



**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 541: *Mycoplasma pneumoniae*

Nach der erfolgreichen Durchführung der Proberingversuche Anfang 2009 wurde der Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Mycoplasma pneumoniae* in unser reguläres Programm aufgenommen. Er ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Mycoplasma pneumoniae* aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Da NAT-gestützte Verfahren zum Direktnachweis geringer Mengen an *Mycoplasma pneumoniae* aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterial vor allem zur differentialdiagnostischen Abklärung respiratorischer Infektionen zunehmend an Aktualität gewinnen, sind bereits einige Testsysteme bzw. Testkits kommerziell verfügbar. Deren Verwendung wird im Zuge dieses Ringversuchs auch systematisch abgefragt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt können aber noch keine grundlegenden Bewertungen hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität von individuellen Testkonzepten getroffen werden, und die in der Tabelle 3 dargestellten Zahlenwerte haben noch eher einen orientierenden Charakter.

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 (# 91421; *M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ Genomkopien/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 91422; *M. pneumoniae*, $\sim 6 \times 10^4$ Genomkopien/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 91424; *M. pneumoniae*, $\sim 7 \times 10^3$ Genomkopien/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 91423; enthielt nur humane Zellen und *E. coli*).

Erfreulicherweise wurden im Rahmen des aktuellen Probensets durchwegs hohe Richtigkeitsquoten beobachtet. Auch wenn es sich hier um einen relativ neu eingeführten Ringversuch handelt und umfassende Erfahrungswerte aus früheren Ringversuchsrunden noch fehlen, so zeigt die Auswertung der Ergebnisse bereits deutlich auf, daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *M. pneumoniae* DNA mit einer Menge von ca. $\sim 7 \times 10^3$ Genomkopien/mL Probenmaterial noch nicht ganz erreicht zu sein scheint. **Anmerkung des Ringversuchsleiters:** bei einer DNA-Aufreinigung aus 100 µl Probenmaterial, einer Elution in 100 µl und der Verwendung von 5 µl template input entspricht diese Menge ca. 50 Genomkopien pro NAT-Reaktionsansatz.

So konnten diesmal 85 bzw. 86 der insgesamt 88 Teilnehmer die *M. pneumoniae* DNA in den zwei höher positiven Proben # 91421 bzw. # 91422 problemlos und zuverlässig nachweisen. Zudem wurden, mit Ausnahme von 4 Teilnehmern, bei der negativen Probe # 91423 von den 88 Teilnehmern keine falsch-positiven Ergebnisse berichtet, was zumindest bei den meisten der teilnehmenden Laboratorien für ein gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen spricht.

Aufgrund der insgesamt doch relativ geringen Menge an Zielorganismen wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives NAT-Ergebnis bei der Probe # 91424 diesmal nicht als "falsch-negativ" bewertet. Wird in einem diagnostischen Labor jedoch der hochsensitive Nachweis von *M. pneumoniae* DNA aus klinischem Untersuchungsmaterial angestrebt, so sollte ein falsch-negatives Ergebnis bei dieser Probe dennoch Anlaß zur kritischen Überprüfung und Optimierung des jeweiligen Testsystems geben. Die in dieser Ringversuchsserie erstmals mit eigenen Codenummern aufgeführten kommerziellen Testsysteme TIB Molbiol LightMix *M. pneumoniae* (6 Teilnehmer), Qiagen/artus *M. pneumoniae* LC PCR Kit (5 Teilnehmer), sowie Minerva Venor Mp (4 Teilnehmer) konnten mit erfreulich guten Ergebnissen aufwarten: von den entsprechenden Teilnehmern wurden alle 4 Proben dieses Ringversuchs korrekt analysiert und detektiert.

Die diagnostische Performance eines etablierten *in-house* Protokolls und ausgewählter kommerzieller NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae* DNA wurde kürzlich im Rahmen einer systematischen Studie untersucht. Auch hier erwiesen sich diese Testsysteme als

spezifisch, sensitiv und auch zuverlässig bezüglich der Erfassung aller relevanten *M. pneumoniae* Subtypen und Varianten: Dumke, R. und E. Jacobs (2009) Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 47: 441-444.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Argene Chlamydege (1x), Immundiagnostik CAP Bac Kit (2x), Nanogene (1x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (1x), und LCD Array Kit(1x).

