

# Survey results on nucleic acid tests of infectious diseases: present status and need for rapid and near-patient diagnostics

## Abstract

This survey discusses current and emerging isothermal and rapid polymerase chain reaction (PCR) based nucleic acid amplification methods for near-patient diagnostics.

To assess the clinical need of rapid diagnostics for infectious diseases based on nucleic acid tests (NATs) we performed and analysed a questionnaire among laboratories participating in corresponding INSTAND ring trials for external quality assurance. The questions concerning new amplification technologies like isothermal nucleic acid amplification, potentially suited to significantly decrease turnaround times, were complemented by questions to evaluate the present status of NATs. Besides end-users, companies were also addressed by sending out a manufacturer specific questionnaire.

Analysis of the answers from 48 laboratories in 14 European countries revealed that a much shorter turnaround time is requested for selected pathogens compared to about 2 h or longer when applying temperature cycling amplification, i.e. PCR. In this context, most frequently mentioned were methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), norovirus, influenza A and B viruses, cytomegalovirus (CMV) as well as hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV). At present, 8% of the laboratories having participated in this survey apply isothermal amplification of nucleic acids to identify infectious pathogens.

**Keywords:** nucleic acid tests, infectious diseases, virus detection, bacteria detection, isothermal nucleic acid amplification, status report, questionnaire, NAT, PCR

Jörg Neukammer<sup>1</sup>  
Martin Hussels<sup>1</sup>  
Andreas Kummrow<sup>1</sup>  
Alison Devonshire<sup>2</sup>  
Carole Foy<sup>2</sup>  
Jim Huggett<sup>2</sup>  
Helen Parkes<sup>2</sup>  
Jana Žel<sup>3</sup>  
Mojca Milavec<sup>3</sup>  
Heinz Schimmel<sup>4</sup>  
Wolfgang Unger<sup>5</sup>  
Müslüm Akgöz<sup>6</sup>  
Timothy McHugh<sup>7</sup>  
Viktorija Tomic<sup>8</sup>  
Hans-Peter Grunert<sup>9</sup>  
Heinz Zeichhardt<sup>10,11</sup>

- 1 Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Berlin, Germany
- 2 LGC Limited, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, United Kingdom
- 3 National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia
- 4 European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel, Belgium
- 5 Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin, Germany
- 6 Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Arastırma Kurumu – Ulusal Metroloji Enstitüsü TUBITAK ÜME, Gebze/Kocaeli, Turkey
- 7 University College London (UCL), London, United Kingdom

- 8 University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik, Golnik, Slovenia
- 9 Gesellschaft für Biotechnologische Diagnostik (GBD) mbH, Berlin, Germany
- 10 Charité – University Medicine Berlin, Campus Benjamin Franklin, Institute of Virology, Berlin, Germany
- 11 INSTAND e.V., Society for Promoting Quality Assurance in Medical Laboratories e.V., Düsseldorf, Germany

## Introduction

The aim of the study presented in this contribution is to give an overview of the presently applied methodologies for nucleic acid tests (NATs) for infectious diseases in clinical and analytical laboratories and to discuss emerging technologies for NATs potentially suited to support rapid and point-of-care (POC) diagnostics. Near patient instruments will directly influence clinical outcomes for patients and allow to manage patients in one consultation rather than require further follow-ups. This can allow treatment of the patient which should be appropriate and timely. The most relevant POC tests for monitoring infectious diseases involve rapid polymerase chain reaction (PCR) based approaches and novel isothermal amplification methods. The development of these nucleic acid based methods has improved the analytical performance, i.e. sensitivity and specificity, of methods in the area of infectious diseases. These methods have the potential to complement microbiological methods for pathogen detection, which are time consuming and may lack sensitivity.

Important for POC applications are low costs and an acceptable turnaround time [1], [2], [3]. The turnaround time is correlated to the term “rapid diagnostics”, which has been subject to dramatic changes with the availability of PCR and isothermal nucleic amplification technologies. Whereas MRSA detection based on chromogenic agar technology typically requires 2 days to 3 days, application of PCR allows the reduction of the time to obtain the result in a few hours [1], [2]. The transport time from sample collection to the laboratory contributes significantly to turn around times in PCR based examination [2], which could be avoided using POC tests. Using isothermal nucleic amplification techniques, thermocycling necessary for PCR is avoided and the time to result can be reduced even further to less than 60 min or even to

20 min [3]. Isothermal amplification technology has the potential for NATs integrated in disposable microchips [4], [5], [6], [7] and instrumentation for isothermal amplification and detection of the reaction is simpler compared to PCR. Hence, besides rapid diagnostics in industrial countries, application of POC nucleic acid detection based on isothermal nucleic amplification is of high interest in developing countries, where easy handling shall be taken into account.

## Isothermal nucleic amplification methods

The literature study revealed that a variety of methods for the detection of nucleic acids are developed, which are not based on thermo-cycling PCR (Table 1). Commercially available are instruments and related kits based on branched chain DNA signal amplification (bDNA) [8], loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [9], [10] and recombinase polymerase amplification (RPA) [7].

The bDNA method was first demonstrated to provide reliable results in 1995 [11] by quantitative measurements of HIV-1. Later, the performance of bDNA was evaluated by comparing different NAT methods using the VERSANT HCV RNA Assay and the Siemens System 340 bDNA analyser (Siemens Healthcare Diagnostics) [12], [13]. The LAMP method is used in the real time turbidimeter developed by Eiken Chemical Co., Ltd. (Japan) and applied e.g. for the diagnosis of the avian influenza viruses (H5N1) [14]. Lumora Ltd. (United Kingdom) also implemented the LAMP method in a portable small instrument (PDQ) and a high throughput development system. In contrast to the turbidimetric approach, the amplification of the nucleic acid is monitored by fluorescence measurements, called bioluminescent assay in real-time (BART) [15]. The instruments provided by OptiGene also rely on

**Table 1: Methodologies for the amplification of nucleic acid without temperature cycling**

Abbreviation	Method	Reference
bDNA	Branched chain DNA	[8, 11, 24, 25]
HDA	Helicase-dependent amplification	[26, 27]
LAMP	Loop mediated isothermal amplification	[9, 10, 14, 15, 16, 17, 28]
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification	[29]
NEAR	Nicking enzyme amplification reaction	[30, 31]
RCA	Rolling circle amplification	[27, 28, 32, 33]
RAM	Ramification amplification	[28, 34, 35]
RPA	Recombinase polymerase amplification	[7, 23, 27]
SDA	Strand displacement amplification	[27, 28, 36]

the LAMP methodology and isothermal master mix kits (licensed for LAMP by Eiken Chemical Company) are provided. The recombinase polymerase amplification (RPA) method [7] is used by TwistDx, Ltd (United Kingdom) in their Twista® portable real-time fluorometer and reagent kits are provided for food safety.

The development of improved variants for LAMP and RPA is still in progress. Instead of using displacement primers “Stem primers” are used for LAMP [16] and a chemical heating approach was applied to detect HIV-1 [17]. An advantage of RPA is that no initial heating (e.g. to 95 °C to obtain single stranded DNA) is required and only 37 °C are needed compared to 65 °C for LAMP; this was exploited in a microfluidic lab-on-a-foil device [18]. Furthermore, an active field of research of particular interest for rapid and POC diagnostics is the miniaturisation of nucleic acid amplification systems [19] including the adaption of NATs in microfluidic chips [20].

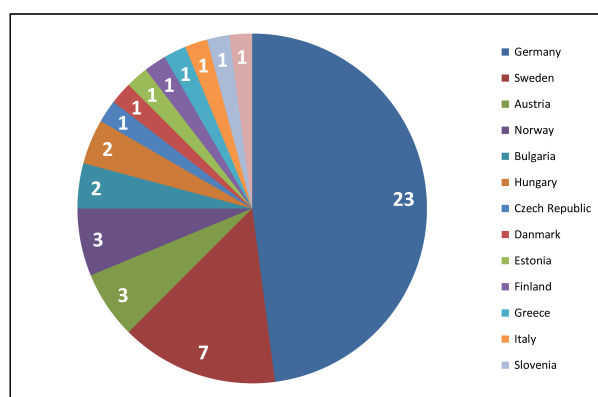
## Analysis of questionnaires

### Concept of the survey

Two questionnaires (see Attachment 1 and Attachment 2) were created comprising manufacturer specific or end-user specific inquiries. In addition, questions for both, companies and analytical laboratories were included in each of the questionnaires. The end-user specific survey was distributed by INSTAND to 1,000 analytical laboratories in Germany regularly participating in ring trials for external quality assessment addressing detection of infectious pathogens by NATs. In addition, INSTAND contacted 336 laboratories from other European and Non-European countries. These laboratories perform infectious disease diagnostics in the fields of virology, bacteriology, mycobacteriology, parasitology and mycology. Many of these laboratories offer diagnostic services in several of the above fields.

We received replies from 48 laboratories in 14 European countries. All except 2 laboratories offer analytical test

in infectious disease medicine in several fields. Three quarters of the laboratories having replied perform more than 1,000 NAT based analyses per month. The numbers of laboratories from the respective countries that participated in the survey are shown in Figure 1. Most participants came from Germany and Scandinavian countries, but we received also answers from Baltic and Eastern European countries. In total, 36 manufacturers were contacted, of which 12 responded. Only 8 forms returned could be included in the analysis, since 4 manufacturers focus on the development of new instrumentation or kits and are not directly in contact with analytical laboratories. The results of the survey, summarised in Tables 2, 3, 4 and 5 are presented in the following paragraphs. In these tables, the most frequent answers are marked in grey.



**Figure 1: Number of participating analytical laboratories from different countries. In total, 48 questionnaires were included in the analysis.**

### Reply from manufacturers

The answers for manufacturer specific questions are summarised in Table 2. The majority of manufacturers offer both, instrumentation and specific kits (Table 2, row 1). About a quarter of the answers are from companies producing instrumentation only and few firms (12%) focus on the development of kits for nucleic acid

**Table 2: Results of questionnaire for manufacturer specific questions indicating the product spectrum of manufacturers, characteristics of instrumentation and number of kits provided**

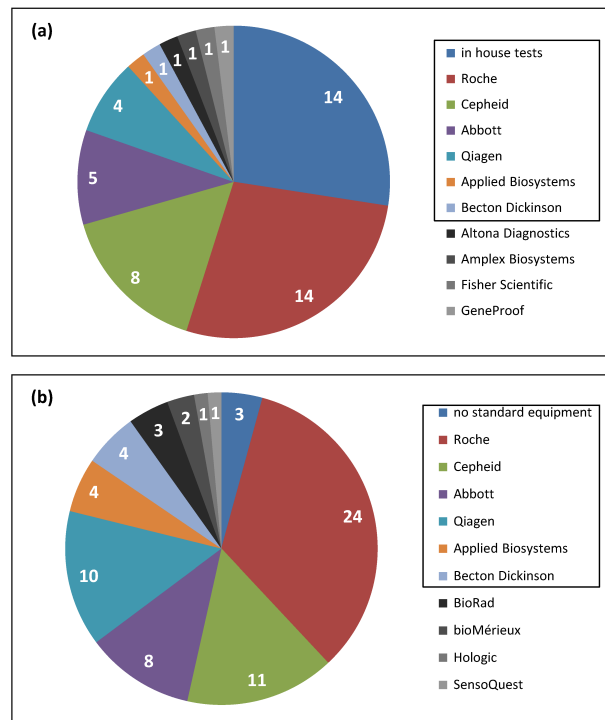
1	Supply of			
	instrumentation	test kits	instrumentation and test kits	
	25%	12%	63%	
2	Number of nucleic acid tests provided (for CMV, HIV, HBV, HCV)			
	< 100 / month	100 / month – 1000 / month	> 1000 / month	
	0%	11%	89%	
3	Use of microsystem technology for liquid handling			
	yes	no		
	38%	50%		
4	Total volume used in amplification chamber / cuvette			
	< 10 µL	10 µL – 20 µL	20 µL – 50 µL	> 50 µL
	0%	38%	38%	13%
5	Time for nucleic acid amplification			
	< 5 min	5 min – 25 min	> 25 min	
	0%	0%	88%	

amplification. With respect to the number of kits supplied (Table 2, row 2) for the detection of human cytomegalovirus (CMV), human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B and C viruses (HBV/HCV) most of the manufacturers (89%) provide more the 1,000 tests per month and the remaining companies (11%) supply 100 to 1,000 tests per month.

Half of the fluid handling systems are based on conventional techniques, whereas 38% of the companies claim that they apply microsystem technology (Table 2, row 3). Interpretation of these answers is difficult since the term “microsystem technology”, i.e. application of ultra precision milling or lithography for production of embossing tools of injection molds yielding surface roughness in the 10 nm region, was not defined in the questionnaire. More significant is the volume of the cuvette or chamber used for the amplification since less material is required and shorter amplification times are expected for smaller volumes, in particular if PCR is used. For cuvette volumes between 10 µL to 20 µL and 20 µL to 50 µL the same numbers (38%) are given and in few cases (13%) volumes above 50 µL are required (Table 2, row 4). However, in the context of nucleic acid amplification, it follows from the answers concerning the amplification time that no substantial reduction is reached, all responses state times above 25 min (Table 2, row 5). Hence, the contribution of amplification times to the turnaround time cannot be neglected and its reduction is highly desirable.

### Current status of NATs derived from manufacturers’ and end-user responses

The market shares of kits and instruments according to the answers of end-users are depicted in Figure 2. According to Figure 2a the amplification is based on in house tests (blue colour, 14 laboratories) and to an equal amount kits provided by Roche (red, 14 nominations).



