



**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 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. So wie im Fall der Probe # 91801, die eine relativ hohe Menge an *L. ivanovii* enthielt. Im Gegensatz zum vorherigen Ringversuch, bei dem eine nahezu identische Probe noch bei 2 Teilnehmern zu richtig positiven Ergebnissen geführt hatte, wurden diesmal durchgehend negative Ergebnisse für die Probe # 91801 berichtet. Hintergrund dieser Befundkonstellation ist die fast ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen NAT-Testsystemen, die keine selektive Detektion bzw. differenzierte Erfassung von non-*monocytogenes* Listerienspezies erlauben. Im Umkehrschluß spricht diese Datenlage dann für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme bei 20 der insgesamt 23 Teilnehmer. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung. Hält ein Teilnehmer lediglich ein ***L. monocytogenes*-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Probe # 91802 enthielt diesmal mit $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL eine relativ hohe Menge an Zielorganismen, die erwartungsgemäß von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen NAT-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnten. Mit $\text{ca. } 1 \times 10^4$ CFU/mL *L. monocytogenes* pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 91803 diesmal eine etwa zehnfach geringere Menge an entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde auch diese schwächer positive Probe von 21 der insgesamt 23 Teilnehmer als "positiv" klassifiziert. Lediglich 2 Teilnehmer berichteten hier ein negatives Ergebnis - vermutlich wurde in diesen Fällen ein Testsystem mit unzureichender analytischer Sensitivität verwendet. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 91704; ausschließlich *E. coli*). Auch hier wurden diesmal keine falsch-positiven Ergebnisse aufgrund von mangelnder Spezifität der eingesetzten Testsysteme oder Kontaminationsereignissen während der Probenaufarbeitung beobachtet.

Von 22 der insgesamt 23 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TibMolbiol LightMix *L. monocytogenes* (1x) und Ingenetix (1x).

Obwohl wir uns innerhalb dieses Ringversuchsprogramms gelegentlich auch mit einzelnen Proben an die derzeit technisch machbare untere Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns dabei sehr wohl bewusst, daß bei vielen Fragestellungen das "technisch machbare" nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem "diagnostisch sinnvollen" ist), bestand beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostische Herausforderung eher in der möglichst selektiven Detektion bzw. differenzierten Erfassung von non-*monocytogenes* Listerienspezies. Leider wurden fast ausschließlich Testsysteme eingesetzt, die eine derartige Differenzierung nicht ermöglichen. In zukünftigen Ringversuchsrunden werden wir uns daher wohl eher wieder der Abprüfung von unteren Nachweisgrenzen widmen.

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 91804; only *E. coli* cells), two samples positive for *L. monocytogenes* and one sample with *Listeria ivanovii* as a *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. A relatively high number of *L. monocytogenes* ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) was present in sample # 91802 and the corresponding DNA preparations tested positive by the PCR assays of 22 participants. Sample # 91803 contained an approximately hundredfold lower number of target organisms ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and was also reported positive by 21 of the 23 participants. Although the third sample contained a significant amount of *Listeria ivanovii* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), it was tested negative by all of the participating laboratories. The simple reason: all of the participants indicated the use of a *L. monocytogenes*-specific PCR assay and "negative" would therefore be the correct and expected result in this case. As mentioned in the Report form, participants who are performing molecular tests covering only *L. monocytogenes* may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. It is a pleasure to see that only correct results were observed in the course of this external PCR assay validation - and, again, this indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

PCR-/NAT *Listeria spp.*
(RV 538) Mai 2009



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
91801	++	61 /72	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119
91802	+++	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
91803	++	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
91804	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 23	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	91801	91802	91803	91804		91801	91802	91803	91804
Befund <i>Result</i>									
Positiv	0	22	21	0	n.d.	1	1	1	1
Negativ	23 ¹⁾	1	2	23	nein <i>no</i>	22	22	22	22
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	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>	%
Other commercial tests [27] (n = 3)	5	5 / 9	56	3	3 / 3	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 20)	38	38 / 60	63	20	20 / 20	100

Comments: ¹⁾ Due to the predominant use of *L. monocytogenes*-specific PCR assays, negative PCR results with sample # 91801 were not rated as "false negative".



538 Bakteriengenom-Nachweis *Listeria spp.* status 05.2009

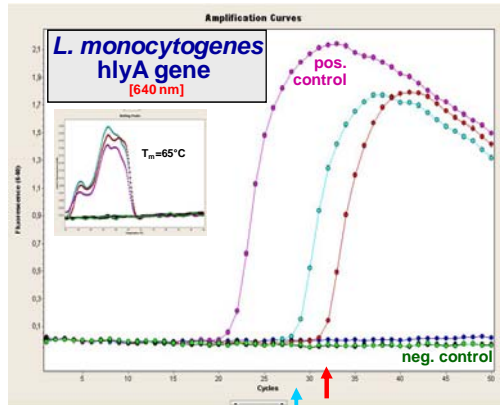
➤ **Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf

1	91801	26.79
2	91802	29.91
3	91803	
4	91804	
5	pos. Control Line	19.77
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction:

$\sim 10^4$

090311_6_RV_Linco_amp1.jpg

