

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Juni 2018 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik

Zusammenfassung

Der vorliegende Beitrag liefert einen Auswertungsbericht der jüngsten Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT“. Er fasst die Zielwerte, einige Bezugsgrößen und die Gesamtbewertung der Ergebnisse aller teilnehmenden Laboratorien zusammen.

Diese hochwillkommene Versuchsreihe zur externen Qualitätskontrolle (EQAS; *external quality assessment scheme*) von Methoden der molekularen Diagnostik auf dem Gebiet der medizinischen Mikrobiologie wurde 2002 von der *Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie* (DGHM) angestoßen und wird seither von Instand e.V., Düsseldorf, organisiert. Dieses Segment der INSTAND e.V.-Ringversuchsserie wird für diagnostische Laboratorien weltweit angeboten. Unser Ringversuchskonzept entspricht der aktuellen Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiLiBÄK), Teil B3, und basiert auf zwei Validierungsrunden pro Jahr (im Frühjahr und Herbst) unter einer permanent wachsenden Abdeckung der relevanten bakteriellen und fungalen humanpathogenen Erreger. Die entsprechenden Sets von Quality Control (QC)-Proben können dabei neben negativen Proben auch einige stark-positive Proben, Proben mit klinischen Varianten oder eng mit den Zielorganismen verwandte Spezies oder klinische Isolate enthalten. Weitergehende Informationen sowie die statistisch aufgearbeiteten und dokumentierten Ergebnisse der vergangenen Runden dieser Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ können auf der Homepage von Instand e.V. (<http://www.instand-ev.de>) eingesehen werden. Obwohl die bevorzugte Sprache dieser Dokumente deutsch ist, streben wir an, zumindest eine kurze Diskussion der Ergebnisse sowie die wichtigsten wissenschaftlichen Aspekte in Englisch bereitzustellen und die Tabellen zweisprachig zu gestalten.

Udo Reischl¹
Martin Ehenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Michael Baier³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
Holger Scholz⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Roger Dumke⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Agnes Anders⁸

1 Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland

2 Labor Dr. Heidrich und Kollegen MVZ GmbH, Hamburg, Deutschland

3 Institut für Medizinische Mikrobiologie, Klinikum der Friedrich-Schiller Universität Jena, Deutschland

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

6 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Technische Universität Dresden, Deutschland

7 Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP),

Universitätsklinikum Bonn,
Deutschland

8 Nationales Referenzzentrum
für Gram-negative
Krankenhauserreger,
Abteilung für Medizinische
Mikrobiologie, Ruhr
Universität Bochum,
Deutschland

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Nach erfolgreicher Etablierung dieser neuen Ringversuchs-Serie wollen wir hier auch für Kolleginnen und Kollegen, die bisher noch nicht an diesen Ringversuchen teilgenommen haben, die Ergebnisse der aktuellen Ringversuche für den PCR/NAT-gestützten Nachweis von **Neisseria gonorrhoeae**, **Chlamydia trachomatis**, **Bordetella pertussis**, **Helicobacter pylori**, **EHEC/STEC**, **Borrelia burgdorferi sensu lato**, **Legionella pneumophila**, **Salmonella enterica** und **Listeria spp.**, **MRSA** bzw. **cmRSA**, **Chlamydia pneumoniae**, **Mycoplasma pneumoniae**, **Coxiella burnetti**, **Bacillus anthracis**, **Francisella tularensis**, **Brucella spp.**, **Pneumocystis jirovecii** (vorm. **P. carinii**) und der molekularen Resistenztestung für **Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae** sowie die beiden vor kurzem neu ins Programm aufgenommenen Ringversuche zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von **Clostridium difficile (Toxingene)** und **VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken)** darstellen und kurz diskutieren.

Für nähere Informationen über die Zusammensetzung der Ringversuchsproben, dem Sinn und Zweck dieser neuen Möglichkeit zur externen Qualitätskontrolle im Umfeld der Nukleinsäurediagnostik sowie zu den Eckdaten unseres flexiblen Ringversuchskonzepts sei hier auf unsere initiale Veröffentlichung in der Zeitschrift „Der Mikrobiologe“ verwiesen [1]. Gerne werden wir hier auch weiterhin in regelmäßigen Abständen und in ähnlicher Form über die Ergebnislage, Auswertung und Analyse unserer zukünftigen Ringversuche berichten.

Wie bei allen anderen Ringversuchen erfolgt die Anmeldung zu ausgewählten Teilen der Reihe „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ über die Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in Medizinischen Laboratorien (INSTAND e.V.), Düsseldorf (<http://www.instand-ev.de>). Nach Abschluß des jeweiligen Ringversuchs werden die Ergebnisse der einzelnen Teilnehmer dort zentral erfasst und anhand von individuellen Bewertungskriterien werden die schriftlichen Zertifikate erstellt. Zusätzlich stehen für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe weiterer Informationen auch im Internet unter „<http://www.udo-reischl.de>“, Unterpunkt „INSTAND-Ringversuche (PCR/NAT)“, sowie auf der

Homepage von INSTAND e.V. als pdf-Files zum freien Download bereit.

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 19 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „Highlights“. So wurden beispielsweise im aktuellen **RV 530 Chlamydia trachomatis & Neisseria gonorrhoeae** drei Proben mit Mischungen von unterschiedlichen Mengen an *C. trachomatis* und Mengen an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen versandt. Interessanterweise ließ sich auch bei diesen Konstellationen die DNA von *C. trachomatis* im Gemisch mit *N. gonorrhoeae* DNA mit den meisten der kommerziellen und *in-house* PCR-Testsysteme zuverlässig nachweisen.

In einer der 4 Einzelproben des aktuellen Ringversuchs **RV 535: Borrelia burgdorferi** befanden sich relativ hohe Mengen der Spezies **Borrelia bisettiae**. Offenbar bereitete der zuverlässige PCR-gestützte Nachweis dieser dem *B. burgdorferi sensu lato*-Komplex zugehörigen Spezies nur einem sehr geringen Teil der Teilnehmer (bzw. den von ihnen eingesetzten Testsystemen) gewisse Probleme. Etwas Hintergrundinformation zu dieser Borrelien-Spezies finden Sie in dem ringversuchsspezifischen Teil dieser Diskussion.

Mit der Auswahl eines etwas breiteren Spektrums von relevanten Carbapenemase-Genen bestätigte sich im Rahmen des Ringversuchs **RV 544 Carbapenemase-Gene** erneut die Vermutung, dass viele der derzeit verwendeten kommerziellen sowie *in-house* Testsysteme zur molekularen Carbapenemase Detektion noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase-Genen aufweisen. Im aktuellen Ringversuch scheint dies insbesondere für Isolate mit IMP-1 zu gelten. Das *Klebsiella pneumoniae* Isolat mit IMP-1 wurde lediglich von 71 der insgesamt 88 Teilnehmer detektiert. Im Umfeld der molekularen Testung von Carbapenemase-Genen unterstützt uns ja Frau Dr. Agnes Anders vom Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger in Bochum weiterhin bei der Auswahl von relevanten aber auch „interessanten“ klinischen Isolaten. Alle Teilnehmer sind natürlich weiterhin dazu aufgerufen, attraktive Parameter für eine zukünftige Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen vorzuschlagen und deren

mögliche Umsetzung mit dem Ringversuchsleiter zu diskutieren.