**Figure 2: Kits (a) and instrumentation (b) used for nucleic acid amplification tests based on the response of analytical laboratories**

Other suppliers were quoted less frequently. For each vendor, the same colour was chosen in Figure 2a and 2b to visualise the correlation between kits applied for nucleic acid amplification tests and instrumentation. In Figure 2b, equipment for nucleic acid amplification as well as apparatuses for DNA/RNA extraction and purification is accounted for. It follows from Figure 2b that – besides supply of kits – Roche (red, 24 laboratories) is also the market leader for equipment. The use of “no standard equipment” is accordingly interpreted as “in house tests” and indicated in blue. Other companies providing kits and in-

**Table 3: Response of end-users giving an overview on the current status of preparation and measurement procedures and wishes regarding sensitivity and costs of NATs**

1	Amplification method			
	temperature cycling (PCR) 98%	isothermal amplification 8%	branched DNA amplification 0%	
2	Target bacteria / viruses			
	<i>M. tuberculosis</i> 27%	MRSA 71%	SARS-CoV 6%	
	CMV 40%	Adenovirus 35%	Influenza A / B 65%	
	HIV 48%	EBV 40%	HBV / HCV 60%	
3	Other target bacteria / viruses not explicitly specified in the questionnaire			
	<i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) 44%	Norovirus 27%	HSV-1 / HSV-2 27%	
	Varicella zoster virus (VZV, HHV-3) 23%	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG) 23%	<i>Mycoplasma genitalium</i> 17%	
4	Type of sample			
	blood / plasma 60%	swab 83%	bioptic tissue 38%	urine 44%
	BAL 25%	faeces 33%	CSF 21%	sputum 13%
5	Mainly used workflow for sample preparation and nucleic acid amplification			
	manual preparation 33%	complete tests, automated preparation and amplification in one / different instruments 63%		complete tests (cartridge) 21%
6	Turn around time for pathogen detection			
	< 60min 2%	1h - 2h 23%	> 2h 77%	
7	Requested limit of detection or analytical sensitivity in pure control samples			
	< 10 copies mL <sup>-1</sup> 29%	10 copies mL <sup>-1</sup> - 50 copies mL <sup>-1</sup> 26%	50 copies mL <sup>-1</sup> - 100 copies mL <sup>-1</sup> 31%	100 copies mL <sup>-1</sup> - 500 copies mL <sup>-1</sup> 14%
8	Reasonable costs per test for selected targets			
	< 1€ 17%	1€ - 4€ 49%	4€ - 6€ 34%	> 6€ 0%

strumentation are Cepheid (8/11), Abbott (5/8), Qiagen (4/10), Applied Biosystems (1/4) and Becton Dickinson (1/4). The other companies referred to as either manufacturer of kits (Altona Diagnostics, Amplex Biosystems, Fisher Scientific, GeneProof) or manufacturer of instruments (BioRad, bioMérieux, Hologic, SensoQuest) are marked in different grey values.

In Table 3 and Table 4 the answers of the end-users (Table 3) and the manufacturers' responses (Table 4) with respect to technologies applied for nucleic acid amplification, pathogens, sample type, workflow, turn-around time, sensitivity and price are listed.

PCR is the leading technology applied by almost all end-users (98%) and offered by most companies (75%). Isothermal amplification of nucleic acid is used in 8% of the analytical laboratories and 25% of the companies produce corresponding instruments and/or kits. None of the participants, neither end-users nor manufacturers indicated

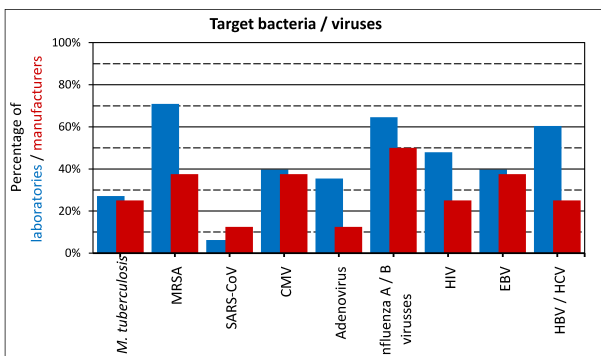
the application of branched DNA methodology. Microarray hybridisation was also listed (Table 4, row 1), but it is less relevant in the context of analysis of pathogens due to low potential for quantification.

In Figure 3, we summarise responses of analytical laboratories (blue bars) with respect to the target bacteria and viruses, which were explicitly listed in the questionnaire as multiple choice. The red bars in Figure 3 indicate the answers given by the manufacturers concerning the supply of corresponding kits. The end-users (Table 3, row 2) reported that in more than 50% of the laboratories methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), influenza A and B viruses and hepatitis B and C viruses (HBV/HCV) are diagnosed. *M. tuberculosis* (27%), human cytomegalovirus (CMV) (40%), adenovirus (35%), human immunodeficiency virus (HIV) (48%) and Epstein-Barr virus (EBV) (40%) are also frequently analysed. On the other hand, only few laboratories (6%) provide molecular

**Table 4: Response of manufacturers concerning the current status of preparation, measurement procedures and costs of NATs**

Amplification method																			
1	<table border="0"> <tr> <td>temperature cycling (PCR)</td> <td>isothermal amplification</td> <td>branched DNA amplification</td> <td>microarray hybridisation</td> </tr> <tr> <td>75%</td> <td>25%</td> <td>0%</td> <td>13%</td> </tr> </table>	temperature cycling (PCR)	isothermal amplification	branched DNA amplification	microarray hybridisation	75%	25%	0%	13%										
temperature cycling (PCR)	isothermal amplification	branched DNA amplification	microarray hybridisation																
75%	25%	0%	13%																
Target bacteria / viruses																			
2	<table border="0"> <tr> <td><i>M. tuberculosis</i></td> <td>MRSA</td> <td>SARS-CoV</td> </tr> <tr> <td>25%</td> <td>38%</td> <td>13%</td> </tr> <tr> <td>CMV</td> <td>Adenovirus</td> <td>Influenza A / B</td> </tr> <tr> <td>38%</td> <td>13%</td> <td>50%</td> </tr> <tr> <td>HIV</td> <td>EBV</td> <td>HBV / HCV</td> </tr> <tr> <td>25%</td> <td>38%</td> <td>25%</td> </tr> </table>	<i>M. tuberculosis</i>	MRSA	SARS-CoV	25%	38%	13%	CMV	Adenovirus	Influenza A / B	38%	13%	50%	HIV	EBV	HBV / HCV	25%	38%	25%
<i>M. tuberculosis</i>	MRSA	SARS-CoV																	
25%	38%	13%																	
CMV	Adenovirus	Influenza A / B																	
38%	13%	50%																	
HIV	EBV	HBV / HCV																	
25%	38%	25%																	
Type of sample																			
3	<table border="0"> <tr> <td>blood / plasma</td> <td>swab</td> <td>bioptic tissue</td> <td>urine</td> </tr> <tr> <td>36%</td> <td>46%</td> <td>22%</td> <td>13%</td> </tr> <tr> <td>BAL</td> <td>faeces</td> <td>CSF</td> <td>sputum</td> </tr> <tr> <td>13%</td> <td>50%</td> <td>13%</td> <td>13%</td> </tr> </table>	blood / plasma	swab	bioptic tissue	urine	36%	46%	22%	13%	BAL	faeces	CSF	sputum	13%	50%	13%	13%		
blood / plasma	swab	bioptic tissue	urine																
36%	46%	22%	13%																
BAL	faeces	CSF	sputum																
13%	50%	13%	13%																
Workflow required for NATs																			
4	<table border="0"> <tr> <td>manual preparation</td> <td>complete tests, automated preparation and amplification in one / different instruments</td> <td>complete tests (cartridge)</td> </tr> <tr> <td>63%</td> <td>25%</td> <td>13%</td> </tr> </table>	manual preparation	complete tests, automated preparation and amplification in one / different instruments	complete tests (cartridge)	63%	25%	13%												
manual preparation	complete tests, automated preparation and amplification in one / different instruments	complete tests (cartridge)																	
63%	25%	13%																	
Turn around time for pathogen detection																			
5	<table border="0"> <tr> <td>&lt; 60min</td> <td>1h - 2h</td> <td>&gt; 2h</td> </tr> <tr> <td>0%</td> <td>38%</td> <td>38%</td> </tr> </table>	< 60min	1h - 2h	> 2h	0%	38%	38%												
< 60min	1h - 2h	> 2h																	
0%	38%	38%																	
Detection limit or analytical sensitivity in pure samples																			
6	<table border="0"> <tr> <td>&lt; 10 copies mL<sup>-1</sup></td> <td>10 copies mL<sup>-1</sup> - 50 copies mL<sup>-1</sup></td> <td>50 copies mL<sup>-1</sup> - 100 copies mL<sup>-1</sup></td> <td>100 copies mL<sup>-1</sup> - 500 copies mL<sup>-1</sup></td> </tr> <tr> <td>20%</td> <td>50%</td> <td>10%</td> <td>20%</td> </tr> </table>	< 10 copies mL <sup>-1</sup>	10 copies mL <sup>-1</sup> - 50 copies mL <sup>-1</sup>	50 copies mL <sup>-1</sup> - 100 copies mL <sup>-1</sup>	100 copies mL <sup>-1</sup> - 500 copies mL <sup>-1</sup>	20%	50%	10%	20%										
< 10 copies mL <sup>-1</sup>	10 copies mL <sup>-1</sup> - 50 copies mL <sup>-1</sup>	50 copies mL <sup>-1</sup> - 100 copies mL <sup>-1</sup>	100 copies mL <sup>-1</sup> - 500 copies mL <sup>-1</sup>																
20%	50%	10%	20%																
Price per test for selected targets																			
7	<table border="0"> <tr> <td>&lt; 1€</td> <td>1€ -4€</td> <td>4€ - 8€</td> <td>&gt; 8€</td> </tr> <tr> <td>21%</td> <td>21%</td> <td>0%</td> <td>57%</td> </tr> </table>	< 1€	1€ -4€	4€ - 8€	> 8€	21%	21%	0%	57%										
< 1€	1€ -4€	4€ - 8€	> 8€																
21%	21%	0%	57%																

diagnostics for SARS-associated coronavirus (SARS-CoV) causative for severe acute respiratory syndrome.



**Figure 3: Relative number of laboratories which perform NATs for the listed pathogens (blue bars). Percentage of manufacturers providing corresponding kits (red bars). The data are taken from Tables 3 and 4. MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; SARS-CoV: severe acute respiratory syndrome associated coronavirus; CMV: human cytomegalovirus; HIV: human immunodeficiency virus; EBV: Epstein-Barr virus; HBV/HCV: hepatitis B and C viruses.**

For all these NATs commercial kits are available and provided by some of the manufacturers. In particular,

according to Table 4, row 2, kits for *M. tuberculosis* are offered by 25% of the responding companies, 38% supply kits for CMV, 50% for influenza A and B viruses and 38% for EBV. A smaller fraction of the companies provide kits for MRSA (38%), SARS-CoV (13%), adenovirus (13%), HIV (25%) and HBV/HCV (25%).

*M. tuberculosis*, tested in 27% of the analytical laboratories (Table 3, row 2), is reported to reveal a much higher notification rate in WHO Member States in the east than in the west [21]. This tuberculosis report 2014 of the WHO indicates a worldwide increase of 3.5% for the multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in the year 2013. In some countries, however, i.e. the Russian Federation, Uzbekistan, Republic of Moldova, Kazakhstan, Kyrgyzstan and Belarus, the incidence of new cases ranged between 19%–35% in the years 2011–2013. Particularly distressing is the high percentage of extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) and the continuing decline of the success rate of medical treatment of tuberculosis.

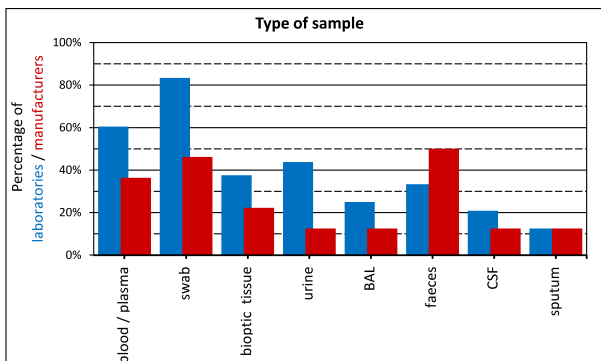
The relative use of diagnostic tests for the detection of pathogens by the replying laboratories as well as the supply of commercial diagnostic tests by the responding manufacturers seem to reflect the diagnostics needs of



the corresponding methods for public health in the countries from where replies were received (part of northern, eastern and mid Europe). This correlation may be true for MRSA, as well as HBV/HCV and influenza A and B viruses. Interestingly, replying laboratories and manufactures hang on to diagnostic tests for the detection of SARS-CoV, although there have not been any known cases of SARS-CoV infection reported anywhere in the world since 2004 (<http://www.cdc.gov/coronavirus/about/index.html>).

Apart from the pathogens explicitly listed in the questionnaire, the participants were also asked to note other important target bacteria and viruses. The most frequent answers are summarised in row 3 of Table 3. Besides *Chlamydia trachomatis*, detected in 44% of the laboratories, norovirus (27%), HSV-1/HSV-2 (27%), varicella zoster virus (23%), *Neisseria gonorrhoeae* (23%) and *Mycoplasma genitalium* (17%) are analysed.

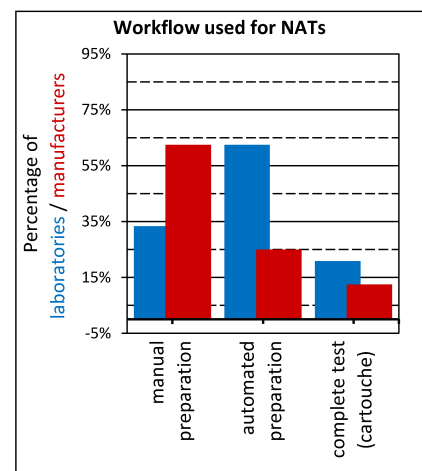
The distribution of samples for NATs is depicted in Figure 4. It follows from the response of the end-users (Figure 4, blue bars; Table 3, row 4) that most often swab (83%) and blood/blood plasma (60%) are used. Besides these samples, urine (44%), tissue from biopsies (38%), faeces (33%), bronchoalveolar lavage (BAL) (25%), cerebrospinal fluid (CSF) (21%) and sputum (13%) serve for nucleic acid tests. The percentage of manufactures providing kits for these materials (Table 4, row 3) is shown as red bars in Figure 4. Most nominations concern faeces (50%), swab (46%) and blood/blood plasma (36%), followed by bioptic tissue (22%). These samples are among the five materials most frequently reported by the analytical laboratories.



**Figure 4:** Percentage of laboratories (blue bars) using the listed specimen and relative number of manufactures (red bars) providing corresponding test kits. BAL: bronchoalveolar lavage; CSF: cerebrospinal fluid.

In the questionnaire, we offered three options for the workflow of nucleic acid tests. The manual preparation requires DNA/RNA extraction, purification and pipetting of reagents, complete tests include automated preparation and amplification in one or different instruments and the third selection is for complete, cartridge or cassette based tests which contain all reagents needed and only the sample has to be fed in. As presented in Figure 5 and Table 3, row 5, in analytical laboratories, manual preparation is done in 33% of cases. At present, tests

which include automated preparation (63%) of samples are being preferred. Fully automated tests, based on cartridge or cassette systems are applied in 21% of the laboratories. The sum exceeds 100% since in some laboratories various modalities are being used. The most common indication of manufacturers (Table 4, row 4) concerns the manual preparation (63%), automated preparation is reported with 25% and cartridge based workflows in 13% of cases. Compared to the end-users, the order is reversed with respect to manual and automated preparation, possibly because most of the laboratories have a high throughput which requires the highest possible degree of automation. On the other hand, both groups are ranking complete, cartridge based tests on the third rank, the relative market share is estimated to be in the range of 10% to 20%.