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of the corresponding target organism. Sample # 91421 contained a relatively high number of *M. pneumoniae*-infected cells ($\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL), one sample contained a tenfold lower amount of target cells (# 91422; *M. pneumoniae*, $\sim 6 \times 10^4$ genome copies/mL) and one sample contained an approximately hundredfold lower amount of target cells (# 91424; *M. pneumoniae*, $\sim 7 \times 10^3$ genome copies/mL). The set was completed by sample # 91423, which contained no *M. pneumoniae*-infected cells but only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Despite the relatively low amounts of target organisms in sample # 91424 of the current set, the availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a surprisingly high portion of correct results. Among the *Mycoplasma pneumoniae*-specific results reported by the 88 participants, only 11 false-negative results (presumably due to some minor analytical sensitivity issues in the corresponding PCR-based assays) and 4 false-positive result (presumably caused by intralaboratory cross-contamination events) were reported. All in all, a very good diagnostic performance was observed for the *M. pneumoniae*-specific PCR assays used by the 88 participants. It is noteworthy to mention that all of the participants who indicated the use of the following commercial test systems or commercial PCR kits have obtained correct results for all samples of this ring trial: TIB Molbiol LightMix *M. pneumoniae* (6 participants), Qiagen/artus *M. pneumoniae* LC PCR Kit (5 participants), and Minerva Venor Mp (4 participants).

**PCR-/NAT *Mycoplasma pneumoniae*
 (RV 541) Mai 2009**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|----|--|
| 91421 | +++ | 61 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 5,3 x 10 ⁵ genome copies/mL) |
| 91422 | ++ | 61 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 6,3 x 10 ⁴ genome copies/mL) |
| 91423 | Ø | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 91424 | + | 61 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 7,6 x 10 ³ genome copies/mL) |

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

| n = 88 | Probennummer (Sample no.) | | | | Inhibition | | | | |
|--------------------------|---------------------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|----|
| | 91421 | 91422 | 91423 | 91424 | 91421 | 91422 | 91423 | 91424 | |
| Befund Result | | | | | | | | | |
| Positiv | 85 | 86 | 4 | 82 | n.d. | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Negativ | 3 | 2 | 84 | 6 | nein no | 87 | 87 | 87 | 87 |
| 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 | % |
| LightMix <i>M.pneumoniae</i> [20] (n = 6) | 18 | 18 / 18 | 100 | 6 | 6 / 6 | 100 |
| Qiagen <i>M.pneumoniae</i> [21] (n = 5) | 15 | 15 / 15 | 100 | 5 | 5 / 5 | 100 |
| Minerva Venor Mp [22] (n = 4) | 12 | 12 / 12 | 100 | 4 | 4 / 4 | 100 |
| Commercial assay / kit [27] (n = 15) | 43 | 43 / 45 | 96 | 15 | 15 / 15 | 100 |
| In house PCR assay [28] (n = 56) | 161 | 161 / 168 | 96 | 52 | 52 / 56 | 93 |
| Andere / k.A. / other [29] (n = 2) | 4 | 4 / 6 | 67 | 2 | 2 / 2 | 100 |



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>



541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 05.2009

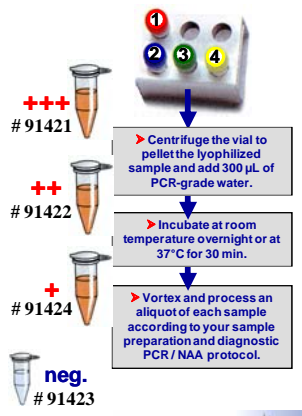
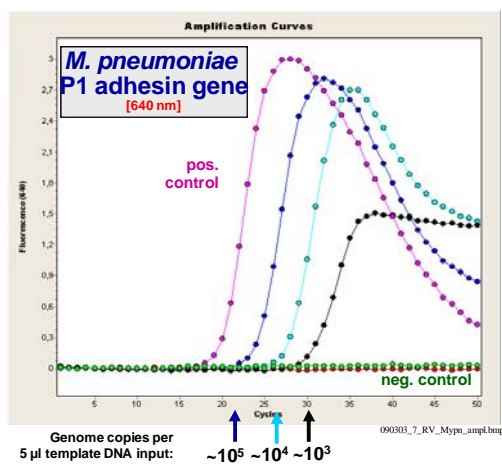
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs

| Include | Color | Pos. Name | CP |
|---------|-------|---------------------------|-------|
| ✓ | 1 | 91421 | 22,89 |
| ✓ | 2 | 91422 | 26,47 |
| ✓ | 3 | 91423 | |
| ✓ | 4 | 91424 | 29,09 |
| ✓ | 5 | pos. <i>M. pneumoniae</i> | 18,53 |
| ✓ | 6 | NTC | |



LightCycler PCR protocol:
 In-house LightCycler protocol based on:
 Sharma et al. (1998) Detection and
 Confirmation of *Mycoplasma pneumoniae*
 in Urogenital Specimens by PCR. JCM
 36:277-280.



INSTAND-K03_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>



541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 05.2009

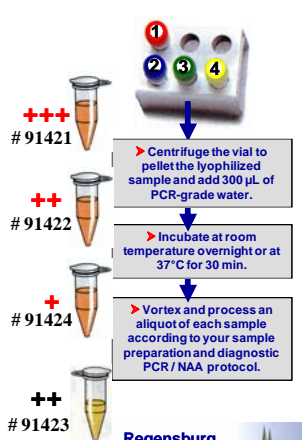
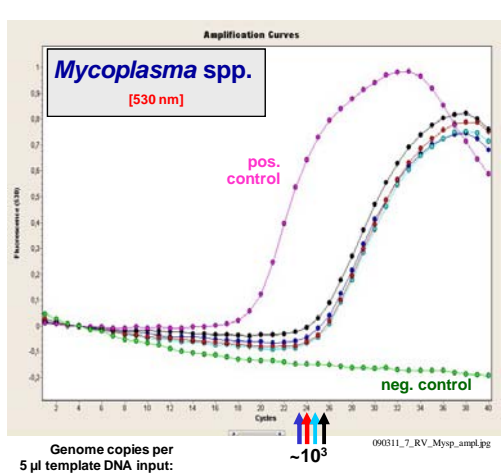
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs

| | | |
|---|-------------------------------|-------|
| 1 | 81421 | 26,98 |
| 2 | 81422 | 26,95 |
| 3 | 81423 | 26,95 |
| 4 | 81424 | 27,00 |
| 5 | pos. <i>Ko. Mycoplasma</i> ZK | 20,77 |
| 6 | NTC | |



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol
 (Reischl, U., Regensburg).



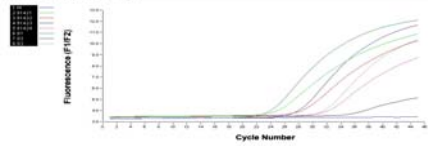
INSTAND-K04_V09



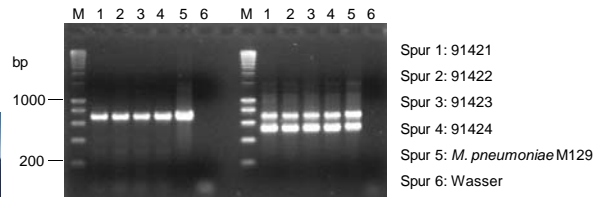
541 Bakteriengenom-Nachweis *Mycoplasma pneumoniae* status 05.2009

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

Reischl / Linde / Wolf / Jacobs



Ergebnisse der in-house real-time PCR
 (Zielsequenz: repMp1) zum Nachweis von *M. pneumoniae*



Ergebnisse der Mykoplasmen-spezifischen nested PCR
 (Zielsequenz: 16S rDNA)

Data kindly provided by
 Dr. Roger Dumke
 Institut für Medizinische Mikrobiologie
 und Hygiene, TU Dresden, Germany

INSTAND-K05_V09



➤ 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.