Aktueller **Hinweis auf neue Ringversuche**: Aufgrund einiger Anfragen aus dem Teilnehmer- und Kollegenkreis haben wir zwei zusätzliche Ringversuche etabliert, die nach erfolgreichen Probe-Ringversuchsrunden in 2018 dann auch möglichst zeitnah in das reguläre Portfolio „Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. übernommen werden sollen:

- Der Ringversuch **RV 543: *Francisella tularensis*** wurde in der aktuellen Aussendung bereits um den Zielorganismus ***Brucella spp.*** erweitert und wird zukünftig routinemäßig als kombinierter Ringversuch angeboten.
- Für die externe Qualitätssicherung zukünftig kommerziell verfügbarer (und damit wohl auch vermehrt eingesetzten) **PCR/NAT-gestützten Nachweisverfahren für Urogenital-Infektionen** haben wir mit der aktuellen Aussendung bereits einen neuen Ringversuch **RV 547 „Urogenital-Panel“** etabliert, der vom Konzept her jeweils einige der nachfolgenden Erreger in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen innerhalb des 4er-Panels enthält:
Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis und ggf. ***Treponema pallidum***.

Vorab auch noch eine Anmerkung zu den statistisch ermittelten und in den jeweiligen Tabellen 3 aufgeführten Leistungsdaten von kommerziellen PCR/NAT Testsystemen. Auffällig bei vielen der aktuellen aber auch bei einigen der früheren Ringversuche ist das unterschiedlich gute Abschneiden von Teilnehmern mit ein und demselben kommerziellen, vorkonfektionierten und teilweise auch automatisierten und/oder kartuschenartig geschlossenen Testsystemen.

Die meisten dieser Assays sind zudem auch noch IVD zertifiziert – mit allen aufwändigen herstellerseitigen Vorkehrungen zur möglichst zuverlässigen Durchführung und standardisierten Ergebnisinterpretation. Die auffällige „Streuung der Performance“ (bzw. das Auftreten einzelner Ausreißer) unterstreicht umso mehr die Bedeutung der aktuell vorgegebenen Qualitätsstandards, wie beispielsweise das regelmäßige Mitführen von geeigneten Extraktions-, Positiv- und Negativ-Kontrollen sowie Schulungen und kontrollierte Maßnahmen zur Vermeidung von exogenen Kontaminationsmöglichkeiten in PCR/NAT-Arbeitsbereichen, die u.a. im Rahmen der aktuellen RiLiBÄK, der Akkreditierung und der praxisorientiert verfassten MIQ-1 gefordert werden. Deren Sinnhaftigkeit und Stringenz mag aus Anwendersicht ja gelegentlich bezweifelt werden, wird aber in diesen Ringversuchsrunden (sozusagen von neutraler Warte aus) dennoch immer wieder aufs Neue bestätigt.

Neben den überaus motivierten und engagierten Mitarbeitern der verschiedenen Sollwert-Laboratorien unterstützen uns bei der Konzeption und Auswertung der zahlreichen Ringversuche zum Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT noch zahlreiche Kolleginnen und

Kollegen aus unserem Hause. Allerherzlichsten Dank für ihre spontane Bereitschaft sowie ihr ehrenamtliches Engagement für unsere gemeinsamen Bemühungen zur externen Qualitätssicherung molekularbiologischer Nachweisverfahren in der infektiologischen Diagnostik.

Untersuchungsergebnisse Juni 2018

Entsprechend des Grundgedankens unserer Ringversuchsaktivitäten wurde auch bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum „Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)“ bei einigen Zielorganismen der Versand von Proben mit relativ niedrigen Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1815303), *Bordetella pertussis* (Probe # 1815324), *Salmonella enterica* ser. Typhi (Probe # 1815373), *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 1815414), *Coxiella burnetii* (Probe # 1815423), *Ureaplasma parvum* (Probe # 1815474) sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1815603).

Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen. An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, dass zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind, und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten „grenzwertig positiven“ Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von „durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten“ eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (z.B. 50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR-Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

Bei den meisten Probenmaterialien der aktuellen Ringversuchsrunde stellen falsch-negative Ergebnisse damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar.

Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung und/oder auf mangelnde Spezifität der eingesetzten Testsysteme zu betrachten.

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Tab. 1 (Anhang 1) zeigt dabei die Probenzusammen-

setzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tab. 2 (Anhang 1) nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen, und in Tab. 3 (Anhang 1) nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse, sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikations-system bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt.

Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum „Gelegenheitsanwender“ abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten, und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen, zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR-Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR-Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: <http://www.udo-reischl.de>; Unterpunkt „Auswertung der Ringversuche“ und natürlich auch über die Homepage von INSTAND e.V. (<http://www.instand-ev.de>) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion sowie deren tatkräftige Unterstützung bei der Konzeption und dem Aufbau neuer Ringversuche bedanken.

RV 530: *Neisseria gonorrhoeae* & *Chlamydia trachomatis*

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Ringversuchen zum kombinierten NAT-gestützten *C. trachomatis*- und Gonokokken-Nachweis. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit einer relativ hohen Menge an *C. trachomatis* (# 1815304, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL), und zwei Proben mit einer 10-fach niedrigeren Menge an *C. trachomatis* (# 1815302 und # 1815303, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL). Eine Probe (# 1815302) war dabei zugleich mit ca. 5×10^5 CFU/mL an *N. gonorrhoeae*, eine Probe mit einer 10-fach niedrigeren Mengen an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen (# 1815304; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) und eine der *C. trachoma-*

tis-positiven Proben mit einer relativ geringer Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen (# 1815303; $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL) versetzt.

Trotz der relativ geringen Erregermenge in manchen der vier unterschiedlich zusammengesetzten positiven Proben und der gleichzeitigen Anwesenheit von *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* DNA führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysensysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive, als auch für negative Befunde.

Der Übersichtlichkeit halber werden wir bei diesem kombinierten Ringversuch (CT/NG) die Ergebniskonstellation zukünftig **7 getrennten Tabellen** (Anhang 1, S. 1–4) darstellen. Damit wird die diagnostische Performance der jeweiligen Testsysteme beim Nachweis von CT und NG aussagekräftiger (Tabelle 4: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei CT, Tabelle 6: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei NG; jeweils gefolgt von den Richtigkeitsquoten nach aufgeführten Testsystemen in den Tabellen 5 und 7).

Auch wenn die schwächer positiven Proben # 1815302 und # 1815303 des aktuellen Ringversuchs nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden waren, fanden sich unter den von insgesamt 258 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* erfreulicherweise keine falsch-negativen Ergebnisse. Bei der ca. 10-fach stärker CT-positiven Probe # 1815304 des aktuellen Ringversuchs wurde lediglich von einem der 258 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die drei positiven Proben # 1815302, # 1815304 und # 1815303 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^5 , 1×10^4 , bzw. 5×10^2 CFU/mL) diesmal von 4 der insgesamt 256 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse und von 15 Teilnehmern falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken DNA mitgeteilt. Auffällig war die Häufung von falsch-negativen Ergebnissen ($n=14$) bei Probe # 1815303, die neben einer relativ geringen Menge an Gonokokken zugleich signifikante Mengen an *C. trachomatis* infizierten Zellen enthielt. Wie bereits bei einigen früheren Ringversuchsrunden beobachtet, sind offenbar einige der im Teilnehmerkreis eingesetzten kommerziellen und *in-house* PCR/NAT Testsysteme etwas störanfällig was den sensitiven Nachweis von Gonokokken bei gleichzeitiger Anwesenheit von *C. trachomatis* betrifft. Da sich das hier beobachtete „Sensitivitätsproblem“ offensichtlich nicht auf bestimmte Testkonzepte eingrenzen lässt und sich sporadisch durch das ganze Portfolio der eingesetzten Testsysteme zieht, kann dem großen Rest des Teilnehmerfeldes erneut eine erfreulich gute analytische Sensitivität und Spezifität ihrer CT- und GO-spezifischen NAT Testsysteme, sowie der angewandten Prozeduren zur Probenaufarbeitung und -prozessierung attestiert werden. Aufgrund der relativ geringen Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen in Probe # 1815303 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden

grau schraffierten Felder in Tab. 2 (Anhang 1, Seite 1) und Tab. 6 (Anhang 1, Seite 3) gekennzeichnet.