**Figure 5:** Comparison of different workflows applied for NATs based on responses of analytical laboratories (blue bars) and manufactures (red bars)

The turnaround time for pathogen detection using NATs is generally above 2 h (77%) according to the analytical laboratories (Table 3, row 6), 23% and 2% claimed turnaround times between 1 h to 2 h or even below 60 min, respectively. The analytical sensitivity or limit of detection in pure samples or calibrators requested by most of the end-users for reliable pathogen detection is about the same for  $<10$  copies  $\text{mL}^{-1}$  (29%), 10 copies  $\text{mL}^{-1}$  to 50 copies  $\text{mL}^{-1}$  (26%) and 50 copies  $\text{mL}^{-1}$  to 100 copies  $\text{mL}^{-1}$  (31%) (Table 3, row 7). The broad range given by the end-users are probably due to the fact that pathogen and sample specific sensitivity and limit of detections are required for reliable diagnostics. The manufactures' responses to these questions are in close concordance with the end-users requirements and show a trend to lower turnaround times (38% quote the range 1 h to 2 h) (Table 4, row 5) and to higher sensitivity (50% state a sensitivity of 10 copies  $\text{mL}^{-1}$  to 50 copies  $\text{mL}^{-1}$ ) (Table 4, row 6). However, the costs per tests requested by the analytical laboratories are lower compared to the manufactures' announcements. The range up to 4 € is mentioned by 66% of the end-users (Table 3, row 8) and 42% of the companies (Table 4, row 7). The upper limit stated by the laboratories is 6 €, but the manufactures indicate

that the costs for several kits (57%) exceed 8 €. Again, the broad spread in acceptable costs and cost-covering prices indicate that for different pathogens and samples the complexity of test kits and the corresponding developments are crucial.

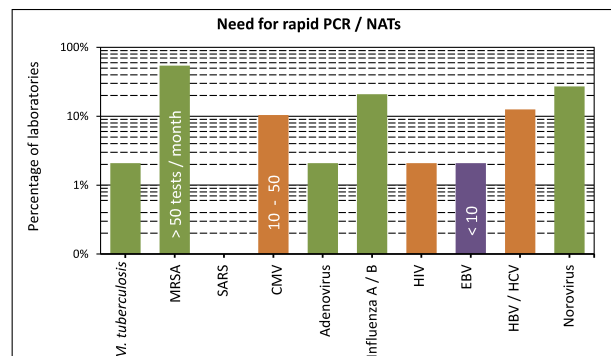
## Need for rapid NATs in clinical diagnostics – feedback from end-users

An overview on the response to the questions specific for analytical laboratories is given in Table 5. As already mentioned when discussing the high percentage of laboratories using automated preparation and cartridge based tests (see Table 3, row 5: sum 84%), most of the participating analytical laboratories (75%) investigate more than 1,000 samples with respect to infectious pathogens (Table 5, row 1). For high throughput applications automation is necessary to provide analyses in short times at reasonable costs. About 21% of the users perform 100 tests per month to 1,000 tests per month. The number of analyses is less than 100 tests per month in 4% of the analytical laboratories. The relative share of NATs at all analyses covers the complete range from <25% to >75% with the most common indication for <25%, given by 54% of the laboratories (Table 5, row 2). The distribution reveals a second (relative) maximum, 23% of the laboratories perform in more than 75% of the analyses nucleic acid tests. This survey result demonstrates the increasing importance of nucleic acid tests, used in more than half of the laboratories (54%) in addition to other diagnostic methods and applied as leading procedure in specialised facilities (23%).

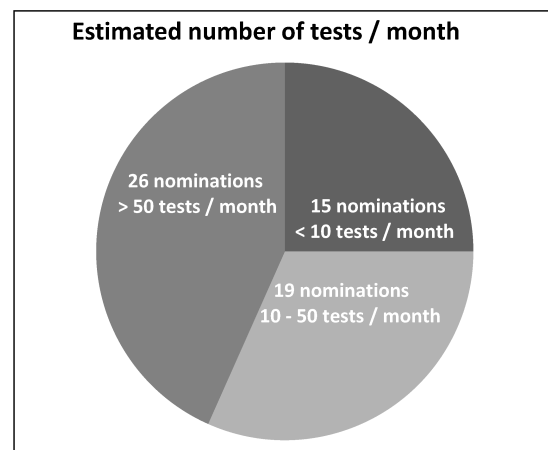
About 40% (Table 5, row 3) of the end-users report the application of “rapid” PCR/NATs when answering the corresponding question of the survey sheet. However, this statement is not supported by the answers concerning the turnaround times, since only 2% reach times below 60 min (Table 3, row 6). These 2% of the laboratories seem to better represent the current situation than the 38% given in Table 5, row 3 with respect to “rapid” diagnostic. We interpret these discrepancies as non-conform definitions and suggest the use of the term “rapid” PCR/NAT as indicative for turnaround times less than 30 min to better account for the present state of the art of NATs.

The bacteria and viruses for which the end-users declare an urgent need of rapid nucleic acid tests are shown in Figure 6 (Table 5, row 4). The percentage of laboratories requesting a rapid test is plotted on a logarithmic scale to account for the large variations. Apart from SARS, for all pathogens explicitly listed in the questionnaire there seems to be an interest for significantly shorter turnaround times, specified to be <15 min by the majority of users (Table 5, row 5). However, the number of laboratories requesting such rapid NATs ranges from only 2% for *M. tuberculosis*, adenovirus, HIV and EBV to 54% for MRSA. Besides MRSA, a large proportion of the answers indicate the demand for rapid tests with respect to norovirus (27%) and influenza A and B viruses (21%).

About 10% identify the need for rapid CMV and HBV/HCV nucleic acid tests. In Figure 6, we include the expected number of rapid tests (Table 5, row 6) per analytical laboratory – based on the most frequent statements – as colour code, violet represents <10 tests per month, light-brown indicates 10 tests per month to 50 tests per month and green stands for >50 tests per month. Alternatively, instead of using the most frequent answers for each bacterium or virus, we summarized the expected numbers of tests stated by each laboratories for all pathogens which are analysed. From Figure 7 one can conclude that most of the end-users, who intend to apply rapid NATs expect more than 50 tests per month. Please note that the total number of nominations (60) exceeds the number of participating laboratories (48), since generally more pathogens are analysed in each analytical laboratory. Compared to the typical throughput of >1,000 analyses per month the relative contribution of rapid test would be in the order of 5%.



**Figure 6: Percentage of laboratories requesting rapid nucleic acid tests for the listed pathogens. The colour indicates the expected number of tests per month in one analytical laboratory for the respective bacterium or virus.**



**Figure 7: Number of predicted rapid nucleic acid tests per month in each laboratory for specific target pathogens**

The question whether qualitative tests or quantitative tests are needed yielded different opinions. According to Table 5, row 7, most of the users (44%) prefer to choose between a qualitative or quantitative tests dependent on the pathogen to be detected, 31% would be satisfied with a qualitative result.



**Table 5: Result of questionnaire for end-user specific questions giving the number of NATs per month and indicating the need for rapid NATs for infectious diseases**

1	Number of all analyses (including non-NATs) for diagnostics of infectious diseases			
	< 100 / month 4%	100 / month - 1000 / month 21%	> 1000 / month 75%	
2	Relative share of NATs with respect to all analyses			
	< 25% 54%	25% - 50% 8%	50% - 75% 10%	> 75% 23%
3	Use of rapid PCR / NAT			
	yes 38%	no 60%		
4	For which target Target bacteria / viruses is an urgent need for rapid PCR / NATs ?			
	<i>M. tuberculosis</i> 2%	MRSA 54%	SARS-CoV 0%	
	CMV 10%	Adenovirus 2%	Influenza A / B 21%	
	HIV 2%	EBV 2%	HBV / HCV 13%	Norovirus 27%
5	Requested turn around time for selected pathogens			
	< 10min 16%	< 15min 72%	< 60min 12%	
6	Estimated number of tests applying rapid NATs			
	<i>M. tuberculosis</i> > 50 tests / month	MRSA > 50 tests / month	SARS-CoV n.a.	
	CMV 10 - 50 tests / month	Adenovirus > 50 tests / month	Influenza A / B > 50 tests / month	
	HIV 10 - 50 tests / month	EBV < 10 tests / month	HBV / HCV 10 - 50 tests / month	Norovirus > 50 tests / month
7	Are quantitative rapid NATs required ?			
	qualitative tests sufficient 31%	quantitative tests required 2%	dependent on pathogen 44%	
8	Do you intend to purchase equipment for rapid NATs?			
	no 50%	next year 15%	next three years 8%	later 19%

The answers concerning the purchase of equipment (Table 5, row 8) and the establishment of rapid nucleic acid analyses in analytical laboratories (50% do not intend to introduce rapid tests and 19% responded with “later than the next three years”) reflect that the end-users are currently waiting, possibly because the technologies for rapid NATs are still being developed and improved by corresponding research activities.

## Summary and conclusion

The results of this survey refer to the answers of 48 analytical laboratories, most located in Germany. About a quarter of the responses were from Scandinavian countries. With respect to the current state of the art of NATs reasonable consensus was observed except for the costs between end-users and manufacturers, albeit only 8 companies responded.

The pathogens most frequently analysed in more than half of the laboratories are MRSA, influenza A and B viruses and HBV/HCV, followed by HIV, EBV, CMV and adenovirus detected in about 40% of the laboratories. *M. tuberculosis* was mentioned as target by 27% of the end-users. Apart from these pathogens, which were explicitly listed in the questionnaire as multiple choice option, *Chlamydia trachomatis*, norovirus and *Neisseria gonorrhoeae* are also frequently (in 20% to 40% of the laboratories) analysed.

The majority of the participating analytical laboratories perform more than 1000 analyses per month to detect infectious diseases. Hence, a high degree of automation is required to achieve high sample throughput applying complete conventional or cartridge based tests. The relative share of in-house tests for nucleic acid extraction/purification and amplification is about 27% while 73% utilize kits provided by various manufacturers. In this context, internal and external quality assurance is

highly relevant to ensure that results from different laboratories are in agreement within defined limits of equivalence, regulated for selected pathogens in the corresponding guidelines [22] of the German medical association.

The questionnaire revealed a non-consistent use of the term “rapid” analysis, due to the dramatic reduction of turnaround times from several days required by cultures to typically 2 h – 4 h after the introduction of PCR. It follows from the questionnaire that the current state of the art for the turnaround time of PCR based nucleic acid tests is still >2 h. The next step towards rapid point of care tests is expected by the implementation of complete tests involving isothermal methodology for NATs. Such a setting might allow turnaround times below 30 min and possibly between 10 min – 15 min. Hence we suggest the definition of a rapid NAT as analysis with turnaround times <30 min. For rapid NATs complete cartridge based tests with integrated microfluidic chips are the most promising approach. Of particular interest is the RPA method [7], [23], because the amplification can be carried out at about 37 °C.

The majority of the laboratories (75%) points out the need for rapid nucleic tests for certain pathogens. Of particular interest is MRSA for more than 50% of the end-users, 27% and 21% demand for rapid NATs to detect Norovirus and influenza A/B, respectively (Table 5, row 4). According to about 10% of the laboratories, further pathogens for which rapid tests are needed are HBV, HCV and CMV. The desired turnaround time is <15 min (Table 5, row 5) for rapid nucleic acid tests of these disease-causing agents. Slightly more laboratories (44% compared to 31%, Table 5, row 7) indicated that – dependent on the pathogen – quantitative test would be preferable to qualitative analyses. The results of the questionnaire allow the estimation that the relative share of rapid NATs is expected to be around 5% compared to the total number of analysis per month. It should be noted that the bacteria and viruses for which rapid tests are requested are being frequently examined at present in the participating laboratories utilising PCR.

Besides conventional nucleic amplification technique by PCR, only few laboratories (8%) apply isothermal amplification. This demonstrates that research and development is still necessary to overcome the drawbacks of isothermal methodologies for nucleic acid amplification. In particular, the possibility to obtain quantitative results would certainly accelerate the application of isothermal tests in routine laboratories and for point of care applications. In addition, integration of isothermal tests in disposable cartridges is essential to improve handling, reproducibility and to reduce the turnaround time to the requested range of 15 min. Because of the ongoing development most of the end-users (85%) are still waiting before purchasing corresponding equipment to utilise rapid (isothermal) nucleic analysis. However, we conclude from the questionnaire that for certain applications rapid NATs are needed to improve the measurement support for diagnostic and therapeutic decisions.

## Notes

### Competing interests

Heinz Zeichhardt and Hans-Peter Grunert are shareholders of GBD (Gesellschaft fuer Biotechnologische Diagnostik) mbH, Berlin (Germany), which is a manufacturer of materials for external quality control. The other authors declare that they have no competing interests.

### Acknowledgement

The questionnaire was disseminated among analytical laboratories participating in round robin tests for nucleic acid tests organised by INSTAND e.V. (Society for the Promoting Quality Assurance in Medical Laboratories, Düsseldorf, Germany) for external quality assurance. We gratefully acknowledge the support of INSTAND e.V., in particular Michael Spannagl, chairman of INSTAND and Ingo Schellenberg, Vice-Chairman of INSTAND. The work was funded by the European Union within the European Metrology Research Programme (EMRP) HLT-08, 2011 ‘INFECT-MET’.

## Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-6/lab000016.shtml>

1. lab000016\_Attach1\_Questionnaire\_Manufacturers.pdf (149 KB)  
Questionnaire for manufacturers
2. lab000016\_Attach2\_Questionnaire\_End-users.pdf (150 KB)  
Questionnaire for end-users

## References

1. Jeyaratnam D, Whitty CJ, Phillips K, Liu D, Orezzi C, Ajoku U, French GL. Impact of rapid screening tests on acquisition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: cluster randomised crossover trial. *BMJ*. 2008 Apr;336(7650):927-30. DOI: 10.1136/bmj.39525.579063.BE
2. Polisenia J, Chen S, Cimon K, McGill S, Forward K, Gardam M. Clinical effectiveness of rapid tests for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized patients: a systematic review. *BMC Infect Dis*. 2011;11:336. DOI: 10.1186/1471-2334-11-336
3. Niemz A, Ferguson TM, Boyle DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol*. 2011 May;29(5):240-50. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.01.007
4. Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip*. 2012 Jul;12(14):2469-86. DOI: 10.1039/c2lc40100b
5. Asiello PJ, Baeumner AJ. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab Chip*. 2011 Apr;11(8):1420-30. DOI: 10.1039/c0lc00666a

6. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Mar;27(3):224-43. DOI: 10.1080/15257770701845204
7. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006 Jul;4(7):e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
8. Tsongalis GJ. Branched DNA technology in molecular diagnostics. *Am J Clin Pathol*. 2006 Sep;126(3):448-53. DOI: 10.1309/90BU6KDXANFLN4RJ
9. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
10. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Nov;289(1):150-4. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5921
11. Pacht C, Todd JA, Kern DG, Sheridan PJ, Fong SJ, Stempien M, Hoo B, Besemer D, Yeghiazarian T, Irvine B, et al. Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995 Apr 15;8(5):446-54. DOI: 10.1097/00042560-199504120-00003
12. Madej RM, Davis J, Holden MJ, Kwang S, Labourier E, Schneider GJ. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. *J Mol Diagn*. 2010 Mar;12(2):133-43. DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090067
13. Highbarger HC, Hu Z, Kottlilil S, Metcalf JA, Polis MA, Vasudevachari MB, Lane HC, Dewar RL. Comparison of the Abbott 7000 and Bayer 340 systems for measurement of hepatitis C virus load. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):2808-12. DOI: 10.1128/JCM.00202-07
14. Dinh DT, Le MT, Vuong CD, Hasebe F, Morita K. An Updated Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of H5N1 Avian Influenza Viruses. *Trop Med Health*. 2011 Mar;39(1):3-7. DOI: 10.2149/tmh.2010-21
15. Gandelman OA, Church VL, Moore CA, Kiddle G, Carne CA, Parmar S, Jalal H, Tisi LC, Murray JA. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time. *PLoS One*. 2010 Nov 30;5(11):e14155. DOI: 10.1371/journal.pone.0014155
16. Gandelman O, Jackson R, Kiddle G, Tisi L. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *Int J Mol Sci*. 2011;12(12):9108-24. DOI: 10.3390/ijms12129108
17. Curtis KA, Rudolph DL, Nejad I, Singleton J, Beddoe A, Weigl B, LaBarre P, Owen SM. Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of HIV-1. *PLoS One*. 2012;7(2):e31432. DOI: 10.1371/journal.pone.0031432
18. Lutz S, Weber P, Focke M, Faltin B, Hoffmann J, Müller C, Mark D, Roth G, Munday P, Armes N, Piepenburg O, Zengerle R, von Stetten F. Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). *Lab Chip*. 2010 Apr 7;10(7):887-93. DOI: 10.1039/b921140c
19. Ahmad F, Hashsham SA. Miniaturized nucleic acid amplification systems for rapid and point-of-care diagnostics: a review. *Anal Chim Acta*. 2012 Jul 6;733:1-15. DOI: 10.1016/j.aca.2012.04.031
20. Zhang Y, Ozdemir P. Microfluidic DNA amplification—a review. *Anal Chim Acta*. 2009 Apr 13;638(2):115-25. DOI: 10.1016/j.aca.2009.02.038
21. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. Geneva: WHO; 2014. ISBN 978 92 4 156480 9. Available from: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
22. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl*. 2008;105(7):A341-55. Geändert/ergänzt im *Dtsch Arztebl*. 2013;110(39):A1822.
23. Rohrman BA, Richards-Kortum RR. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. *Lab Chip*. 2012;12(17):3082-8. DOI: 10.1039/c2lc40423k
24. Horn T, Chang CA, Urdea MS. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays. *Nucleic Acids Res*. 1997 Dec;25(23):4842-9. DOI: 10.1093/nar/25.23.4842
25. Anastassopoulou CG, Touloumi G, Katsoulidou A, Hatzitheodorou H, Pappa M, Paraskevis D, Lazanas M, Gargalianos P, Hatzakis A. Comparative evaluation of the QUANTIPLEX HIV-1 RNA 2.0 and 3.0 (bDNA) assays and the AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5 test for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Virol Methods*. 2001 Jan;91(1):67-74. DOI: 10.1016/S0166-0934(00)00245-7
26. Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep*. 2004 Aug;5(8):795-800. DOI: 10.1038/sj.embor.7400200
27. Kim J, Easley CJ. Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications. *Bioanalysis*. 2011 Jan;3(2):227-39. DOI: 10.4155/bio.10.172
28. Zahradnik C. Isothermale Amplifikation – Methoden & Anwendungsbereiche. Report of the Department for Agrobiotechnology, IFA-Tulln of the University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Working group Dr. Kurt Brunner. 2012. Available from: <http://www.biotrac.at/en/knowledge-base/biotrac-documents/IsothermaleAmplifikation.pdf>
29. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991 Mar;350(6313):91-2. DOI: 10.1038/350091a0
30. Luzziotti N, Knappe S, Richter I, Seidel R. Nicking enzyme-based internal labeling of DNA at multiple loci. *Nat Protoc*. 2012 Mar 8;7(4):643-53. DOI: 10.1038/nprot.2012.008
31. Kim E, Kim S, Kim DH, Choi BS, Choi IY, Kim JS. Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. *Genome Res*. 2012 Jul;22(7):1327-33. DOI: 10.1101/gr.138792.112
32. Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):225-32. DOI: 10.1038/898
33. Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M. Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation-rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res*. 2009 Feb;37(3):e19. DOI: 10.1093/nar/gkn1014
34. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih T, Li HB. Ramification amplification: a novel isothermal DNA amplification method. *Mol Diagn*. 2001 Jun;6(2):141-50. DOI: 10.1054/modi.2001.25323
35. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih TC, Li H. Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe. *Gene*. 1998 May 12;211(2):277-85. DOI: 10.1016/S0378-1119(98)00113-9
36. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res*. 1992 Apr;20(7):1691-6.

**Corresponding author:**

Jörg Neukammer  
Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Abbestr.  
2-12, 10587 Berlin, Germany  
joerg.neukammer@ptb.de

**Please cite as**

Neukammer J, Hussels M, Kummrow A, Devonshire A, Foy C, Huggett J, Parkes H, Žel J, Milavec M, Schimmel H, Unger W, Akgöz M, McHugh T, Tomic V, Grunert HP, Zeichhardt H. Survey results on nucleic acid tests of infectious diseases: present status and need for rapid and near-patient diagnostics. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab.* 2014;6:Doc01.  
DOI: 10.3205/lab000016, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000160

**This article is freely available from**

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-6/lab000016.shtml>

**Published:** 2015-02-11

**Copyright**

©2014 Neukammer et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License. See license information at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

# Umfrage zu Nukleinsäureamplifikationstests bei Infektionserkrankungen: Stand und Bedarf für eine schnelle und patientennahe Diagnostik

## Zusammenfassung

Die vorliegende Studie gibt eine Übersicht über derzeit verwendete und in der Entwicklung befindliche Methoden der isothermalen und der schnellen auf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhenden Nukleinsäureamplifikation für die patientennahe Diagnostik.

Um den klinischen Bedarf einer schnellen Diagnostik auf der Grundlage von Verfahren für Nukleinsäureamplifikationstests (NATs) abzuschätzen, wurde eine Umfrage bei Laboratorien, die an INSTAND-Ringversuchen zur externen Qualitätssicherung teilnehmen, durchgeführt. Die Umfrage zu neuen DNA-Amplifikationstechniken, wie die isothermale Nukleinsäureamplifikation, wurde durch Fragen zum aktuellen Stand von NATs ergänzt. Neben den Endanwendern wurden Herstellern spezifische Fragebögen zugesandt.

Die Analyse der Antworten von 48 Laboratorien aus 14 europäischen Ländern zeigt, dass für bestimmte Pathogene eine deutlich geringere Durchlaufzeit erforderlich ist als die für eine auf Temperaturzyklen beruhende Nukleinsäureamplifikation (d.h. PCR) benötigten 2 h oder noch längeren Zeiten. In diesem Zusammenhang wurden am häufigsten Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Norovirus, Influenza-A- und -B-Viren, Cytomegalievirus (CMV) sowie Hepatitis-B-Virus (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV) genannt. Derzeit setzen etwa 8% der Laboratorien, die sich an der Abfrage beteiligten, isothermale DNA-Amplifikationstechniken zum Nachweis von Infektionserregern ein.

**Schlüsselwörter:** Nukleinsäure-Tests, Infektionserkrankungen, Virusnachweis, Bakteriennachweis, isothermale Nukleinsäureamplifikation, Statusbericht, Umfrageergebnisse, NAT, PCR

Jörg Neukammer<sup>1</sup>

Martin Hussels<sup>1</sup>

Andreas Kummrow<sup>1</sup>

Alison Devonshire<sup>2</sup>

Carole Foy<sup>2</sup>

Jim Huggett<sup>2</sup>

Helen Parkes<sup>2</sup>

Jana Žel<sup>3</sup>

Mojca Milavec<sup>3</sup>

Heinz Schimmel<sup>4</sup>

Wolfgang Unger<sup>5</sup>

Müslüm Akgöz<sup>6</sup>

Timothy McHugh<sup>7</sup>

Viktorija Tomic<sup>8</sup>

Hans-Peter Grunert<sup>9</sup>

Heinz Zeichhardt<sup>10,11</sup>

1 Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Berlin, Deutschland

2 LGC Limited, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, Vereinigtes Königreich

3 National Institute of Biology, Ljubljana, Slowenien

4 European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel, Belgien

5 Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin, Deutschland

6 Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Arastırma Kurumu – Ulusal Metroloji Enstitüsü TUBİTAK ÜME, Gebze/Kocaeli, Türkei

7 University College London (UCL), London, Vereinigtes Königreich



- 8 University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik, Golnik, Slowenien
- 9 Gesellschaft für Biotechnologische Diagnostik (GBD) mbH, Berlin, Deutschland
- 10 Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Institut für Virologie, Berlin, Deutschland
- 11 INSTAND e.V., Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V., Düsseldorf, Deutschland

## Einleitung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, eine Übersicht über die derzeit verwendeten Methoden für Nukleinsäureamplifikationstests (NATs) bei Infektionskrankheiten in Klinik- und Analyselaboratorien zu geben und neue Technologien für NATs vorzustellen, die potenziell zur Unterstützung einer schnellen und patientennahen Diagnostik (point-of-care (POC)) geeignet sind. Patienten-nah verwendete Geräte können einen unmittelbaren Einfluss auf die klinische Behandlung der Patienten haben und es ermöglichen, schnelle Entscheidungen über eine Therapie in einer einzigen Untersuchung festzulegen, so dass Nachuntersuchungen wegfallen. Damit kann der Patient angemessen und zeitnah behandelt werden. Die wichtigsten POC-Tests (POCT) zur Überwachung von Infektionserkrankungen umfassen schnelle, auf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhende Verfahren und neue isothermale Nukleinsäureamplifikationsmethoden. Durch die Entwicklung dieser auf einem Nukleinsäurenachweis basierender Verfahren wurde die Leistungsfähigkeit der Analysen, d.h. die Empfindlichkeit und die Spezifität der Methoden auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten, verbessert. Mit diesen Verfahren können die zeitaufwändigen und üblicherweise weniger empfindlichen mikrobiologische Methoden für den Nachweis von Infektionserregern durch die molekularbiologische Detektion der Pathogene ergänzt werden.

Wichtig für POC-Anwendungen sind niedrige Kosten und eine akzeptable Bearbeitungszeit oder Durchlaufzeit [1], [2], [3]. Die Durchlaufzeit hängt zusammen mit dem Begriff „Schnelldiagnostik“, dessen Bedeutung sich wesentlich geändert hat, seitdem es die PCR und isothermale Nukleinsäureamplifikationstechniken gibt. Während der

MRSA-Nachweis, der auf der Verwendung chromogener Nährmedien beruht, normalerweise 2 bis 3 Tage braucht, erhält man mit dem PCR-Test das Ergebnis bereits in wenigen Stunden [1], [2]. Die Transportzeit von der Probenentnahme bis zum Labor trägt dabei erheblich zu den Durchlaufzeiten in PCR-gestützten Untersuchungen [2] bei. Durch die Verwendung von POC-Tests könnte dieser Beitrag vermieden werden. Mit Hilfe von isothermalen Nukleinsäureamplifikationstechniken werden die für die PCR notwendigen Thermozykler vermieden. Die Zeit bis zum Ergebnis kann so auf weniger als 60 Minuten oder sogar auf 20 Minuten verringert werden [3]. Die isothermale Amplifikationstechnik kann potenziell zur Integration von NATs in Einweg-Mikrochips verwendet werden [4], [5], [6], [7], entsprechende Geräte für die isothermale Amplifikation und ihren Nachweis sind im Vergleich zu der PCR-Technik einfacher. Daher ist neben der Schnelldiagnostik in Industrieländern die Anwendung des auf der isothermalen Nukleinsäureamplifikation beruhenden POC-Nukleinsäurenachweises für Entwicklungsländer äußerst interessant, weil speziell dort eine einfache Handhabung wichtig ist.

## Isothermale Nukleinsäureamplifikationsmethoden

Die Literaturstudie zeigte, dass zahlreiche Methoden für den Nachweis von Nukleinsäuren entwickelt werden, die nicht auf der PCR, d.h. der Verwendung von Thermozyklern beruhen (Tabelle 1). Im Handel erhältlich sind Geräte und dazugehörige Test-Kits, die auf der sogenannten branched DNA-Signalamplifikation (bDNA) [8], der Schleifen-vermittelten isothermalen Amplifikation (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [9], [10] und

**Tabelle 1: Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden ohne Verwendung von Temperaturzyklen**

Abkürzung	Methode	Literatur
bDNA	Branched chain DNA	[8, 11, 24, 25]
HDA	Helicase-dependent amplification	[26, 27]
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	[9, 10, 14, 15, 16, 17, 28]
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification	[29]
NEAR	Nicking enzyme amplification reaction	[30, 31]
RCA	Rolling circle amplification	[27, 28, 32, 33]
RAM	Ramification amplification	[28, 34, 35]
RPA	Recombinase polymerase amplification	[7, 23, 27]
SDA	Strand displacement amplification	[27, 28, 36]

der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) [7] beruhen.

Für die bDNA-Methode wurde im Jahre 1995 [11] erstmals durch quantitative Messungen gezeigt, dass ein zuverlässiger HIV-1 Nachweis möglich ist. Später wurde die Leistungsfähigkeit der bDNA-Methode überprüft durch Vergleiche zwischen verschiedenen NAT-Methoden unter Verwendung des VERSANT HCV RNA Assays und des Siemens System 340 bDNA-Analysegerätes (Siemens Healthcare Diagnostics) [12], [13].

