



**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 540: *Chlamydia (Chlamydomphila) pneumoniae*

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

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 91412; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/ml), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 91413; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml), eine Probe mit sehr geringer Menge (# 91414; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 91411; nur *E. coli*).

Wie auch schon in vorhergegangenen Ringversuchen zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Während alle bis auf einen Teilnehmer die Zielorganismen in der Probe # 91412 und alle bis auf 2 Teilnehmer die Zielorganismen in der Probe # 91413 sicher nachweisen konnten, so gelang dies bei der Probe # 91414 nur noch 77 der insgesamt 88 Teilnehmer. Hier nähern wir uns also wieder einmal der klassischen Konstellation nahe der unteren Nachweisgrenze von diagnostischen NAT-Testkonzepten, bei der die statistische Verteilung der infizierten Zellen bzw. der Zielorganismen innerhalb des zu untersuchenden Probenmaterials zum Tragen kommt. Diese Ergebnislage kann sowohl durch eine ungleichmäßige Verteilung der wenigen *C. pneumoniae* Genome in den pipettierten Aliquots der resultierenden DNA-Präparation, als auch durch die Verwendung von Testsystemen mit unterschiedlich guten analytischen Sensitivitäten begründet sein. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 91414 wurden die mitgeteilten Ergebnisse nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schattierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet.

Erfreulicherweise wurden bei der negativen Probe # 91411 diesmal nur 2 falsch-positive Ergebnisse berichtet, was für ein überraschend gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen spricht. Die falsch-positiven Ergebnisse bei den "negativen" Proben sollten jedoch den entsprechenden Teilnehmern Anlaß geben, ihre DNA Extraktionsprotokolle und/oder ihre NAT-gestützten Testsysteme auf gewisse Mängel hinsichtlich der Kontaminationsicherheit zu überprüfen.

Bis auf 3 Teilnehmer haben alle selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde dabei lediglich bei einem Teilnehmer und hier auch nur bei einer der vier versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs beobachtet (?). Aufgrund des leider noch relativ geringen Anteils und der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Das in dieser Ringversuchsserie erstmals mit einer eigenen Codenummer aufgeführte und seit kurzem auch kommerziell verfügbare LightMix *C. pneumoniae* real-time PCR Testsystem der Fa. TIB Molbiol, Berlin, wurde von 8 Teilnehmern verwendet. Bis auf ein falsch-positives Ergebnis bei einem Teilnehmer konnten damit alle 4 Proben dieses Ringversuchs korrekt analysiert und detektiert werden.

Unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Immundiagnostik GenID CAP Bac Kit (3x), GenProof CHP (2x), Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit der Fa. Euroclone (1x), Nanogene (2x), und BD ProbeTec *C. trachomatis* (1x).

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der analytischen Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen im Rahmen dieses Ringversuchs (vor allem mit der Probe # 91414 als "analytische Herausforderung") wiederum zahlreiche Sets an standardisierten Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

RV 540: *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*

The current set of QC samples contained three samples positive for *C. pneumoniae* in a kind of dilution series. Sample # 91412 was spiked with a relatively high number of *C. pneumoniae* target organisms ($\sim 1 \times 10^5$ IFU/ml). Sample # 91413 contained an approximately ten times lower number of *C. pneumoniae* (1×10^4 IFU/ml), sample # 91414 contained a hundred times lower amount of *C. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), and "negative" sample # 91411 contained no target organisms but only *E. coli* cells.

As depicted in table 2, only 2 false-positives for sample # 91411 (presumably due to intralaboratory contamination events) and three false-negative results were observed for samples # 91412 and # 91413. Interestingly, a considerable number of the participating laboratories failed to detect the target organisms in the weak-positive sample # 91414. In agreement with the previous rounds of our QC initiative for direct detection of *C. pneumoniae* DNA, it seems that we have touched the lower limit of detection for several commercial and *in-house* PCR assays with $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml of *C. pneumoniae*. **Note:** when 100 μ l of the sample were subjected to the DNA preparation procedure (100 μ l elution volume) and 5 μ l were used as template DNA in the PCR reaction mix, a concentration of target organisms $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml in the original sample corresponds to about 10 genome copies per PCR reaction. So we have not scored a (false) negative result for the latter sample in the course of issuing the corresponding QC certificates.

**PCR-/NAT *Chlamydia pneumoniae*
 (RV 540) Mai 2009**



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

Gruppe A	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
91411	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
91412	+++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁵ IFU/mL)
91413	++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
91414	+	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)

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

<i>n</i> = 88	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	91411	91412	91413	91414		91411	91412	91413	91414
Befund <i>Result</i>									
Positiv	2	87	86	77	n.d.	3	3	3	3
Negativ	85	1	2	11 ¹⁾	nein <i>no</i>	84	85	85	85
Fraglich <i>Questionable</i>	1	0	0	0	ja <i>yes</i>	1	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>	%
LightMix <i>C.pneumoniae</i> [21] (n = 8)	24	24 / 24	100	7	7 / 8	88
Other commercial tests [27] (n = 18)	51	51 / 54	94	16	16 / 17 [§]	94
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 61)	172	172 / 183	94	61	61 / 61	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100

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

Comments: ¹⁾ 11 of the 88 participants reported negative results for sample # 91414. Due to the low number of target organisms, we have not rated them as "false-negative", but the corresponding participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.



540 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia pneumoniae* status 05.2009

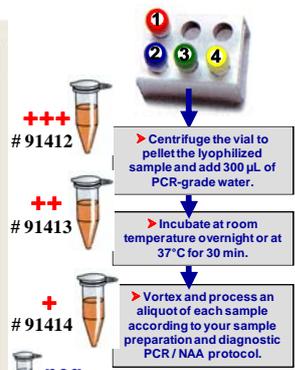
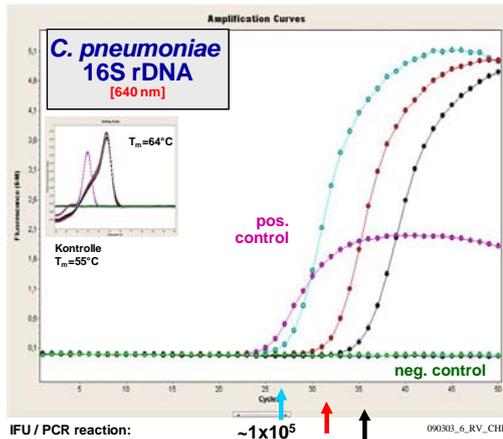
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

- 7 91411 26,67
- 8 91412 31,07
- 9 91413 34,62
- 10 91414 23,89
- 11 pos. Control *C. pneumoniae*
- 12 NTC



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., N. Lehn, U. Sinnacher, R. Marre, and A. Essig (2003) Rapid and standardized detection of *Chlamydia pneumoniae* using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21:54-57.



INSTAND-J03_I/09



540 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia pneumoniae* status 05.2009

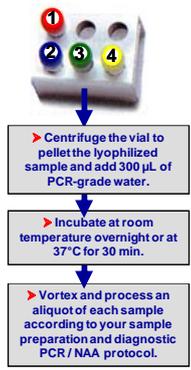
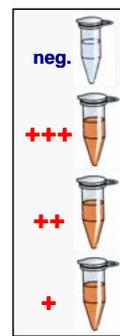
Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs

Becton Dickinson ProbeTec *Chlamydia Family (CF)*

Probennummer	iCF	iCF QC
QC- (8122676)		OK
QC+ (8122676)		OK
91411	⊖	
91412	⊕+	
91413	⊕+	
91414	⊕+	

iCF BD



INSTAND- J04_I/09