Bei den insgesamt lediglich 4 für GO falsch-positiven Ergebnissen handelt es sich vermutlich um isolierte Kontaminationsereignisse oder Ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“, da von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen hier durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden.

Angesichts der streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen bleibt es für den Ringversuchsleiter jedes Mal aufs Neue verwunderlich, dass ein nennenswerter Anteil der teilnehmenden Laboratorien mit den betroffenen Testsystemen erfolgreich die vorgegebenen Zielwerte erreicht. Ohne denjenigen Teilnehmern, die mit bestimmten kommerziellen Testsystemen die Zielwerte nicht erreichen, zu nahe treten zu wollen, deutet dieser Umstand in diesen Fällen dann wohl eher auf individuelle Abweichungen vom Protokoll oder bestimmte Fehler bei der Probenabarbeitung, als auf intrinsische Unzulänglichkeiten, der in der Regel gut evaluierten Testsysteme hin.

Ich glaube, es ist auch für den Leser dieser Ringversuchsdiskussion weitgehend nachvollziehbar, dass wir als Organisatoren von Testkonzept- und Testplattform-übergreifenden Ringversuchen bei der Konfektionierung unserer Probenmaterialien leider nicht jede Besonderheit im Abarbeitungsprotokoll von kommerziellen Testsystemen berücksichtigen oder unterschiedliche Arten von Ringversuchsprounmaterial für bestimmte Testsysteme bereitstellen können.

Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproun primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen, wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden, von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden sowohl die *C. trachomatis* als auch die *Neisseria gonorrhoeae* Zielorganismen von fast allen der 7 Teilnehmer mit RNA-basierten Gen-Probe Testsystemen in den beiden höherer Menge an Zielorganismen erfolgreich nachgewiesen und die entsprechenden Zertifikate erlangt.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von 257 der insgesamt 258 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS AmpliCor, COBAS TaqMan, dem

Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in Tab. 3 (Anhang 1, S. 2) nicht zwischen dem spezifischen Nachweis von Chlamydien und Gonokokken differenziert wurde. Mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme wurden insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Um eine detaillierte Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen, wurden diesmal zusätzlich die Tabellen 4 bis 7 (Anhang 1, S. 2–4) angefertigt. In den Tabellen 4 und 5 sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in den Tabelle 6 und 7 nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet.

Anmerkung: Bevor durch einen kurzen Blick auf die prozentualen Richtigkeitsquoten in diesen Tabellen ein eventuell etwas zu voreiliger Rückschluss auf die diagnostische „Performance“ bestimmter kommerzieller Testsysteme gezogen wird, sollten erst die effektiven Teilnehmerzahlen berücksichtigt werden, die den dargestellten Richtigkeitsquoten arithmetisch zugrunde liegen.

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: BD Max CT/GC/TV assay (11x), HAIN Lifescience FluoroType CT/NG (4x), QIAGEN artus CT/GC QS-RGQ Kit (4x), Urethritis basic/plus von fast-track Diagnostics (5x), Seegene Allplex STI Essential Assay (4x), Seegene Allplex Genital ulcer Assay (1x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (3x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (3x), BIORON RealLine single und multiplex CT/NG Kits (3x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae* Real-TM (3x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (3x), Seegene Anyplex™ II STI-7 Detection (3x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (2x), EUROIMMUN Euroarray STI-11 (2x), AmpliSens *C. trachomatis*-FRT PCR Kit (1x), AmpliSens *N. gonorrhoeae*-screen-FRT PCR Kit (1x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* (s-DiaGono) (1x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (2x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (1x), Mikrogen ampliCube STD1 (1x), Mikrogen FTD Urethritis plus (1x), Aptima Combo 2 assay CT/GC (2x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), VIASURE sexually transmitted diseases RT PCR Detetion Kit (1x), DiagCor GenoFlow STD array test kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID RDB2110 STD (1x) und Liferiver *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* Real Time PCR Kit (1x).

Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems soll in diesem Zusammenhang auch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in Gegenwart von relativ hohen Mengen an Zielorganismen (bzw. deren Nukleinsäure) die interne Kontrollreaktion aufgrund der „Konkurrenzsituation“ mit der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz durchaus negativ ausfallen kann, obwohl keine Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Das Probenet des aktuellen Ringversuchs enthielt diesmal zwei Proben mit ca. 5×10^5 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1815312 und # 1815314), eine Probe mit ca. 5×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1815311), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1815313), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tab. 2 (Anhang 1, S. 5) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den 83 Teilnehmern bei der *C. trachomatis*-negativen Probe # 1815313 sechs falsch-positive Ergebnisse und bei den drei *C. trachomatis*-positiven Proben (# 1815311, # 1815312 und # 1815314) diesmal insgesamt 3 falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt.

Die markante Übereinstimmung der aktuellen Ergebniskonstellation mit den Beobachtungen und hervorragenden Richtigkeitsquoten vorhergegangener Ringversuche mit ähnlicher Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen kann erneut als Beleg für eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz der eingesetzten Testsysteme sowie der aktuellen Kits und automatisierten Testplattformen zur Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Prozessierung angesehen werden. Bei den 6 falsch-positiven CT Ergebnissen für Probe # 181513 handelt es sich vermutlich um Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung der gleichzeitig prozessierten CT-positiven Proben. Den betroffenen Laboratorien sollten diese Ergebnisse Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Auch wenn mit ca. 5×10^4 IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial (Probe # 1815311) die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht erreicht oder unterschritten sein sollte, stehen mit den Rückstellproben des Ringversuchs RV 531 Juni 2018 den Teilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität wieder geeignete Sets zur Überprüfung und Optimierung ihrer jeweiligen NAT-gestützten Testsysteme zur Verfügung. Angesichts der nach wie vor anhaltenden Diskussion um das „Pooling“ von entsprechendem Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

Inhibitionskontrollen wurden von allen der insgesamt 83 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal von keinem der Teilnehmer beobachtet. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in-house*-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich

die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf erfreulich hohem Niveau.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (4x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (3x), BD Max CT/GC/TV assay (2x), Seegene Allplex STI Essential Assay (1x), Sansure Biotech *C. trachomatis* DNA Fluorescence Diagnostic Kit (1x), Autoimmun Diagnostika RDB2135 CAP Bakterien (1x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (1x), VIASURE sexually transmitted diseases RT PCR Detection Kit (1x), Genetrac DK-CHT *C. trachomatis* DNA Detection Kit (1x) und EUROIMMUN Euroarray STI-11 (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei positive Proben mit einer hohen und einer etwa 100-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 1815321 mit 10^6 CFU/mL und # 1815324 mit 10^4 CFU/mL an *B. pertussis*), sowie eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella parapertussis* als verwandte Spezies (# 1815322 mit 10^5 CFU/mL). Probe # 1815323 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis* DNA führte auch diesmal wieder zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben. Von 9 der insgesamt 167 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1815322 (*B. parapertussis*) mitgeteilt. Hierbei handelt es sich offensichtlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Auch eine mangelnde Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme ist bei dieser Konstellation denkbar.

Unter den übrigen PCR/NAT-Ergebnissen befanden sich zudem 38 falsch-negative und 2 als „fraglich“ klassifizierte Ergebnisse für die relativ schwach positive Probe # 1815324 (1×10^4 CFU/mL an *B. pertussis*).