Die LAMP-Methode wird in dem von Eiken Chemical Co., Ltd. (Japan) entwickelten Echtzeit-Turbidimeter eingesetzt und dient beispielsweise für den Nachweis des Vogelgrippevirus Influenza A (H5N1)-Virus [14]. Lumora Ltd. (Vereinigtes Königreich) verwendet ebenfalls die LAMP-Methode in einem tragbaren Kleingerät (PDQ) und in einem Entwicklungssystem mit hohem Durchsatz. Im Gegensatz zur turbidimetrischen Methode wird dabei die Nukleinsäureamplifikation mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen überwacht – dem so genannten biolumineszenten Echtzeit-Nachweis (bioluminescent assay in real-time, BART) [15]. Die von OptiGene gelieferten Geräte beruhen ebenfalls auf der LAMP-Methode, und der Hersteller liefert entsprechende Master Mix Kits (lizenzierter für LAMP von Eiken Chemical Company) für die isothermale Verstärkung. Die RPA-Methode [7] wird von TwistDx, Ltd. (Vereinigtes Königreich) in ihrem tragbaren Echtzeit-Fluorometer Twista® verwendet und für die Lebensmittelsicherheit, für die Reagenz-Kits verfügbar sind, eingesetzt.

Die Entwicklungen von verbesserten Varianten für LAMP und RPA dauern noch an. Anstelle von Displacement Primern werden „Stem Primer“ für die LAMP-Methode [16] verwendet. Mit Hilfe von chemischer Energieerzeugung konnte HIV-1 [17] nachgewiesen werden. Ein Vorteil der RPA-Methode ist, dass keine Anfangserwärmung (z.B. auf 95 °C, um DNA-Einzelstränge zu erhalten) nötig ist und nur 37 °C im Gegensatz zu 65 °C bei der LAMP-Methode erforderlich sind. Dieses Verfahren wurde in einem mikrofluidischen Gerät im Westentaschenformat (Lab-on-a-foil) genutzt [18]. Ein weiteres aktives Forschungsfeld, das für die Schnell- und POC-Diagnostik von großem In-

teresse ist, ist die Miniaturisierung der Nukleinsäureamplifikationssysteme [19], die auch die Anpassung von NATs für den Einsatz in mikrofluidischen Chips [20] beinhaltet.

## Analyse der Fragebögen

### Konzept der Umfrage

Zwei Fragebögen (siehe Anhang 1 und Anhang 2) wurden erstellt, die für Hersteller oder für Endanwender spezifische Fragen beinhalten. Beide Umfragebögen enthalten auch gleiche Fragen, vorgesehen zur Beantwortung durch die Firmen und die Analyselaboratorien. Der Umfragebogen für die Endanwender wurde von INSTAND an 1.000 Analyselaboratorien in Deutschland verschickt, die regelmäßig an Ringversuchen für die externe Qualitätssicherung zum Nachweis von Infektionserregern durch NATs teilnehmen. Darüber hinaus kontaktierte INSTAND 336 Laboratorien aus anderen europäischen und nichteuropäischen Ländern. Diese Laboratorien betreiben die Diagnostik von Infektionskrankheiten im Bereich der Virologie, Bakteriologie, Mykobakteriologie, Parasitologie und Mykologie. Viele dieser Laboratorien bieten Diagnostikdienstleistungen in mehreren der oben genannten Bereiche an.

Wir haben Antworten von 48 Laboratorien aus 14 europäischen Ländern erhalten. Bis auf 2 Laboratorien bieten alle Analysen auf mehreren Gebieten der Infektiologie an. Drei Viertel der antwortenden Laboratorien führen monatlich mehr als 1.000 NAT-gestützte Analysen durch. Die Zahlen der teilnehmenden Laboratorien aus den jeweiligen Ländern sind in Abbildung 1 aufgeführt. Die meisten Teilnehmer kamen aus Deutschland und skandinavischen Ländern; wir erhielten jedoch auch Antworten aus dem Baltikum und osteuropäischen Ländern. Insgesamt wurden 36 Hersteller kontaktiert, von denen 12 geantwortet haben. Nur 8 der zurückgesandten Fragebögen konnten bei der Auswertung berücksichtigt werden, da sich 4 Hersteller auf die Entwicklung neuer Geräte

oder Test-Kits konzentrieren und keinen direkten Kontakt zu Analyselaboratorien haben. Die Ergebnisse der Umfrage, die in den Tabellen 2, 3, 4 und 5 zusammengefasst sind, werden im Folgenden vorgestellt. In diesen Tabellen sind die häufigsten Antworten grau markiert.

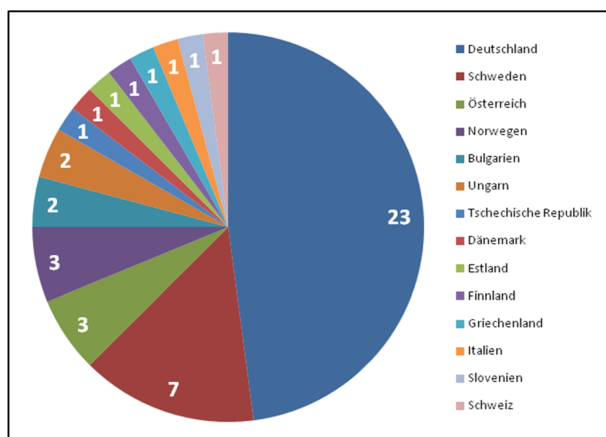


Abbildung 1: Anzahl der an der Umfrage teilnehmenden Analyselaboratorien aus verschiedenen Ländern. Insgesamt wurden 48 Fragebögen ausgewertet.

## Antworten der Hersteller

Die Antworten auf herstellereigene Fragen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Mehrzahl der Hersteller bieten sowohl Geräte als auch besondere Test-Kits (Tabelle 2, Reihe 1) an. Ein Viertel der Antworten stammt von Firmen, die ausschließlich Geräte herstellen. Wenige Firmen (12%) konzentrieren sich auf die Entwicklung von Test-Kits für die Nukleinsäureamplifikation. Bezüglich der Anzahl an gelieferten Test-Kits (Tabelle 2, Reihe 2) für den Nachweis des humanen Cytomegalievirus (CMV), des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), der Hepatitis-B- und -C-Viren (HBV/HCV) liefern die meisten Hersteller (89%) mehr als 1.000 Tests pro Monat aus; die übrigen Firmen (11%) vertreiben 100 bis 1.000 Tests pro Monat. Die Hälfte der Fluidik-Systeme basieren auf konventioneller Technik, wobei 38% der Firmen angeben, dass sie die Mikrosystemtechnologie anwenden (Tabelle 2, Reihe 3). Die Interpretation dieser Antworten gestaltet sich schwierig, da der Begriff „Mikrosystemtechnologie“, d.h. die Anwendung von Ultrapräzisions-Fräsmaschinen oder lithographischen Verfahren für die Herstellung von Prägewerkzeugen oder Spritzgusswerkzeugen mit Oberflächenrauheiten im Bereich von 10 nm, im Fragebogen nicht explizit definiert wurde. Von größerer Bedeutung für die praktische Anwendung ist das Volumen der für die Amplifikation verwendeten Küvette oder Kammer, da bei kleinerem Volumen weniger Material erforderlich ist und kürzere Amplifikationszeiten erwartet werden, insbesondere wenn die PCR-Methode angewandt wird. Für Küvettenvolumina zwischen 10 µL bis 20 µL und 20 µL bis 50 µL werden dieselben Zahlen (38%) angegeben, in einigen wenigen Fällen (13%) ist ein Volumen von über 50 µL erforderlich (Tabelle 2, Reihe 4). Andererseits zeigen die Antworten im Zusammenhang mit der für die

Nukleinsäureamplifikation benötigten Zeit, dass bei Verwendung von geringen Küvettenvolumina keine wesentliche Zeitverkürzung erreicht wird. Sämtliche Antworten geben Amplifikationszeiten von über 25 Minuten (Tabelle 2, Reihe 5) an. Daraus folgt, dass der Beitrag der Amplifikationszeiten zur Durchlaufzeit nicht vernachlässigt werden kann und daher eine entsprechende Verkürzung der Amplifikationszeit äußerst wünschenswert wäre.

## Aktueller Status von NATs abgeleitet aus den Antworten von Herstellern und Analyselaboratorien

Die Marktanteile an Test-Kits und Geräten gemäß den Antworten der Analyselaboratorien sind in Abbildung 2 dargestellt.

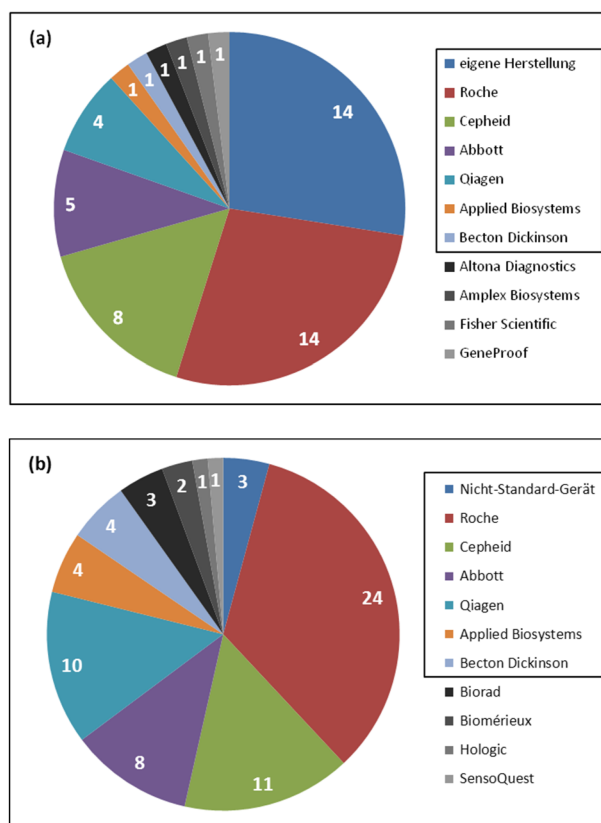


Abbildung 2: Kits (a) und Geräte (b), die in den an der Umfrage teilnehmenden Analyselaboratorien für Nukleinsäureamplifikationstests verwendet werden

Abbildung 2a zeigt, dass für die Nukleinsäureamplifikation zu gleichen Anteilen hausinterne Tests (blaue Farbe, 14 Laboratorien) und Test-Kits der Fa. Roche (rot, 14 Nennungen) verwendet werden. Andere Lieferanten wurden weniger häufig genannt. Für jeden Anbieter wurde dieselbe Farbe in den Abbildungen 2a und 2b gewählt, um den Zusammenhang zwischen den für Nukleinsäureamplifikationstests angewandten Test-Kits und Geräten sichtbar zu machen. In Abbildung 2b werden sowohl die Geräte für die Nukleinsäureamplifikation als auch Apparaturen für die DNA/RNA-Extraktion und -Reinigung be-

**Tabelle 2: Ergebnisse der Umfrage für herstellereigene Fragen mit Informationen über die Produktpalette der Hersteller, Geräteeigenschaften und Anzahl der gelieferten Test-Kits**

Anbieter von			
1	Geräten 25%	Test Kits 12%	Geräten und Test Kits 63%
Anzahl von gelieferten Nukleinsäureamplifikationstests (für CMV, HIV, HBV, HCV)			
2	< 100 / Monat 0%	100 / Monat - 1000 / Monat 11%	> 1000 / Monat 89%
Verwendung der Mikrosystem-Technologie für das Fluidiksystem			
3	Ja 38%		Nein 50%
Gesamtvolumen der Amplifikationskammer / Küvette			
4	< 10µL 0%	10µL - 20µL 38%	20µL - 50µL 38%
			> 50µL 13%
Zeitdauer der Nukleinsäureamplifikation			
5	< 5min 0%	5min - 25min 0%	> 25min 88%

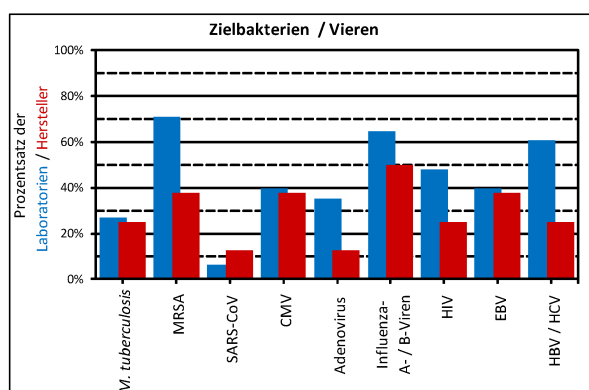
rücksichtigt. Aus Abbildung 2b ergibt sich, dass die Firma Roche nicht nur als Hersteller von Test-Kits sondern auch als Anbieter von Instrumenten (rot, 24 Laboratorien) der Marktführer ist. Als „hausinterner Test“ wird die Verwendung von einem „Nicht-Standard-Gerät“ interpretiert und ist daher blau markiert. Zu den übrigen Firmen, die Test-Kits und Geräte liefern, gehören Cepheid (8/11), Abbott (5/8), Qiagen (4/10), Applied Biosystems (1/4) und Becton Dickinson (1/4). Weitere Firmen, die entweder als Hersteller von Test-Kits (Altona Diagnostics, Amplex Biosystems, Fisher Scientific, GeneProof) oder als Hersteller von Geräten (BioRad, bioMérieux, Hologic, SensoQuest) bezeichnet werden, sind in unterschiedlichen Grautönen markiert.

In Tabelle 3 und Tabelle 4 sind die Antworten der Analyzelaboratorien und die Antworten der Hersteller zu den für die Nukleinsäureamplifikation verwendeten Technologien, Erreger, Probenmaterialien, Arbeitsablauf, Durchlaufzeit, Empfindlichkeit und Preis aufgelistet.

Die PCR-Methode ist die am häufigsten von nahezu allen Analyzelaboratorien (98%) angewandte und von den meisten Firmen (75%) angebotene Technologie. Die isothermale Nukleinsäureamplifikation wird in 8% der Analyzelaboratorien verwendet, und 25% der Firmen stellen die entsprechenden Geräte und/oder Test-Kits her. Keiner der Umfrageteilnehmer – weder die Analyzelaboratorien noch die Hersteller – gaben die Verwendung der branched DNA-Methode (bDNA) an. Die Microarray-Hybridisierung wurde ebenfalls aufgelistet (Tabelle 4, Reihe 1), sie ist jedoch aufgrund des geringen Potenzials für quantitative Messungen weniger relevant bezüglich der Erregeranalyse.

