



Regensburg, den 19. Oktober 2007

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 541)**

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find a cover letter in English on page 16 of this document and
tables with the results 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. N. Lehn, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

AKTUELLER HINWEIS:

Wie bereits erwähnt, sind wir bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche stets bemüht, den Anregungen und Wünschen von Seiten der Teilnehmer möglichst zeitnah und professionell Rechnung zu tragen. Um unser Spektrum an respiratorischen Pathogenen sinnvoll zu erweitern, werden wir ab April 2008 einen zusätzlichen Ringversuch **RV 541 "Mycoplasma pneumoniae"** anbieten. Interessierte Laboratorien konnten sich bereits im Vorfeld bei INSTAND e.V. für die Teilnahme an einem Probe-Ringversuch anmelden von dem diesmal nur eine limitierte Anzahl von Probensets verfügbar war. Eine kurze Diskussion dieses Probe-Ringversuchs findet sich in dieser Auswertung. Nach der erfolgreichen Evaluierung wird dieser neue Ringversuch zusammen mit den bereits etablierten Ringversuchen für *Chlamydia pneumoniae* und *Legionella pneumophila* als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen. Damit ist der weltweit erste regelmäßige Ringversuch für den gezielten Nachweis von *Mycoplasma pneumoniae* DNA verfügbar und das sog. "CAP-Panel", zumindest bezüglich der bakteriellen Erreger, für die ein NAT-gestützter Nachweis in vielen Fällen sinnvoll sein kann, weitgehend abgedeckt.

Die Konzeption und Auswertung des neuen *Mycoplasma pneumoniae*-spezifischen Ringversuchs erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit **Herrn Professor Jacobs** vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden.

Angesichts der wachsenden Zahl an einzelnen und damit auch individuell zu diskutierenden Ringversuchen werde ich mich zukünftig bemühen, den Umfang dieser turnusmäßigen Ringversuchsauswertung in überschaubaren Grenzen zu halten und dabei dennoch versuchen alle essentiellen Informationen für die einzelnen Teilnehmer darzustellen. Ich hoffe, daß dies in zufriedenstellender Weise gelingen wird und freue mich natürlich auf jede Art von Rückmeldung aus dem Kreis der geschätzten Ringversuchsteilnehmer.

Aufgrund der überraschend hohen Anzahl an Teilnehmern wurden bei diesem Ringversuch für einige der angebotenen Parameter zwei unterschiedliche Gruppen von Probensets ausgesandt. Diese beiden Gruppen sind in den entsprechenden Tabellen separat aufgeführt und statistisch ausgewertet. Im Rahmen dieser Diskussion werden die beiden Gruppen aber nur dann gesondert diskutiert, wenn irgendwelche Auffälligkeiten in der Testperformance zu beobachten waren.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

SEPTEMBER 2007:

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 bzw. als grenzwertig positiv zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befinden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 72002, # 72102, # 72103), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 72001), *Bordetella pertussis* (Probe # 72201 und 72207), *Helicobacter pylori* (Probe # 72303), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 72502 und # 72504), MRSA (Proben # 72901), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 72414) sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 72422). 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 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, 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 prozentualem 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. als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *L. 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. Im aktuellen Ringversuch wurde dies mit der humanpathogenen Spezies *Listeria ivanovii* (Probe # 72804, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml) praktiziert. Die Verfügbarkeit von gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte bei dem aktuellen Ringversuch zumindest bei der stark positiven Probe # 72801 (*Listeria monocytogenes*, $\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml) und der negativen Probe # 72802 (*E. coli* K12) zur Mitteilung von vorwiegend richtigen Ergebnissen.

Da 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), bestanden auch beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostischen Herausforderungen sowohl in der Detektion bzw. differenzierten Erfassung von non-monocytogenes Listerienspezies als auch in der Abprüfung der analytischen Sensitivität individueller Testkonzepte.

Nachdem in einigen der vorhergegangenen Ringversuche (beispielsweise mit Probe # 52801, *Listeria monocytogenes*, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml) die untere Nachweisgrenze hochsensitiver NAT-gestützter Testsysteme bereits etwas unterschritten schien, wurde im aktuellen Ringversuch mit der Probe # 72803 (*Listeria monocytogenes*, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml) erneut die analytische Sensitivität der verwendeten Testkonzepte evaluiert bzw. abgeprüft. Diese Menge an Zielorganismen konnte von der Mehrzahl der Teilnehmer einwandfrei nachgewiesen werden. Wie aus Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei dieser Probe von 12 der insgesamt 17 Teilnehmer positive NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Vier der 5 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für Probe # 72803 führten die Verwendung von eigenentwickelten *in-house* PCR Protokollen mit Agarosegel-Analyse bzw. nested-PCR zur Detektion spezifischer PCR-Produkte auf und ein Teilnehmer gab die Verwendung des kommerziellen RealArt *Listeria monocytogenes* Testsystems an. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit der Probe # 72803 wieder standardisierter Rückstellproben mit geringerer Menge an Zielorganismen zur Verfügung, die als untere Meßplatte bezüglich der analytischen Sensitivität dienen können und über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind.

Von allen 17 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet. Entsprechende Zertifikate wurden 16 Teilnehmern erteilt.

Bei diesem Ringversuch besteht 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. Da dies bei 12 der insgesamt 17 Teilnehmer der Fall war, wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die Probe # 72804 (*Listeria ivanovii*) diesmal nicht als "falsch-negativ" bewertet.

**PCR-/NAT *Listeria* spp.
 (RV 538) September 2007**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
72801	++	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (~ 5x10 ⁶ CFU/mL)
72802	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12
72803	+	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
72804	+	61 /72	<i>Listeria ivanovii</i> (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)

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

n = 17	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	72801	72802	72803	72804		72801	72802	72803	72804
Befund Result									
Positiv	17	1	12	3	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	16	5	14 ¹⁾	nein no	17	17	17	17
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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative		Absolut Absolute	Relativ Relative	
In house PCR assay [28] (n = 16)	30	30 / 48	63	16	16 / 16	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 3	67	0	0 / 1	0

* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.

Comments: ¹⁾ Due to the predominant use of *L.monocytogenes*-specific PCR assays, negative PCR results with sample # 72804 were not rated as "false negative".



538 Bakteriengenom-Nachweis *Listeria spp.* status 09.2007

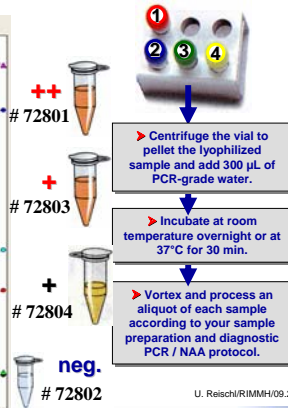
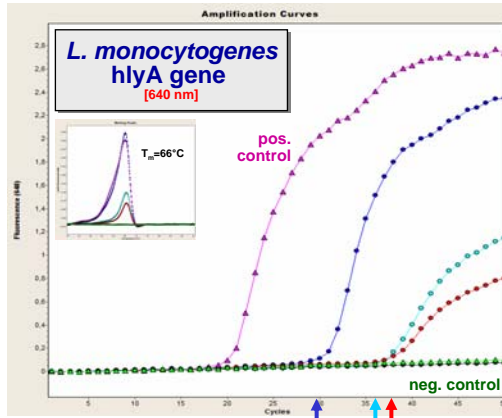
➤ **Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Lehn / Wolf

7	72801	30.66
8	72804	37.11
9	72803	37.67
10	72802	
11	Positive Listeria	20.03
12	Negative control	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



U. Reischl/RIMMH/09.2007