Inhibitionskontrollen wurden von 166 der insgesamt 167 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Bei einer Menge von 10^4 CFU/mL an *B. pertussis* Zielorganismen (entspricht ca. 10^3 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ l) nähert man sich offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1815324 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die grau schraffierten Felder in Tab. 2 Anhang 1, S. 6) gekennzeichnet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions-

und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 87 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 12 Teilnehmern die Verwendung der Pertussis Toxin Gen und von 4 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType oder Genoquick *Bordetella* (11x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (6x), Seegene Anyplex II RB5 Detection (1x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Altona diagnostic RealStar *Bordetella* PCR Kit (5x), Mikrogen ampliCube (2x), Attomol *Bordetella* Realtime LT (2x), fast-track Diagnostics *Bordetella* (2x), ARGENE *Bordetella* r-gene (3x), BioGX *Bordetella* PCR Kit (2x), Sacace Biotechnologies *B. pertussis* / *B. parapertussis* / *B. bronchiseptica* Real-TM (2x), Meridian Bioscience illumigene Pertussis (2x), Bio-Evolution RT PCR kit *B. pertussis/parapertussis* (2x), AmpliSens *Bordetella* multi FRT PCR Kit (1x), Ingenetix Bacto Real *B. pertussis/B. parapertussis* (1x), DiaSorin Simplexa *Bordetella* direct Kit (1x), QUIDEL AmpliVue *Bordetella* Assay (1x), VIASURE *Bordetella* Real Time PCR Detection Kit (1x) und PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 7) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine positive Probe eines Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1815333; 5×10^4 CFU/ml) und eine positive Probe eines Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* (# 1815331; 5×10^4 CFU/ml). Probe # 1815334 enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Campylobacter jejuni* ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml) und Probe # 1815332 ausschließlich humanes Zellmaterial zusammen mit einer nennenswerten Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden beide *H. pylori*-haltigen Proben (# 1815331 und # 1815333) von nahezu allen der insgesamt 53 Teilnehmer als richtig-positiv bewertet. Wie bereits in den letzten Ringversuchen bestätigte sich auch hier wieder die Verfügbarkeit von sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemem mit hoher analytischer Sensitivität. Im aktuellen Ringversuch wurde zudem die analytische Spezifität der verwendeten Testsysteme durch die Probe # 1815334 überprüft, welche mit *Campylobacter jejuni* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) eine mit dem Zielorganismus *Helicobacter pylori* verwandte Spezies enthielt. Auch für diese Probe wurden erfreulicherweise lediglich bei zwei der insgesamt 53 Teilnehmer falsch-positive PCR/NAT-Ergebnisse durch mangelnde Spezifität oder Kreuzreaktionen beobachtet. Dabei könnte es sich natürlich auch um laborinterne Kontaminationsereignisse oder Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und sequenziellen Abarbeitung gehandelt haben.

Inhibitionskontrollen wurden von 52 Teilnehmern durchgeführt und Inhibitionsergebnisse wurden hier nicht beobachtet. Sowohl die kommerziellen, als auch die eigenentwickelten Testsysteme schnitten im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab. So erreichten die *in-house* Testsysteme wie auch die kommerziellen Assays Richtigkeitsquoten von annähernd 100%, was die richtigen Ergebnisse betrifft. Auch bei den richtig-negativen Ergebnissen waren keine signifikanten Unterschiede in den Richtigkeitsquoten von *in-house* Testsystemen und kommerziellen Assays auszumachen.

Bis auf 38 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 2 x Light-Mix *Helicobacter* Kit von TIB Molbiol angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in-house* Testsysteme. Wie in der Testbeschreibung des RV 533 vermerkt, konnten die Teilnehmer auf freiwilliger Basis auch die vermeintliche Clarithromycin-Resistenz der untersuchten *H. pylori*-Isolate mitteilen. Diese Spezialuntersuchung zur molekularbiologischen Resistenztestung erfolgt in der Regel über die Amplifikation und Sequenzierung von charakteristischen Bereichen, innerhalb der *H. pylori* 23S rDNA bzw. der Sequenzanalyse dieses Genombereichs, mittels Hybridisierungssonden. Ergebnisse wurden hier von 47 der insgesamt 53 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme von drei Teilnehmern waren die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

RV 534: EHEC/STEC

Wie auch bereits bei den vorhergegangenen Runden dieses Ringversuchs mehrfach diskutiert, besteht die eigentliche Herausforderung bei dem Nukleinsäure-gestützten Nachweis von EHEC/STEC prinzipiell nicht so sehr in dem Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen, sondern vielmehr in der differenzierten Analyse und der Typisierung unterschiedlicher Shiga-Toxin-Genen und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolyisin kodierende *hlyA*-Gen).

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge eines EHEC:O157 Isolats (# 1815343; ca. 1×10^6 CFU/mL; *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, und *hlyA*-positiv), eine Probe mit etwas geringerer Menge dieses EHEC Isolats (# 1815344, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und eine Probe mit 1×10^4 CFU/ml eines EPEC Isolats (# 1815341; *eae*-positiv!). Probe # 1815342 enthielt einen *E. coli* K12 Stamm (*eae*- und *hlyA*-negativ).

Abgesehen von der etwas schwächer positiven EPEC Probe # 1815341 (mit ca. 10^4 CFU/ml) führte die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten – sowohl für positive als auch für negative Befunde. Zudem waren in der aktuellen Runde des

EHEC PCR-Ringversuchs auch keine Isolate mit „exotischen“ Varianten der Shiga-Toxin-Gene vertreten.

Die beiden EHEC-positiven Proben # 1815343 und # 1815344 wurden problemlos von allen der insgesamt 140 Teilnehmer auch als solche erkannt und im Ergebnisformular als richtig-positiv berichtet. Bekanntlich steht ja die Abprüfung der analytischen Sensitivität bei diesem Ringversuch nicht so sehr im Fokus, da in den meisten der teilnehmenden Laboratorien ein NAT-gestützter Nachweis von Shiga-Toxin-Genen im Umfeld der EHEC-Diagnostik primär als Kulturbestätigungstest eingesetzt wird. Bei zukünftigen Ringversuchen werden wir uns bemühen dass die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten und der Schwerpunkt somit auf einer Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme liegt und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze. Die Probe # 1815342 (*E. coli* K12 Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde erfreulicherweise von allen Teilnehmern korrekt als negativ für EHEC/STEC berichtet.

Das EPEC Isolat in Probe # 1815341 (*E. coli* K12 Stamm, *eae*-positiv, *hlyA*-negativ) wurde von 139 der insgesamt 140 Teilnehmer korrekterweise als negativ befundet. Lediglich ein Teilnehmer berichtete hier ein positives PCR-Ergebnis für EHEC. Eventuell handelte es sich hier auch lediglich um eine Misinterpretation eines positiven PCR-Nachweis des *eae*-Gens.

Neben *in-house* Testsystemen, mittlerweile auch oft als LDT (*lab developed tests*) bezeichnet, werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle Assays eingesetzt. In den Richtigkeitsquoten zeigte sich keine Über- bzw. Unterlegenheit eines Systems, was für die breite Etablierung PCR-/NAT-gestützter Testsysteme spricht. Inhibitionskontrollen wurden von 139 der 140 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsereignisse wurden in keinem Fall beobachtet. Zudem wurden von 120 Teilnehmern die differenzierten Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, Großteils korrekt. Lediglich zwei Teilnehmer berichteten bei der Subtypisierung falsche Ergebnisse.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: BD Max Enteric Bacterial Panel (6x), TIB Molbiol LightMix modular *stx*-1/*stx*-2/*eae* (4x), Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Bacteria II Assay (4x), Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (3x), Amplex eazyplex EHEC complete (3x), Sacace Biotechnologies EHEC Real-TM (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), fast-track Diagnostics (1x), Biomerieux BioFire GI Panel (1x), Mikrogen ampliCube (1x) und VIASURE *E. coli* Real Time PCR Detection Kit (1x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Nachdem die Probenauswahl des letzten Ringversuchs mehr auf die analytische Sensitivität der eingesetzten Testsysteme abzielte, wollten wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Prüfung der analytischen Spezifität fokussieren.