In Abbildung 3 haben wir die Antworten der Analyzelaboratorien (blaue Balken) hinsichtlich der untersuchten Bakterien und Viren zusammengefasst, die im Fragebogen ausdrücklich als Multiple-Choice-Optionen aufgelistet waren. Die roten Balken in Abbildung 3 stellen die Antworten der Hersteller zur Lieferung der entsprechenden Test-

Kits dar. Die Analyzelaboratorien (Tabelle 3, Reihe 2) gaben an, dass Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Influenza-A- und Influenza-B-Viren sowie Hepatitis-B- und -C-Viren (HBV/HCV) in jeweils mehr als 50% der Laboratorien nachgewiesen werden. *M. tuberculosis* (27%), das humane Cytomegalievirus (CMV) (40%), Adenovirus (35%), das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) (48%) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) (40%) werden ebenfalls häufig analysiert. Andererseits verfügen nur wenige Laboratorien (6%) über die Molekulardiagnostik für das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV), welches der Verursacher des schweren akuten Atemwegsyndroms ist.



**Abbildung 3: Relative Anzahl der Laboratorien, die NATs für die angegebenen Erreger einsetzen (blaue Säulen). Prozentzahl der Hersteller, die entsprechende Kits liefern (rote Säulen). Die Daten sind in den Tabellen 3 und 4 angegeben. MRSA: Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*; SARS-CoV: SARS-Assoziiertes Coronavirus, das das Schwere Akute Atemwegsyndrom verursacht; CMV: Humanes Cytomegalie-Virus; HIV: Humanes Immundefizienz-Virus; EBV: Epstein-Barr Virus; HBV/HCV: Hepatitis B und C Viren.**

Für sämtliche dieser NATs gibt es handelsübliche Test-Kits, die von einigen Herstellern geliefert werden. Gemäß

**Tabelle 3: Antworten der Endnutzer zum derzeitigen Stand der Präparations- und Messverfahren sowie Wünsche bezüglich der Empfindlichkeit und der Kosten von NATs**

1	Amplifikationsmethode			
	Temperaturzyklen (PCR) 98%	isothermale Amplifikation 8%	branched DNA Amplifikation 0%	
2	Zielbakterien / Viren			
	<i>M. tuberculosis</i> 27%	MRSA 71%	SARS-CoV 6%	
	CMV 40%	Adenovirus 35%	Influenza A / B 65%	
	HIV 48%	EBV 40%	HBV / HCV 60%	
3	Sonstige Bakterien / Viren, die im Fragebogen nicht explizit angegeben wurden			
	<i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) 44%	Norovirus 27%	HSV-1 / HSV-2 27%	
	Varicella zoster virus (VZV, HHV-3) 23%	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG) 23%	<i>Mycoplasma genitalium</i> 17%	
4	Probenmaterial			
	Blut / Plasma 60%	Abstrich 83%	Biopsie-Gewebe 38%	Urin 44%
	BAL 25%	Stuhl 33%	CSF 21%	Sputum 13%
5	Hauptsächlich verwendeter Arbeitsablauf zur Probenpräparation und Nukleinsäureamplifikation			
	Manuelle Präparation 33%	Komplett-Tests, automatisierte Präparation und Verstärkung in einem / mehreren Geräten 63%	vollständige Kartuschen-Tests 21%	
6	Durchlaufzeit zum Erregernachweis			
	< 60min 2%	1h - 2h 23%	> 2h 77%	
7	Erforderliche Nachweisgrenze oder analytische Empfindlichkeit in reinen Proben			
	< 10 Kopien mL <sup>-1</sup> 29%	10 Kopien mL <sup>-1</sup> - 50 Kopien mL <sup>-1</sup> 26%	50 Kopien mL <sup>-1</sup> - 100 Kopien mL <sup>-1</sup> 31%	100 Kopien mL <sup>-1</sup> - 500 Kopien mL <sup>-1</sup> 14%
8	Vertretbare Kosten pro Test für ausgewählte Erreger			
	< 1€ 17%	1€ - 4€ 49%	4€ - 6€ 34%	> 6€ 0%

Tabelle 4, Reihe 2 werden von den antwortenden Firmen Test-Kits angeboten für Influenza-A- und Influenza-B-Viren (50%) sowie MRSA, CMV und EBV (jeweils 38%). Ein geringerer Anteil der Firmen liefern Test-Kits für *M. tuberculosis*, HIV und HBV/HCV (jeweils 25%) sowie für Adenovirus und SARS-CoV (jeweils 13%).

*M. tuberculosis* wird in 27% der Analyselaboratorien getestet (Tabelle 3, Reihe 2). Wie in Referenz [21] angegeben, wird in den östlichen WHO-Mitgliedstaaten *M. tuberculosis* viel häufiger gemeldet als in den westlichen WHO-Mitgliedstaaten. Dieser Tuberkulosebericht 2014 der WHO zeigt für die mehrfach arzneimittelresistente Tuberkulose (MDR-TB) weltweit einen Anstieg neuer Fälle von 3,5% im Jahr 2013. In einigen Ländern jedoch – Russische Föderation, Usbekistan, Moldawien, Kasachstan, Kirgistan und Weißrussland – lag der Anstieg neuer Fälle zwischen 19%–35% in den Jahren 2011–2013. Besorgniserregend ist dabei der erhebliche Anteil von extrem

resistenten (XDR) *M. tuberculosis*-Stämmen und der fortwährende Rückgang der Erfolgsrate bei medikamentöser Tuberkulose-therapie.

Die prozentuale Häufigkeit bei der Anwendung von Tests zum Nachweis von Infektionserregern in den antwortenden Laboratorien sowie die Lieferung von handelsüblichen Diagnostiktests durch die antwortenden Hersteller (Abbildung 3) scheint den Diagnosebedarf der entsprechenden Methoden für das öffentliche Gesundheitswesen in den Ländern, aus denen die Antworten kamen (Teile Nord-, Ost- und Mitteleuropas), widerzuspiegeln. Dieser Zusammenhang mag sowohl für MRSA als auch für HBV/HCV und die Influenza-A- und Influenza-B-Viren gelten. Interessanterweise halten die antwortenden Laboratorien an Diagnostiktests für den Nachweis des SARS-CoV fest, obwohl es seit 2004 nirgendwo auf der Welt bekannte Fälle von SARS-CoV-Infektionen gegeben hat (<http://www.cdc.gov/coronavirus/about/index.html>).



Tabelle 4: Antwort der Hersteller zum derzeitigen Stand der Präparation, Messverfahren und der Kosten für NATs

Amplifikationsmethode																			
1	<table border="0"> <tr> <td>Temperaturzyklen (PCR)</td> <td>isothermale Amplifikation</td> <td>branched DNA - Amplifikation</td> <td>Microarray Hybridisierung</td> </tr> <tr> <td>75%</td> <td>25%</td> <td>0%</td> <td>13%</td> </tr> </table>	Temperaturzyklen (PCR)	isothermale Amplifikation	branched DNA - Amplifikation	Microarray Hybridisierung	75%	25%	0%	13%										
Temperaturzyklen (PCR)	isothermale Amplifikation	branched DNA - Amplifikation	Microarray Hybridisierung																
75%	25%	0%	13%																
Zielbakterien / Viren																			
2	<table border="0"> <tr> <td><i>M. tuberculosis</i></td> <td>MRSA</td> <td>SARS-CoV</td> </tr> <tr> <td>25%</td> <td>38%</td> <td>13%</td> </tr> <tr> <td>CMV</td> <td>Adenovirus</td> <td>Influenza A / B</td> </tr> <tr> <td>38%</td> <td>13%</td> <td>50%</td> </tr> <tr> <td>HIV</td> <td>EBV</td> <td>HBV / HCV</td> </tr> <tr> <td>25%</td> <td>38%</td> <td>25%</td> </tr> </table>	<i>M. tuberculosis</i>	MRSA	SARS-CoV	25%	38%	13%	CMV	Adenovirus	Influenza A / B	38%	13%	50%	HIV	EBV	HBV / HCV	25%	38%	25%
<i>M. tuberculosis</i>	MRSA	SARS-CoV																	
25%	38%	13%																	
CMV	Adenovirus	Influenza A / B																	
38%	13%	50%																	
HIV	EBV	HBV / HCV																	
25%	38%	25%																	
Probenmaterial																			
3	<table border="0"> <tr> <td>Blut / Plasms</td> <td>Abstrich</td> <td>Biopsie-Gewebe</td> <td>Urin</td> </tr> <tr> <td>36%</td> <td>46%</td> <td>22%</td> <td>13%</td> </tr> <tr> <td>BAL</td> <td>Stuhl</td> <td>CSF</td> <td>Sputum</td> </tr> <tr> <td>13%</td> <td>50%</td> <td>13%</td> <td>13%</td> </tr> </table>	Blut / Plasms	Abstrich	Biopsie-Gewebe	Urin	36%	46%	22%	13%	BAL	Stuhl	CSF	Sputum	13%	50%	13%	13%		
Blut / Plasms	Abstrich	Biopsie-Gewebe	Urin																
36%	46%	22%	13%																
BAL	Stuhl	CSF	Sputum																
13%	50%	13%	13%																
Arbeitsablauf für Nukleinsäuretests																			
4	<table border="0"> <tr> <td>Manuelle Präparation</td> <td>Komplett-Tests, automatisierte Präparation und Verstärkung in einem / mehreren Geräten</td> <td>Vollständige Kartuschen-Tests</td> </tr> <tr> <td>63%</td> <td>25%</td> <td>13%</td> </tr> </table>	Manuelle Präparation	Komplett-Tests, automatisierte Präparation und Verstärkung in einem / mehreren Geräten	Vollständige Kartuschen-Tests	63%	25%	13%												
Manuelle Präparation	Komplett-Tests, automatisierte Präparation und Verstärkung in einem / mehreren Geräten	Vollständige Kartuschen-Tests																	
63%	25%	13%																	
Durchlaufzeit zum Nachweis der Pathogene																			
5	<table border="0"> <tr> <td>&lt; 60min</td> <td>1h - 2h</td> <td>&gt; 2h</td> </tr> <tr> <td>0%</td> <td>38%</td> <td>38%</td> </tr> </table>	< 60min	1h - 2h	> 2h	0%	38%	38%												
< 60min	1h - 2h	> 2h																	
0%	38%	38%																	
Nachweisgrenze oder analytische Empfindlichkeit in reinen Proben																			
6	<table border="0"> <tr> <td>&lt; 10 Kopien mL<sup>-1</sup></td> <td>10 Kopien mL<sup>-1</sup> - 50 Kopien mL<sup>-1</sup></td> <td>50 Kopien mL<sup>-1</sup> - 100 Kopien mL<sup>-1</sup></td> <td>100 Kopien mL<sup>-1</sup> - 500 Kopien mL<sup>-1</sup></td> </tr> <tr> <td>20%</td> <td>50%</td> <td>10%</td> <td>20%</td> </tr> </table>	< 10 Kopien mL <sup>-1</sup>	10 Kopien mL <sup>-1</sup> - 50 Kopien mL <sup>-1</sup>	50 Kopien mL <sup>-1</sup> - 100 Kopien mL <sup>-1</sup>	100 Kopien mL <sup>-1</sup> - 500 Kopien mL <sup>-1</sup>	20%	50%	10%	20%										
< 10 Kopien mL <sup>-1</sup>	10 Kopien mL <sup>-1</sup> - 50 Kopien mL <sup>-1</sup>	50 Kopien mL <sup>-1</sup> - 100 Kopien mL <sup>-1</sup>	100 Kopien mL <sup>-1</sup> - 500 Kopien mL <sup>-1</sup>																
20%	50%	10%	20%																
Preis pro Test für ausgewählte Pathogene																			
7	<table border="0"> <tr> <td>&lt; 1€</td> <td>1€ -4€</td> <td>4€ - 8€</td> <td>&gt; 8€</td> </tr> <tr> <td>21%</td> <td>21%</td> <td>0%</td> <td>57%</td> </tr> </table>	< 1€	1€ -4€	4€ - 8€	> 8€	21%	21%	0%	57%										
< 1€	1€ -4€	4€ - 8€	> 8€																
21%	21%	0%	57%																

Neben den Erregern, die ausdrücklich im Fragebogen aufgeführt sind, wurden die Teilnehmer auch gebeten, andere relevante Bakterien und Viren anzugeben. Die häufigsten Antworten sind in Tabelle 3, Reihe 3 zusammengefasst. Neben *Chlamydia trachomatis*, das in 44% der Laboratorien nachgewiesen wird, werden Norovirus (27%), HSV-1/HSV-2 (27%), Varizella-Zoster-Virus (23%), *Neisseria gonorrhoeae* (23%) und *Mycoplasma genitalium* (17%) analysiert.

Die Verteilung des für NATs verwendeten Untersuchungsmaterials ist in Abbildung 4 dargestellt. Aus der Antwort der Analyselaboratorien lässt sich schließen (Abbildung 4, blaue Balken; Tabelle 3, Reihe 4), dass meistens Abstriche (83%) und Blut/Blutplasma (60%) verwendet werden. Neben diesen Proben werden Urin (44%), Biopsie-Gewebe (38%), Stuhlproben (33%), bronchoalveoläre Lavage (BAL) (25%), Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) (21%) und Sputum (13%) für die NAT verwendet. Die Prozentsätze an Herstellern, die Test-Kits für diese Untersuchungsmaterialien herstellen (Tabelle 4, Reihe 3), sind als rote Balken in Abbildung 4 dargestellt. Die meisten Nennungen beziehen sich auf Stuhlproben (50%), Abstriche (46%) und Blut/Blutplasma (36%), gefolgt von Gewebeprobe (22%). Diese Proben sind die vier am häufigsten von den Analyselaboratorien genannten Materialien.

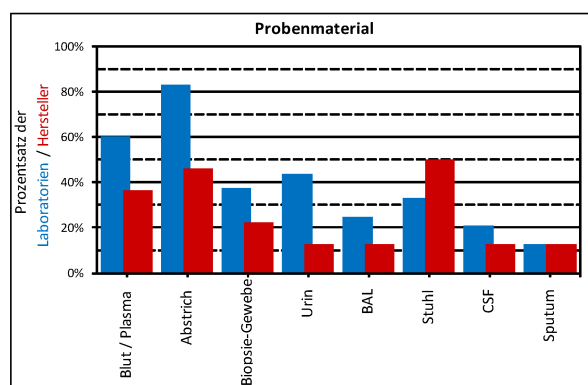
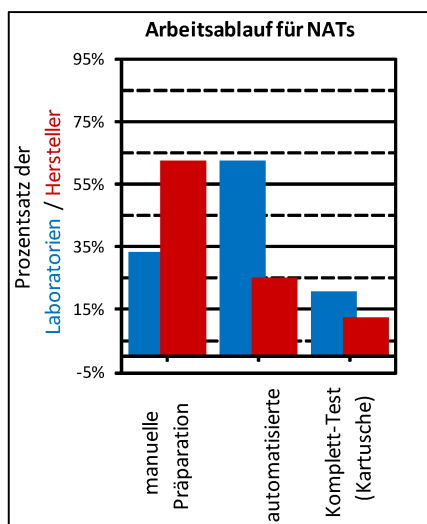


Abbildung 4: Prozentsatz der Laboratorien (blaue Säulen), die das aufgeführte Probenmaterial verwenden und die relative Zahl der Hersteller (rote Säulen), die die entsprechenden Kits liefern. BAL: Bronchoalveoläre Lavage; CSF: Zerebrospinalflüssigkeit.

