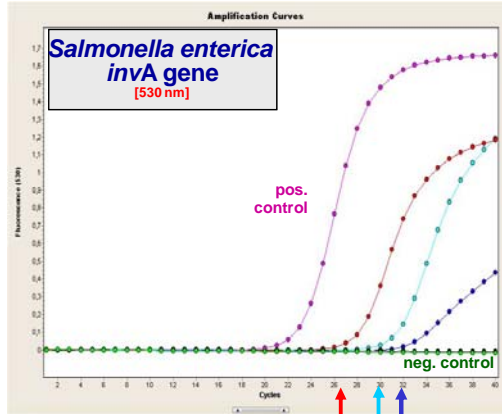
➤ **Evaluation** (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

✓	1	91701	31,28
✓	2	91702	30,08
✓	3	91703	26,67
✓	4	91704	
✓	5	pos. Control <i>Salmonella</i>	21,81
✓	6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Daam et al. (2002), *J. Clin. Microbiol.*
 40: 3050-3052.
 (TagMan assay format)



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$ $\sim 10^3$ $\sim 10^2$