Daher wurden bei der Konzeption des Ringversuchs diesmal drei unterschiedliche *Borrelia*-Spezies an die Teilnehmer versandt. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit ca. 5×10^5 Organismen/mL an *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (# 1815353), eine Probe mit ca. 5×10^5 Organismen/mL an *Borrelia garinii* OspA Typ 3 (# 1815352) und eine Probe mit ca. 51×10^5 Organismen/mL an *Borrelia bissettiae* (# 1815354). Probe # 1815351 enthielt lediglich signifikante Mengen eines *E. coli* K12 Stammes.

Nochmals eine **kurze Rekapitulation**: Schon die Tatsache, dass mittlerweile mehr als 20 verschiedene, dem *B. burgdorferi sensu lato*-Komplex zugehörigen Spezies beschrieben sind impliziert erhebliches Problempotential für den PCR-/NAT-gestützten Nachweis von *B. burgdorferi*. *B. garinii* ist eine seit langem bekannte, gesichert humanpathogene Spezies die weit verbreitet in Europa und Asien vorkommt und häufig bei disseminierten Infektionen gefunden wird. Dagegen ist die Datenlage für *B. bissettiae* (noch) sehr begrenzt. Diese Spezies konnte in den USA aus Zecken mittels Kultur und PCR nachgewiesen werden, Erkrankungsfälle sind nicht bekannt. In Europa findet sich diese Spezies extrem selten in Zecken (bislang nur mittels PCR) oder Patientenproben. Allerdings steht ein Isolat aus Liquor (Deutschland, Neuroborreliose) zur Verfügung, das einzige gesichert dieser Spezies zuzuordnende Patientenisolat weltweit. Nachdem bei eigenen Untersuchungen zur Sensitivität verschiedener Amplifikationsprotokolle der Nachweis dieser Spezies z.T. erhebliche Probleme bereitete, ist das Ergebnis des vorliegenden Ringversuchs – von 119 der insgesamt 122 Teilnehmer richtig positiv befundet – besonders erfreulich.

Einmal mehr muss in diesem Zusammenhang vor der nicht zu empfehlenden Untersuchung von Zecken um daraus eine Therapieindikation abzuleiten gewarnt werden: Abgesehen davon, dass die Studienlage keinen signifikanten Informationsgewinn für die Patientenversorgung erwarten lässt, sind diese Untersuchungen ohne weitergehende Identifikation der nachgewiesenen Spezies schlicht als gefährlich für den Patienten einzustufen, da die Angabe „*B. burgdorferi* s.l. nachgewiesen“ grundsätzlich auch nicht-humanpathogene Arten mit einschließt. Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen: Alle der 122 Teilnehmer berichteten diesmal ein korrekt positives PCR/NAT-Ergebnis für die *Borrelia burgdorferi sensu stricto*-positive Probe # 1815353 ($\sim 5 \times 10^5$ Organismen/mL) und ein korrekt negatives PCR/NAT-Ergebnis für die negative Probe # 1815351.

Der zuverlässige Nachweis von *Borrelia garinii* in der Probe mit relativ hoher Erregerlast (# 1815352 mit $\sim 5 \times 10^5$ Organismen/mL) bereitete ebenfalls nahezu keinem der 122 Teilnehmer signifikante Probleme. Da hier

von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den 3 falsch-negativen Ergebnissen und dem von einem Teilnehmer als „fraglich“ klassifizierten Ergebnis vermutlich um Ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“.

Probe # 1815354 mit ca. 5×10^5 *Borrelia bisettiae*-Zielorganismen/mL wurde von 119 (97%) der Teilnehmer als richtig positiv erkannt und lediglich 3 Teilnehmer berichteten ein falsch-negatives oder ein als „fraglich“ klassifiziertes Ergebnis. Bei der letztgenannten Probe sollten falsch-negative Ergebnisse den betroffenen Teilnehmern jedoch Anlass zur gelegentlichen Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Möglicherweise ist hier die Gesamtsensitivität des analytischen Workflows und/oder die Spezifität bzw. Abdeckung der unterschiedlichen Borrelien-Spezies des verwendeten PCR-NAT Assays unzureichend.

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse der PCR-Reaktion wurden im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie bei den vorhergehenden Ringversuchsrunden haben auch diesmal wieder ungefähr knapp die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet, kommerzielle Testsysteme wurden von 74 der 122 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen (Sensitivität zwischen 97 und 100%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 94%) zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den insgesamt 5 falsch-negativen Ergebnissen für die Proben # 1815352 (*B. garinii*) und # 1815354 (*B. bisettiae*) 4 davon durch *in-house* Testsysteme generiert wurden. Gegebenenfalls sollte also die Sensitivität und/oder Spezifität der haus-eigenen Testsysteme überprüft werden.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (3x), Demeditec GenFlow *Borrelia plus PCR* (3x), BIORON RealLine *Borrelien Kit* (2x), Mikrogen alphaCube *Borrelia* (2x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (2x), Attomol *B. burgdorferi* Realtime LT (2x), Sacace Biotechnologies *B. burgdorferi* Real-TM (2x), EliGene *Borrelia LC* von Elisabeth Pharmacoon (2x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (1x) und VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

Vorab ein kurzer der Hinweis: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Legionella pneumophila* aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Er ist daher NICHT für die Abprüfung von immunologischen Direktnachweisverfahren wie *L. pneumophila* SG1 Urin-Antigen Testen o.ä. geeignet. Einzelne Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets können daher typischerweise auch relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal nur eine positive Probe, # 1815364, die mit einer Menge von ca. 1×10^4 CFU/mL an *Legionella pneumophila*-Sero-Gruppe 2 versetzt war, und zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Legionella hackeliae* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in Probe # 1815362 und $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL in Probe # 1815363). Probe # 1815361 enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*.

Die relativ stark positive Probe # 1815364 mit ca. 1×10^4 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG2 wurde dabei von von 120 der insgesamt 126 Teilnehmer korrekterweise als positiv befundet.

Auch die „richtig negative“ Probe # 1815361 (nur *E. coli*) wurde diesmal erfreulicherweise von nahezu allen Teilnehmern als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Lediglich ein Teilnehmer berichtete bei dieser Probe ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila*. Hier sollten mögliche laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der individuellen Probenextraktion und -abarbeitung ggf. kontrolliert und bestmöglich korrigiert werden. Im Umkehrschluss sollten die 5 Teilnehmer, der die *L. pneumophila* positive Probe # 1815364 fälschlicherweise als negativ befundet haben, die analytische Sensitivität ihrer *L. pneumophila*-spezifischen PCR/NAT-Testsysteme und die entsprechenden Arbeitsabläufe zur Probenaufarbeitungs- und Template-DNA Präparation überprüfen.