Im Fragebogen sind drei Möglichkeiten für den Ablauf von NATs angegeben. (i) Die manuelle Präparation erfordert eine DNA-/RNA-Extraktion, -Aufreinigung sowie die Pipettierung von Reagenzien. (ii) Komplett-Tests umfassen die automatisierte Präparation und Amplifikation in einem oder verschiedenen Geräten. (iii) Vollständige Kartuschen-tests oder kassettengestützten Test umfassen sämtliche

benötigten Reagenzien, so dass nur das Untersuchungsmaterial eingebracht werden muss. Wie in Abbildung 5 und Tabelle 3, Reihe 5 dargestellt, wird in 33% der Fälle die manuelle Präparation in den Analyselabors verwendet. Gegenwärtig werden Tests vorgezogen, die die automatisierte Präparation (63%) der Proben umfassen. Vollautomatisierte Kartuschen- oder Kassetten-Tests werden in 21% der Laboratorien verwendet. Die Summe beträgt mehr als 100%, da in einigen Laboratorien verschiedene Methoden parallel verwendet werden. Die Hersteller (Tabelle 4, Reihe 4) haben am häufigsten die manuelle Präparation (63%) angegeben, die automatisierte Präparation wird in 25% und die Verwendung von Kartuschen-tests in 13% der Fälle genannt. Im Vergleich zu den Analyselaboratorien ist die Reihenfolge im Falle der manuellen und der automatisierten Präparation umgekehrt, möglicherweise weil die meisten Laboratorien einen hohen Durchlauf haben, der ein Höchstmaß an Automatisierung erfordert. Übereinstimmend rangieren bei beiden Gruppen Kartuschen-Tests an dritter Stelle; der relative Marktanteil beläuft sich schätzungsweise auf 10% bis 20%.



**Abbildung 5: Vergleich der verschiedenen Arbeitsabläufe für NATs gemäß den Antworten der Analyselaboratorien (blaue Säulen) und der Hersteller (rote Säulen)**

Laut Analyselaboratorien (Tabelle 3, Reihe 6) liegt die Durchlaufzeit für den Nachweis von Infektionserregern mit Hilfe von NATs üblicherweise über 2 h (77%), 23% gaben Durchlaufzeiten zwischen 1 h bis 2 h und 2% sogar unter 60 min an. Die Analyseempfindlichkeit oder Nachweisgrenze in reinen Untersuchungsmaterial oder Kalibratoren, welche von den meisten Analyselaboratorien für den verlässlichen Erregernachweis gefordert wird, ist ungefähr gleich bei  $<10$  Kopien  $\text{mL}^{-1}$  (29%), 10 Kopien  $\text{mL}^{-1}$  bis 50 Kopien  $\text{mL}^{-1}$  (26%) und 50 Kopien  $\text{mL}^{-1}$  bis 100 Kopien  $\text{mL}^{-1}$  (31%) (Tabelle 3, Reihe 7). Die von den Analyselaboratorien angegebene große Bandbreite beruht vermutlich auf der Tatsache, dass erregerspezifische Empfindlichkeiten und Nachweisgrenzen für die verlässliche Diagnostik erforderlich sind. Die Antworten der Hersteller auf diese Fragen stimmen gut überein

mit dem Bedarf der Analyselaboratorien und zeigen Tendenzen zu niedrigeren Durchlaufzeiten (38% geben eine Spanne von 1 h bis 2 h an) (Tabelle 4, Reihe 5) und zu einer höheren Empfindlichkeit (50% geben eine Empfindlichkeit von 10 Kopien  $\text{mL}^{-1}$  bis 50 Kopien  $\text{mL}^{-1}$  an; siehe Tabelle 4, Reihe 6). Die vertretbaren Kosten für die geforderten Tests werden jedoch von den Analyselaboratorien im Vergleich zu den Herstellern niedriger angegeben. Der Bereich bis zu 4 € pro Test wird von 66% der Analyselaboratorien (Tabelle 3, Reihe 8) und 42% der Firmen (Tabelle 4, Reihe 7) genannt. Die von den Laboratorien genannte Obergrenze liegt bei 6 €, die Hersteller geben jedoch an, dass die Kosten für einige Test-Kits (57%) über 8 € liegen. Auch hier zeigt die breite Spanne an akzeptablen Kosten und kostendeckenden Preisen, dass für unterschiedliche Erreger und Untersuchungsmaterialien die Komplexität der Test-Kits und die entsprechenden Aufwendungen für die Entwicklungen ausschlaggebend sind.

## Bedarf an schnellen NATs für die klinische Diagnostik aus der Sicht der Analyselaboratorien

In Tabelle 5 sind die Antworten auf die für die Analyselaboratorien spezifischen Fragen aufgeführt. Wie bereits erwähnt, untersuchen die meisten Analyselaboratorien (75%) mehr als 1.000 Proben pro Monat auf Infektionserreger (Tabelle 5, Reihe 1). Dabei verwenden die Laboratorien überwiegend Komplett-Tests mit automatisierter Präparation und Amplifikation sowie vollständige Kartuschentests oder kassettengestützte Tests (siehe Tabelle 3, Reihe 5: Summe 84%). Bei hohem Probendurchsatz ist die Automatisierung notwendig, um Analysen in kurzer Zeit zu vernünftigen Kosten anbieten zu können. Ungefähr 21% der Nutzer führen 100 bis 1.000 Tests pro Monat und 4% der Analyselaboratorien weniger als 100 Tests pro Monat durch. Der relative Anteil an NATs an sämtlichen Analysen deckt das komplette Spektrum von  $<25\%$  bis  $>75\%$  ab, wobei der Bereich  $<25\%$  am häufigsten, von 54% der Laboratorien (Tabelle 5, Reihe 2), angegeben wurde. Die Verteilung zeigt ein zweites (relatives) Maximum: 23% der Laboratorien führen in mehr als 75% der Analysen Nukleinsäureamplifikationstests durch. Dieses Umfrageergebnis zeigt die steigende Bedeutung von Nukleinsäureamplifikationstests. Mehr als der Hälfte aller Laboratorien (54%) benutzt die NATs zusätzlich zu anderen Diagnosemethoden. In spezialisierten Einrichtungen (23%) werden NATs als das wichtigste Verfahren eingesetzt (Tabelle 5, Reihe 2).

In der Umfrage gaben ungefähr 40% (Tabelle 5, Reihe 3) der Analyselaboratorien an eine „schnelle“ PCR/NAT zu verwenden. Allerdings wird diese Aussage nicht von den Antworten bezüglich der Durchlaufzeiten unterstützt, da nur 2% der Laboratorien Zeiten unter 60 Minuten (Tabelle 3, Reihe 6) erreichen. Diese 2% der Laboratorien scheinen die derzeitige Situation besser widerzuspiegeln als die 38%, die in Tabelle 3, Reihe 3 im Bereich der „schnellen“ Schnell Diagnostik angegeben sind. Wir inter-

**Tabelle 5: Umfrageergebnis der für Endanwender spezifischen Fragen als Übersicht für die Anzahl schneller NATs pro Monat und den Bedarf an schnellen NATs für Infektionskrankheiten**

Anzahl aller Analysen (mit und ohne NATs) für die Diagnostik von Infektionserkrankungen			
1	< 100 / Monat 4%	100 / Monat - 1000 / Monat 21%	> 1000 / Monat 75%
Relativer Anteil der NATs bezogen auf alle Analysen			
2	< 25% 54%	25% - 50% 8%	50% - 75% 10%
			> 75% 23%
Einsatz schneller PCR / NAT			
3	Ja 38%		Nein 60%
Für welche Bakterien / Viren werden schnelle PCR / NATs dringend benötigt?			
4	<i>M. tuberculosis</i> 2%	MRSA 54%	SARS-CoV 0%
	CMV 10%	Adenovirus 2%	Influenza A / B 21%
	HIV 2%	EBV 2%	HBV / HCV 13%
			Norovirus 27%
Erforderliche Durchlaufzeiten für ausgewählte Erreger			
5	< 10min 16%	< 15min 72%	< 60min 12%
Geschätzte Analysen basierend auf schnellen NATs			
6	<i>M. tuberculosis</i> > 50 Tests / Monat	MRSA > 50 Tests / Monat	SARS-CoV n.a.
	CMV 10 - 50 Tests / Monat	Adenovirus > 50 Tests / Monat	Influenza A / B > 50 Tests / Monat
	HIV 10 - 50 Tests / Monat	EBV < 10 Tests / Monat	HBV / HCV 10 - 50 Tests / Monat
			Norovirus > 50 Tests / Monat
Werden quantitative schnelle NATs benötigt?			
7	qualitative Tests sind angemessen 31%	quantitative Tests sind erforderlich 2%	abhängig vom Erreger 44%
Beabsichtigen Sie die Beschaffung von Geräten für schnelle NATs?			
8	Nein 50%	Im nächsten Jahr 15%	In den nächsten 3 Jahren 8%
			später 19%

pretieren diese Diskrepanzen als nicht konforme Definitionen und schlagen die Verwendung des Begriffs „schnelle“ PCR/NATs als charakteristisch für Durchlaufzeiten unter 30 Minuten vor, um dem neuesten Stand der Technik der NATs besser Rechnung tragen zu können. Die Bakterien und Viren, für die die Analyselaboratorien schnelle Nukleinsäuretests benötigen, sind in Abbildung 6 (Tabelle 5, Reihe 4) aufgeführt. Der Prozentsatz an Laboratorien, die einen Schnelltest nachfragen, wird auf einer logarithmischen Skala angezeigt, um die großen Variationen darzustellen.

Für alle im Fragebogen aufgeführten Erreger, mit der Ausnahme von SARS, gibt es Interesse an erheblich kürzeren Durchlaufzeiten. Die meisten Nutzer wünschen eine Durchlaufzeit unter 15 min (72%, Tabelle 5, Reihe 5). Allerdings reicht die Zahl der Laboratorien, die solche schnellen NATs nachfragen, von nur 2% für *M. tuberculosis*, Adenovirus, HIV und EBV bis zu 54% für MRSA. Neben MRSA zeigt ein Großteil der Antworten den Bedarf an Schnelltests für das Norovirus (27%) und die Influenza-

A- und -B-Viren (21%). Ungefähr 10% der Analyselaboratorien haben einen Bedarf für schnelle CMV- und HBV/HCV-Nukleinsäuretests. In Abbildung 6 ist – auf der Grundlage der häufigsten Aussagen – die erwartete Anzahl an Schnelltests (Tabelle 5, Reihe 6) für jedes Analyselabor als Farbcodes angegeben: violett steht für <10 Tests pro Monat, hellbraun für 10 bis 50 Tests pro Monat und grün für >50 Tests pro Monat. Alternativ zur Darstellung der erwarteten erregerspezifischen Testanzahl wird in Abbildung 7 die Summe aller erwarteten Test pro Analyselabor angegeben. Aus Abbildung 7 folgt, dass die meisten Endnutzer, die schnelle NATs verwenden möchten, mit mehr als 50 Tests pro Monat rechnen. Dabei ist zu beachten, dass die Gesamtzahl an Nennungen (60) die Zahl der teilnehmenden Laboratorien (48) übersteigt, da üblicherweise mehr als ein Erreger in jedem Analyselaboratorium analysiert wird. Verglichen mit dem typischen Durchlauf von >1.000 Analysen pro Monat läge der relative Anteil an Schnelltests in der Größenordnung um 5%.

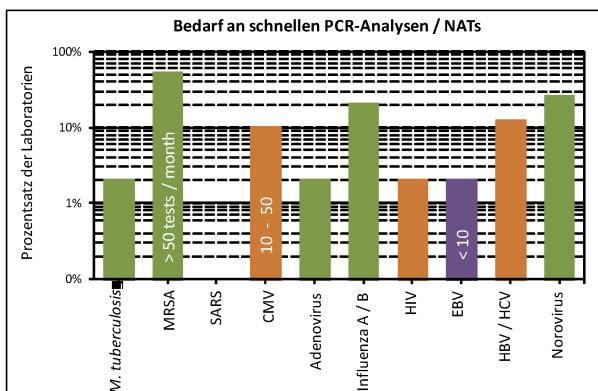


Abbildung 6: Prozentsatz der Laboratorien, die schnelle Nukleinsäureamplifikationstests für die angegebenen Erreger einsetzen möchten. Die Farben geben die erwartete Anzahl von Tests pro Monat für das jeweilige Bakterium oder Virus in einem einzelnen Laboratorium an.

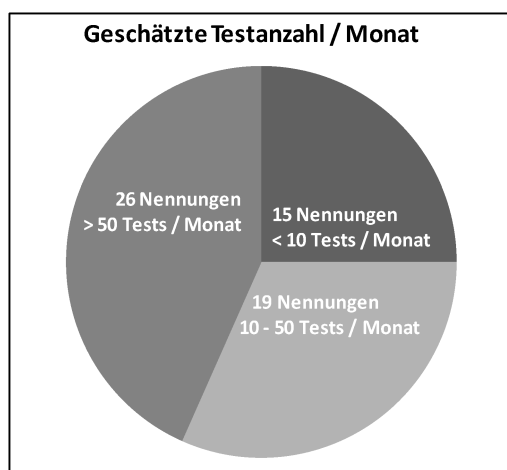


Abbildung 7: Anzahl der erwarteten schnellen NATs pro Monat in jedem Analyzelaboratorium für bestimmte Erreger

Auf die Frage, ob qualitative oder quantitative Tests benötigt werden, gab es verschiedene Antworten. Entsprechend Tabelle 5, Reihe 7 machen die meisten Analyzelaboratorien (44%) die Wahl zwischen einem qualitativen oder quantitativen Test von dem nachzuweisenden Erreger abhängig. Mit einem qualitativen Ergebnis wären 31% der Analyzelaboratorien zufrieden.

Die Antworten bezüglich des Kaufs von Geräten (Tabelle 5, Reihe 8) und der Etablierung schneller Nukleinsäuretests in Analyzelaboratorien (50% möchten keine Schnelltests einführen und 19% antworteten mit "später als in den nächsten drei Jahren") zeigen, dass die Endnutzer derzeit abwarten, möglicherweise weil die Technologien für schnelle NATs noch in der Entwicklung sind und durch entsprechende Forschungsaktivitäten weiter verbessert werden.

## Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Umfrage beziehen sich auf die Antworten von 48 Analyzelaboratorien, die meisten davon mit Sitz in Deutschland. Ungefähr ein Viertel der Antworten kam aus skandinavischen Ländern. Abgesehen von den Kosten herrschte bezüglich des derzeitigen Stands der NAT-Technik im Großen und Ganzen Konsens zwischen Endnutzern und Herstellern, wenngleich nur 8 Firmen geantwortet haben.

Zu den am häufigsten, in mehr als der Hälfte der Laboratorien analysierten Erregern gehören MRSA, Influenza-A- und -B-Viren und HBV/HCV, gefolgt von HIV, EBV, CMV und dem Adenovirus, das in ungefähr 40% der Laboratorien nachgewiesen wird. *M. tuberculosis* wurde von 27% der Analyzelaboratorien als nachzuweisendes Pathogen angegeben. Neben diesen Erregern, die im Fragebogen explizit als Multiple-Choice-Option gelistet waren, werden häufig auch *Chlamydia trachomatis*, Norovirus und *Neisseria gonorrhoeae* (in 20% bis 40% der Laboratorien) analysiert.

Die Mehrzahl der teilnehmenden Analyzelaboratorien führt mehr als 1.000 Analysen pro Monat durch, um Infektionskrankheiten nachzuweisen. Daher ist ein hohes Maß an Automatisierung erforderlich, um einen hohen Probendurchlauf zu erreichen, wobei konventionelle Komplett-Tests oder vollständige Kartuschen-Tests verwendet werden. Der relative Anteil an hausinternen Tests für die Nukleinsäure-Extraktion/-Aufreinigung und -Amplifikation beträgt ungefähr 27%. Dagegen verwenden 73% der Analyzelaboratorien Test-Kits, die von unterschiedlichen Herstellern geliefert werden. In diesem Zusammenhang ist die interne und externe Qualitätssicherung äußerst wichtig, um sicherzustellen, dass Ergebnisse aus unterschiedlichen Laboratorien innerhalb der Bewertungsgrenzen, die für bestimmte Erreger in den entsprechenden Richtlinien [22] der Bundesärztekammer geregelt sind, liegen.

Die Umfrage zeigt, dass aufgrund der dramatischen Reduzierung der für die Kultivierung von Pathogenen notwendigen Durchlaufzeiten von mehreren Tagen auf 2 h - 4 h nach der Einführung von PCR der Begriff „schnelle“ Analyse uneinheitlich verwendet wird. Aus dem Fragebogen ergibt sich, dass der derzeitige Stand der Technik für die Durchlaufzeit von PCR-gestützten Nukleinsäuretests immer noch bei >2 h liegt. Es ist zu erwarten, dass der nächste Schritt hin zu einer schnellen und patientennahen Diagnostik durch die Implementierung von vollständigen Tests mit einer isothermalen Methode für NATs erfolgen wird. Mit derartigen Testsystemen können Durchlaufzeiten unter 30 min erreicht werden, möglicherweise lassen sich Zeiten zwischen 10–15 min erreichen. Daher bietet sich als Definition für einen schnellen Nukleinsäureamplifikationstest eine Analyse mit Durchlaufzeiten von <30 min an. Für schnelle NATs ist die Verwendung von vollständigen Kartuschentest mit integrierten mikrofluidischen Chips ein vielversprechender Ansatz.



Von besonderem Interesse ist dabei die RPA [7]; [23], da die Amplifikation bei ungefähr 37 °C durchgeführt werden kann.

Die Mehrheit der Laboratorien (75%) weist auf den Bedarf an schnellen Nukleinsäuretests für bestimmte Erreger hin. Für mehr als 50% der AnalySELaboratorien ist MRSA besonders wichtig, 27% fordern schnelle NATs zum Nachweis des Norovirus und 21% fragen nach schnellen NATs zum Nachweis der Influenza-A- und Influenza-B-Viren (Tabelle 5, Reihe 4). Nach Aussage von ungefähr 10% der Laboratorien werden schnelle Tests für weitere Erreger wie HBV HCV und CMV benötigt. Die gewünschte Durchlaufzeit für schnelle Nukleinsäuretests zum Nachweis dieser Krankheitserreger beträgt <15 min (Tabelle 5, Reihe 5). Etwas mehr Laboratorien gaben an (44% verglichen mit 31%, Tabelle 5, Reihe 7), dass – je nach Krankheitserreger – quantitative Tests den qualitativen Analysen vorzuziehen wären. Die Ergebnisse des Fragebogens erlauben die Abschätzung, dass der relative Anteil an NATs verglichen mit der monatlichen Gesamtzahl an Analysen etwa 5% beträgt. Dabei ist anzumerken, dass die Bakterien und Viren, für die Schnelltests angefordert werden, derzeit in den an der Umfrage teilnehmenden Laboratorien häufig mittels PCR nachgewiesen werden. Neben der herkömmlichen Nukleinsäure-Amplifikationsmethode mittels PCR wenden nur wenige Laboratorien (8%) isothermale Amplifikationstechniken an. Dies zeigt, dass auch weiterhin Forschung und Entwicklung notwendig sind, um die Nachteile der isothermalen Methoden für Nukleinsäure-Amplifikation zu überwinden. Insbesondere würde die Möglichkeit, quantitative Ergebnisse zu erhalten, die Anwendung isothermaler Tests in Routine-Laboratorien und für POC-Anwendungen sicherlich beschleunigen. Darüber hinaus müssen isothermale Tests in Einwegkartuschen integriert werden, um die Handhabung und Reproduzierbarkeit zu verbessern und die Durchlaufzeit auf den geforderten Bereich von <15 min zu verringern. Aufgrund der laufenden Entwicklung warten die meisten Endnutzer (85%) immer noch ab, bevor sie die entsprechende Ausrüstung für die schnelle (isothermale) Nukleinsäureanalyse beschaffen. Die Antworten der Umfrage erlauben allerdings die Schlussfolgerung, dass für einige Anwendungen schnelle NATs benötigt werden, um die messtechnische Unterstützung für diagnostische und therapeutische Entscheidungen zu verbessern.

## Anmerkungen

### Interessenkonflikte

Heinz Zeichhardt und Hans-Peter Grunert besitzen Geschäftsanteile bei der GBD (Gesellschaft für Biotechnologische Diagnostik) mbH, Berlin. Die GBD ist Hersteller von Materialien für die externe Qualitätskontrolle. Die anderen Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

## Danksagung

Der Fragebogen wurde an AnalySELaboratorien verschickt, die an den von INSTAND e.V. (Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V., Düsseldorf, Deutschland) organisierten Ringversuchen zur externen Qualitätssicherung für Nukleinsäuretests teilnehmen. Wir danken INSTAND e.V. – insbesondere Michael Spannagl, dem Vorsitzenden von INSTAND, sowie Ingo Schellenberg, dem stellvertretenden Vorsitzenden von INSTAND – für ihre Unterstützung. Die Arbeit wurde von der Europäischen Union im Rahmen des European Metrology Research Programme (EMRP) HLT-08, 2011 'INFECT-MET' gefördert.

## Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-6/lab000016.shtml>

1. lab000016\_Attach1\_Questionnaire\_Manufacturers.pdf (149 KB)  
Fragebogen für Hersteller
2. lab000016\_Attach2\_Questionnaire\_End-users.pdf (150 KB)  
Fragebogen für Endanwender

## Literatur

1. Jeyaratnam D, Whitty CJ, Phillips K, Liu D, Orezzi C, Ajoku U, French GL. Impact of rapid screening tests on acquisition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: cluster randomised crossover trial. *BMJ*. 2008 Apr;336(7650):927-30. DOI: 10.1136/bmj.39525.579063.BE
2. Polisena J, Chen S, Cimon K, McGill S, Forward K, Gardam M. Clinical effectiveness of rapid tests for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized patients: a systematic review. *BMC Infect Dis*. 2011;11:336. DOI: 10.1186/1471-2334-11-336
3. Niemz A, Ferguson TM, Boyle DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol*. 2011 May;29(5):240-50. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.01.007
4. Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip*. 2012 Jul;12(14):2469-86. DOI: 10.1039/c2lc40100b
5. Asiello PJ, Baeumner AJ. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab Chip*. 2011 Apr;11(8):1420-30. DOI: 10.1039/c0lc00666a
6. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Mar;27(3):224-43. DOI: 10.1080/15257770701845204
7. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006 Jul;4(7):e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
8. Tsongalis GJ. Branched DNA technology in molecular diagnostics. *Am J Clin Pathol*. 2006 Sep;126(3):448-53. DOI: 10.1309/90BU6KDXANFLN4RJ



9. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
10. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov;289(1):150-4. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5921
11. Pacht C, Todd JA, Kern DG, Sheridan PJ, Fong SJ, Stempien M, Hoo B, Besemer D, Yeghiazarian T, Irvine B, et al. Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995 Apr 15;8(5):446-54. DOI: 10.1097/00042560-199504120-00003
12. Madej RM, Davis J, Holden MJ, Kwang S, Labourier E, Schneider GJ. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. *J Mol Diagn.* 2010 Mar;12(2):133-43. DOI: 10.2353/jmol dx.2010.090067
13. Highbarger HC, Hu Z, Kottlil S, Metcalf JA, Polis MA, Vasudevachari MB, Lane HC, Dewar RL. Comparison of the Abbott 7000 and Bayer 340 systems for measurement of hepatitis C virus load. *J Clin Microbiol.* 2007 Sep;45(9):2808-12. DOI: 10.1128/JCM.00202-07
14. Dinh DT, Le MT, Vuong CD, Hasebe F, Morita K. An Updated Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of H5N1 Avian Influenza Viruses. *Trop Med Health.* 2011 Mar;39(1):3-7. DOI: 10.2149/tmh.2010-21
15. Gandelman OA, Church VL, Moore CA, Kiddle G, Carne CA, Parmar S, Jalal H, Tisi LC, Murray JA. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time. *PLoS One.* 2010 Nov 30;5(11):e14155. DOI: 10.1371/journal.pone.0014155
16. Gandelman O, Jackson R, Kiddle G, Tisi L. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *Int J Mol Sci.* 2011;12(12):9108-24. DOI: 10.3390/ijms12129108
17. Curtis KA, Rudolph DL, Nejad I, Singleton J, Beddoe A, Weigl B, LaBarre P, Owen SM. Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of HIV-1. *PLoS One.* 2012;7(2):e31432. DOI: 10.1371/journal.pone.0031432
18. Lutz S, Weber P, Focke M, Faltin B, Hoffmann J, Müller C, Mark D, Roth G, Munday P, Armes N, Piepenburg O, Zengerle R, von Stetten F. Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). *Lab Chip.* 2010 Apr 7;10(7):887-93. DOI: 10.1039/b921140c
19. Ahmad F, Hashsham SA. Miniaturized nucleic acid amplification systems for rapid and point-of-care diagnostics: a review. *Anal Chim Acta.* 2012 Jul 6;733:1-15. DOI: 10.1016/j.aca.2012.04.031
20. Zhang Y, Ozdemir P. Microfluidic DNA amplification—a review. *Anal Chim Acta.* 2009 Apr 13;638(2):115-25. DOI: 10.1016/j.aca.2009.02.038
21. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. Geneva: WHO; 2014. ISBN 978 92 4 156480 9. Available from: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
22. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl.* 2008;105(7):A341-55. Geändert/ergänzt im *Dtsch Arztebl.* 2013;110(39):A1822.
23. Rohrman BA, Richards-Kortum RR. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. *Lab Chip.* 2012;12(17):3082-8. DOI: 10.1039/c2lc40423k
24. Horn T, Chang CA, Urdea MS. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec;25(23):4842-9. DOI: 10.1093/nar/25.23.4842
25. Anastassopoulou CG, Touloumi G, Katsoulidou A, Hatzitheodorou H, Pappa M, Paraskevis D, Lazanas M, Gargalianos P, Hatzakis A. Comparative evaluation of the QUANTIPLEX HIV-1 RNA 2.0 and 3.0 (bDNA) assays and the AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5 test for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Virol Methods.* 2001 Jan;91(1):67-74. DOI: 10.1016/S0166-0934(00)00245-7
26. Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004 Aug;5(8):795-800. DOI: 10.1038/sj.embor.7400200
27. Kim J, Easley CJ. Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications. *Bioanalysis.* 2011 Jan;3(2):227-39. DOI: 10.4155/bio.10.172
28. Zahradnik C. Isothermale Amplifikation – Methoden & Anwendungsbereiche. Report of the Department for Agrobiotechnology, IFA-Tulln of the University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Working group Dr. Kurt Brunner. 2012. Available from: <http://www.biotrac.at/en/knowledge-base/biotrac-documents/IsothermaleAmplifikation.pdf>
29. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 1991 Mar;350(6313):91-2. DOI: 10.1038/350091a0
30. Luzziotti N, Knappe S, Richter I, Seidel R. Nicking enzyme-based internal labeling of DNA at multiple loci. *Nat Protoc.* 2012 Mar 8;7(4):643-53. DOI: 10.1038/nprot.2012.008
31. Kim E, Kim S, Kim DH, Choi BS, Choi IY, Kim JS. Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. *Genome Res.* 2012 Jul;22(7):1327-33. DOI: 10.1101/gr.138792.112
32. Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* 1998 Jul;19(3):225-32. DOI: 10.1038/898
33. Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M. Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation-rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res.* 2009 Feb;37(3):e19. DOI: 10.1093/nar/gkn1014
34. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih T, Li HB. Ramification amplification: a novel isothermal DNA amplification method. *Mol Diagn.* 2001 Jun;6(2):141-50. DOI: 10.1054/modi.2001.25323
35. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih TC, Li H. Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe. *Gene.* 1998 May 12;211(2):277-85. DOI: 10.1016/S0378-1119(98)00113-9
36. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992 Apr;20(7):1691-6.

**Korrespondenzadresse:**

Jörg Neukammer  
 Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Abbestr.  
 2-12, 10587 Berlin, Deutschland  
 joerg.neukammer@ptb.de

**Bitte zitieren als**

Neukammer J, Hussels M, Kummrow A, Devonshire A, Foy C, Huggett J, Parkes H, Žel J, Milavec M, Schimmel H, Unger W, Akgöz M, McHugh T, Tomic V, Grunert HP, Zeichhardt H. Survey results on nucleic acid tests of infectious diseases: present status and need for rapid and near-patient diagnostics. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab.* 2014;6:Doc01.

DOI: 10.3205/lab000016, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000160

**Artikel online frei zugänglich unter**

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-6/lab000016.shtml>

**Veröffentlicht:** 11.02.2015

**Copyright**

©2014 Neukammer et al. Dieser Artikel ist ein Open-Access-Artikel und steht unter den Lizenzbedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 License (Namensnennung). Lizenz-Angaben siehe <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.