Die beiden anderen Einzelproben des ausgesandten Sets, die diesmal mit unterschiedlichen Mengen an *Legionella hackeliae* ($\sim 1 \times 10^3$ und $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) versetzt waren, wurden ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren *L. pneumophila*-spezifischen PCR-/NAT-Testsystemen korrekt als negativ befundet. Hier berichteten nur 6 bzw. 5 der insgesamt 126 Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila* DNA, was auf eine Kreuzreaktion bzw. mangelnde Speziespezifität der Zielsequenz zurückzuführen sein dürfte. Vor allem *in-house* real-time PCR Protokolle mit ribosomalen Zielsequenzen zeigten in der Vergangenheit immer wieder Probleme bei der

Speziesspezifität. Bei einer anzunehmenden sequenziellen Abarbeitung der 4 Einzelproben sollte zumindest diesmal die Wahrscheinlichkeit einer Verschleppung von *L. pneumophila* positivem Material aus der Probe 4 in Reaktionsansätze der Proben 1 bis 3 relativ gering sein. Geeignete Inhibitionskontrollen wurden von 125 Teilnehmern durchgeführt und signifikante Inhibitionsereignisse wurden offenbar nicht beobachtet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 83 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Signifikante Unterschiede bezüglich der analytischen Sensitivität zwischen kommerziellen und selbstentwickelten Testsystemen (von 45 Teilnehmern verwendet) fanden sich nicht. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (8x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), fast-track Diagnostics FTD Atypical CAP (5x), fast-track Diagnostics FTD Bacterial pneumonia CAP (3x), ARGENE Legio/Cc r-gene (4x), GeneProof *L. pneumophila* PCR Kit (4x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (3x), Biolegio Atypical Pneumonia-1 Assay (2x), Sacace Biotechnologies *L. pneumophila* Real-TM (2x), Mikrogen Diagenode Legionella (2x), Mikrogen ampliCube Respiratory Panel 1(1x), Gerbion diarella Legionella und PanLegionella real time PCR Kit TM (1x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x), Vircell Speed-oligo *Legionella* (1x), Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (1x), BioMerieux real-time PCR R-gene Kit (1x), AnDiatec Quidel *L. pneumophila* (1x), ELITech-Group *L. pneumophila* Q-PCR Alert Amplimix (1x), AmpliSens *Legionella* FRT (1x) und VIASURE *L. pneumophila* Real Time PCR Detection (1x).

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1815371; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1815374; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), sowie eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (#1815373; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL). Die vierte Probe des Sets (# 1815372) enthielt keine Zielorganismen sondern ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei 2 der 4 Proben des aktuellen Ringversuchssets zu tadellosen Richtigkeitsquoten von 100%. Vier von insgesamt 30 Teilnehmern berichteten ein falsch-negatives Ergebnis bei Probe #1815374, die ca. 5×10^3 CFU/mL an Salmo-

nellen enthielt. Bezüglich der analytischen Sensitivität wurde es erst bei Probe #1815373 ($\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL) „interessant“. Nur mehr 17 der 30 Teilnehmer berichteten hier ein positives Ergebnis. Aufgrund der relativ geringen Menge an *Salmonella enterica* Zielorganismen in Probe #1815373 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist durch die beiden grau schraffierten Felder in Tab. 2 (Anhang 1, S. 11) gekennzeichnet.

Auch in vorausgegangenen Ringversuchen waren bei relativ niedrigen Erregerlasten immer wieder falsch-negative Ergebnisse berichtet worden, was im Einzelfall bzw. bei hohen Ansprüchen der jeweiligen Teilnehmer an die Sensitivität ihres individuellen PCR/NAT-gestützten Analyseverfahrens eine Überprüfung der eingesetzten Testsysteme nach sich ziehen sollte.

Da in der aktuellen Ringversuchsrunde keine falsch-positiven Befunde für die negative Probe #1815372 (unmittelbar nach der hochpositiven Probe innerhalb des Probensets) mitgeteilt wurden, deutet dies, im Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden, auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse wurden für keine der Proben berichtet. Kommerzielle Testsysteme kamen in 21 Fällen, selbstentwickelte Testsysteme in 9 Fällen zum Einsatz. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: BD Max Enteric Bacterial Panel (4x), TIB Molbiol LightMix Modular (2x), fast-track Diagnostics (1x), Mikrogen Diagenode Gastroenteritis Bacteria Panel I (1x), Mikrogen ampliCube Gastroenteritis Bacteria Panel I (1x) und Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Bacteria 2 Assay (1x).

In enger Abstimmung mit unserem Sollwert-Laboratorium (Dr. U. Busch, Dr. U. Messelhäuser, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim) werden wir weiterhin versuchen, ab und an ein etwas exotischeres Serovar von *Salmonella enterica* zu versenden und zumindest eine der 4 Proben mit einer relativ geringen Menge an Zielorganismen zu versetzen – auch wenn im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften und/oder Richtlinien der einzelnen Fachgesellschaften derzeit noch keine genauen unteren Nachweisgrenzen für den NAT-gestützten Salmonellen-Nachweis festgelegt wurden.

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener

Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden, wie in dieser Ringversuchsrunde, auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein – so wie im Fall der Probe # 1815381, die diesmal ca. 5×10^4 CFU/mL an *Listeria ivanovii* enthielt. Probe # 1815384 des aktuellen Sets enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 5×10^3 CFU/mL), die erfreulicherweise von allen der insgesamt 42 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Erfreulicherweise wurden auch die Probe #1815382 und die Probe #1815383, welche ausschließlich humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielten, von allen Laboratorien korrekterweise als „negativ“ befundet, was erneut für eine sehr gute Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden Laboratorien spricht.

Wie bereits in vorangegangenen Ringversuchsrunden wurden von den Teilnehmern ganz überwiegend *Listeria monocytogenes*-spezifische Testsysteme eingesetzt (n=38). Dies spiegelte sich in der Probe #1815381 wider, welche eine signifikante Menge an *L. ivanovii* (5×10^4 CFU/mL) enthielt. Vier der insgesamt 42 Teilnehmer mit explizit *Listeria* spp.-spezifischen Testsystemen berichteten diese Probe korrekt als positiv. Im Umkehrschluß spricht diese Datenlage jedoch für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung: hält ein Teilnehmer lediglich ein **L. monocytogenes-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben, und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Von allen 42 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsergebnisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchproben wurden nicht beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Sacace Biotechnologies *L. monocytogenes* Real-TM (2x), fast-track Diagnostics Real Time Neonatal sepsis (2x), Liferiver *L. monocytogenes* Real Time PCR Kit (1x), VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *E.coli* Real Time PCR Detection (1x), Biologix Meningitis Panel-1 (1x), Biomerieux BioFire FILMARRAY Meningitis/Encephalitis Panel (1x) und QIAGEN mericon *Listeria* spp Kit (1x).

RV 539: MRSA

Zuerst einmal, wie gehabt, eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für den

Direktnachweis von MRSA-DNA aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise Nasen- oder Wundabstrichen) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen an entsprechenden Zielorganismen. Für interessierte Teilnehmer soll an dieser Stelle noch einmal explizit darauf hingewiesen werden, dass sich mit Testsystemen, die üblicherweise für die Kulturbestätigung von *S. aureus* und/oder MRSA ausgelegt sind, diese geringen Mengen nicht immer zuverlässig nachweisen lassen werden. Eine Teilnahme an diesem Ringversuch ist daher nur für solche diagnostischen Laboratorien erfolversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von MRSA etabliert haben bzw. im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie an dieser Stelle bereits mehrfach thematisiert basieren einige der derzeit etablierten eigenentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum Direktnachweis von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern, Staphylokokkenspezies-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen in der entsprechenden Nukleinsäurepräparation. Da sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken das *mecA*-Gen für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Aussagekraft dieser PCR-gestützten Testsysteme für den Direktnachweis von MRSA aus nativem Patientenmaterial eingeschränkt, wenn beim Patienten eine gleichzeitige Besiedelung mit *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. SCC*mec*-basierte PCR-Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCC*mec*-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCC*mec*-Kassette im *S. aureus*-Genom als Zielsequenz verwenden.

Dass aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCC*mec*-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCC*mec*-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCC*mec*-Kassette vorhandene *mecA*-Gens versandt. Auch wenn wir uns im Rahmen dieser Ringversuchsserie zum Ziel gesetzt haben primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, befand sich im aktuellen Ringversuch neben einer Mischung aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken mit *mecA*-Gen und einem typischen CA-MRSA Patientenisolat aber auch wieder ein in unseren Breiten eher seltener vorkommender MRSA Stamm mit SCC*mec*-Kassette vom Typ V.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 13) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1815394 diesmal

ein Gemisch aus einem *S. aureus*-Isolat (**cMSSA, PVL-positiv**, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (**S. epidermidis; mecA-positiv**, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), die Probe # 1815391 ein **CA-MRSA**-Patientenisolat (**MRSA; PVL-positiv**, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und die Probe # 1815392 ein typisches MRSA-Patientenisolat (**MRSA; PVL-negativ**, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL). Die letzte der 4 Proben, # 1815393, enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch sowohl bei der positiven CA-MRSA Probe # 1815391 als auch bei der positiven MRSA Probe # 1815392 von nahezu allen der 304 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der jeweils 3 falsch-negativen Ergebnisse bei diesen beiden Proben ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden PCR-Testsysteme mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt oder es ging während der Probenaufarbeitung ein gewisser Anteil der Template-DNA bei der DNA-Isolierung oder der Komplettierung der PCR-Ansätze verloren. Angesichts der mit 1×10^4 bzw. 5×10^4 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei beiden MRSA-positiven Proben den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme oder des Arbeitsablaufs im diagnostischen Labor geben.

Im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit vergleichbaren Probenkonstellationen wurde bei der Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies in Probe # 1815394 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 285 der insgesamt 307 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere 8 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von 6 dieser 8 Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruht. Da mit dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA*-Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall „fraglich“ auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis. Die restlichen Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Diesen 14 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 1815394 ist dringend anzuraten, ihre Testsysteme zu überprüfen bzw. die methodische Eignung ihres jeweiligen Testkonzepts zu hinterfragen. In der mikrobiologischen Praxis wird relativ häufig die gleichzeitige Anwesenheit einer Methicillin-resistenten (also *mecA*-positiven) Koagulase-

negativen Staphylokokkenspezies und eines Methicillin-empfindlichen (also *mecA*-negativen) *S. aureus*-Isolates in dem entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. In diesem Fall würden die Testsysteme der letztgenannten 14 Teilnehmer vermutlich fälschlicherweise einen Hinweis auf das Vorliegen einer MRSA-Infektion bzw. -Besiedelung anzeigen (mit allen hinlänglich bekannten Konsequenzen für den betroffenen Patienten!). Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 1815394 in Tab. 3 (Anhang 1, S. 14) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird schnell ersichtlich dass alle der derzeit etablierten SCC*mec*-basierten Testsysteme bei diesem Gemisch korrekterweise MRSA-negative Befunde liefern (da das *S. aureus*-Genom der MSSA-Komponente ja *de facto* keine SCC*mec*-Kassette mit integriertem *mecA*-Gen aufweist).

Insgesamt betrachtet spricht die Ergebnislage jedoch für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Auch diesmal scheinen die SCC*mec*-basierten Testkonzepte wieder einen gewissen analytischen Vorteil gegenüber Testsystemen mit einer getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen zu besitzen.

Wie aber in einigen der vorhergegangenen Ringversuche bereits mehrfach diskutiert, haben auch die erstgenannten Testkonzepte gewisse Limitationen bei bestimmten (derzeit in unseren Breiten noch „exotischen“) Sequenzvarianten der SCC*mec* Kassetten oder bei ebenfalls derzeit noch sehr selten zu beobachtenden Varianten des Methicillin-Resistenzvermittelnden *mec*-Gens.

Dies wird im Rahmen des aktuellen Ringversuchs aber nicht thematisiert und die beiden MRSA-positiven Proben # 1815391 und # 1815392 enthielten „nur“ MRSA Isolate mit geographisch relativ prävalenten Genkonstellationen.

Bei der Probe # 1815393, die diesmal lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von zwei der 307 Teilnehmer falsch-positive MRSA Ergebnisse beobachtet sowie von einem Teilnehmer ein als „fraglich“ klassifiziertes Ergebnis mitgeteilt. Hier liegt (auch angesichts der sequenziellen Folge direkt nach der MRSA-positiven Probe # 1815392) das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontaminationsereignisses oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe. Wie bereits mehrfach im Rahmen dieser ausführlichen Ringversuchsdiskussionen erwähnt, sind solche „Ausreißer“ bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der erfreulich große Anteil von richtig-positiven Ergebnissen, bei der einen positiven Probe und die überwiegend richtig-negativen Befunde bei den 2 MRSA-negativen Proben, erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. labor-spezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht.

Die Ergebnislage dieses Ringversuchs spricht also erneut für eine hohe Zuverlässigkeit der aktuell eingesetzten Verfahren zum PCR/NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine-Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende (PVL-negative) Ergebnisse der molekularbiologischen PVL-Testung wurden von 50 der insgesamt 307 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diese diesmal durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise unter: Linde HJ. und Lehn N [2], oder Witte, W. et al. [3]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in Reischl et al. (2007) [4]. Mittlerweile sind auch schon einige kommerzielle *real-time* PCR Testsysteme für den zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis von PVL-Genen bei MRSA- und MSSA-Isolaten verfügbar (z.B. von r-biopharm oder von TIB Molbiol).

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: r-biopharm RIDAGENE PVL PCR (3x), HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (2x), Amplex eazyplex MRSA (2x), Diarella MRSA real time PCR Kit TM von Gerbion (2x), Cepheid Xpert MRSA NxG (1x), GeneProof MRSA PCR Kit (1x), VIASURE Methicillin Resistent *S. aureus* Real Time PCR Detection Kit (1x), VELA diagnostics Sentosa SA Direct MRSA Test (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA (1x), Q-Bioanalytic Kit (1x) und Immundiagnostik MutaPLEX MRSA (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit sehr hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1815402; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml) und eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1815404; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml), eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml an *Legionella pneumophila* (# 1815404), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1815403), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Wie bereits in den vorhergegangenen Ringversuchen zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die hervorragende analytische Sensitivität und Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tab. 2 (Anhang 1, S. 15) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, daß im aktuellen Ringversuch alle Teilnehmer die Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1815402 sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Mit ca. 5×10^4 IFU pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1815401 diesmal eine etwa zehnfach geringere Menge an *C. pneumoniae* Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 138 der insgesamt 140 Teilnehmer zuverlässig als (richtig-) positiv befundet.

Bei der negativen Probe # 1815403 (nur *E. coli*) wurden von allen 140 Teilnehmern korrekt negative Ergebnisse berichtet.

Mit der Probe # 1815334, die mit einem anderen respiratorischen Pathogen (*Legionella pneumophila*; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) versetzt war, wurde im aktuellen Ringversuch zudem die analytische Spezifität der verwendeten Testsysteme überprüft. Hier wurden lediglich bei 3 der insgesamt 140 Teilnehmer falsch-positive PCR/NAT-Ergebnisse beobachtet. Kreuzreaktivitäten der Primer und Sonden von *C. pneumoniae*-spezifischen PCR Testsysteme mit *L. pneumophila* erscheinen aus molekularbiologischer Sicht wohl als eher unwahrscheinlich – vermutlich handelte es sich hier um „banale“ laborinterne Kontaminationsereignisse oder Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und sequenziellen Abarbeitung der Ringversuchsproben.

Bis auf einen Teilnehmer haben alle entweder kommerzielle oder selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *C. pneumoniae* DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion bei den vier versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs wurde dabei von keinem der Teilnehmer beobachtet. Aufgrund des leider noch relativ geringen Anteils und der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 16 Teil-

nehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 8 Teilnehmern der Diagenode MP/CP Kit, von 6 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit und von 4 Teilnehmern der Autoimmun Diagnostika CAP Bacteria Kit angegeben. Bis auf ein einzelnes falsch-negatives Ergebnis bei Verwendung des kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kits konnten damit alle Teilnehmer durchwegs Richtigkeitsquoten von 100%, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (9x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (7x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (6x), Seegene Anyplex RB5 detection (1x), Ingenetix Bacto Real *C. pneumoniae* (1x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (6x), fast-track Diagnostics Respiratory (2x), fast-track Diagnostics Bacterial pneumonia CAP (1x), Biologix ReadyMax B-CAP Assay (3x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae* (3x), Mikrogen ampliCube RBA (2x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (2x), Sacace Biotechnologies *C. pneumoniae* Real-TM (2x), Pneumonia für EASY-PLEX 384 System (1x), VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *L.pneumophila* Real Time PCR Detection Kit (1x), r-Biopharm RIDAGENE *C. pneumoniae* (1x) und PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x).

RV 541: Mycoplasma pneumoniae

Aufgrund zahlreicher Rückfragen von Teilnehmern der vergangenen Ringversuche hier eine wichtige Anmerkung vorab: der Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Mycoplasma pneumoniae* ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an Mycoplasma pneumoniae-DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut, wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial, konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 16) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1815413 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL), Probe # 1815411 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL) und Probe # 1815414 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL). Probe # 1815412 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*. Bis auf zwei Teilnehmer, die ihre Befunde als „fraglich“ klassifizierten, konnten die 159 Teilnehmer die DNA von *M. pneumoniae* in den Proben # 1815411 und # 1815413 zuverlässig nachweisen.

Für die „negative“ Probe # 1815412 (nur *E. coli*) wurden durchwegs korrekt negative Ergebnisse berichtet.

Mit ca. 1×10^3 Genomkopien/mL enthielt die Probe # 1815414 diesmal eine relativ geringe Menge an *M. pneumoniae* Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 128 der insgesamt 159 Teilnehmer zuverlässig als (richtig-) positiv befundet. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tab. 2 (Anhang 1, S. 16) gekennzeichnet. Angesichts der mit 1×10^3 Genomkopien/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1815414 den betroffenen 28 Ringversuchsteilnehmern dennoch Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Denn aus vergleichbaren Proben der Ringversuche im November 2011 und November 2016 mit einer Menge von 5×10^3 bzw. 1×10^3 Genomkopien/mL an *M. pneumoniae* im Probenmaterial (die damals noch von über 95% der Teilnehmer erfolgreich detektiert werden konnten) wird deutlich daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *M. pneumoniae* DNA wohl eher bei 10^2 als bei 10^3 Genomkopien/mL an *M. pneumoniae* angesiedelt ist.

Inhibitionskontrollen wurden von 157 der 159 Teilnehmer mitgeführt, für keine der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsergebnisse berichtet. Zusammenfassend läßt sich auch diesmal feststellen, dass wie bereits in vorausgegangenen Ringversuchsrunden die PCR-/NAT-gestützte Diagnostik von *Mycoplasma pneumoniae* in vielen Labors robust und zuverlässig implementiert ist. Dieses positive Zwischenfazit sollte jedoch nicht zum Anlass genommen werden, die Anstrengungen zu reduzieren!

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 103 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt: LightMix *M. pneumoniae* [n=16], AID CAP Bacteria [n=4], Minerva Venor Mp [n=1], AmpliGnost MP PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe [n=5], Diagenode MP/CP [n=9], r-Biopharm RIDAGENE Mp [n=6], GeneProof *M. pneumoniae* [n=8], sowie „andere kommerzielle Testsysteme“ [n=54]. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: ARGENE Ch/Myco. *pneumoniae* r-gene Kit (8x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (7x), Seegene Anyplex RB5 detection (1x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae*-FRP PCR Kit (5x), Biologix ReadyMax B-CAP Assay (3x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (2x), Mikrogen ampliCube Respiratory Panel 1(2x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (5x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 21 (2x), fast-track Diagnostics Bacterial pneumonia CAP (2x), fast-track Diagnostics (2x), Sacace Biotechnologies *M. pneumoniae/C. pneumoniae* Real-TM (2x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), Meridian Bioscience illumigene (1x), Euroclone Duplica Real Time *M. pneumoniae* Detection Kit (1x), Sartorius Microsart

ATMP Mycoplasma (1x), BioFire FILMARRAY Resp. Panel (1x), VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit (1x) und Ingenetix Bacto Real *Mycoplasma pneumoniae* (1x).

RV 542: *Coxiella burnetii* & *Bacillus anthracis*

Auch hier wieder eine Anmerkung vorweg: Der kombinierte Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii* & *Bacillus anthracis* ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Coxiella burnetii*- und *Bacillus anthracis*-DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tab. 1, Anhang 1, S. 18) enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *C. burnetii* ($\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1815424 und $\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1815423), zwei Proben mit verschiedenen Mengen an DNA des *Bacillus anthracis* UR-1 Isolats ($\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1815421 und $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1815423), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1815422), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Der Übersichtlichkeit halber haben wir uns bei diesem kombinierten Ringversuch entschlossen, die Ergebnislage für die beiden unterschiedlichen Erreger auch in zwei getrennten Tabellen darzustellen: für *C. burnetii* in den Tabellen 2 und 3 (Anhang 1, S. 18) sowie für *B. anthracis* in den Tabellen 4 und 5 (Anhang 1, S. 19). Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Altona diagnostics RealStar Anthrax PCR Kit (2x), Progenie RealCycler *C. burnetii* (1x), VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit (1x), Mikrogen alphaCube Q-Fiebers (1x), Molzym UMD (1x) und Life Technologies LSI VetMAX Absolute quant. *C. burnetii* (1x).

Coxiella burnetii: Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich. Die etwas stärker positive Probe # 1815424 (mit ca. 1×10^5 Genomkopien *C. burnetii*/mL) wurde von allen der insgesamt 44 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Die zweite positive Probe # 1815423 des Probesets (ca. 1×10^3 Genomkopien/mL von *C. burnetii*) wurde von 42 Labors korrekt berichtet, hier sind allerdings zwei falsch-negative Ergebnisse zu registrieren. Dies sollte in den betroffenen Labors zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems zu hinterfragen und die Prozesse der Probenaufarbeitung ggfs. zu optimieren. Die beiden Proben ohne Zielorganismus (# 1815421 und # 1815422

wurden erfreulicherweise von allen Teilnehmern korrekt als „negativ“ gewertet.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA der Teilnehmer enthielten durchwegs eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Relevante Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet.

Bacillus anthracis: Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Alle 25 Teilnehmer konnten die stärker positive Probe # 1815421 richtig klassifizieren. Die etwas schwächer positive Probe # 1815423 wurde von 23 Labors richtig bewertet, 2 Labors reichten ein ‚fragliches‘ Ergebnis ein. Ein weiteres ‚fragliches‘ Ergebnis wurde für eine der beiden Proben ohne Zielorganismus berichtet (# 1815422). Betrachtet man die Konsequenzen solcher Ergebnisse für die Therapie und das Management von Patienten (und die Auswirkungen auf das Umfeld!), so sollte dies zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems sowie die Prozesse der Probenaufarbeitung zu überprüfen. Wie immer stehen nach erfolgreichem Abschluss der aktuellen Ringversuchsrunde den Kolleginnen und Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen für *C. burnetii* DNA und *B. anthracis* DNA interessiert sind, mit den Proben dieses Ringversuchs auch gewissermaßen „standardisierte Rückstellproben“ zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

RV 543: *Francisella tularensis* & *Brucella* spp.

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Francisella tularensis* & *Brucella* spp.“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Francisella tularensis*-DNA und *Brucella* spp.** DNA aus geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tab. 1, Anhang 1, S. 20) enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *F. tularensis* subsp. *tularensis* DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in Probe # 1815432 und $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in Probe # 1815434), zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Brucella melitensis* DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in Probe # 1815431 und $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in Probe # 1815434), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1815433), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Francisella tularensis: Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier fast alle der 27 Teilnehmer die relativ stark positive Probe # 1815432 (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und # 1815424 (*F. tularensis* spp. *tularensis*,

$\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) korrekt bewertet. Die *F. tularensis*-negativen Proben # 1815431 und # 1815433 wurden mit jeweils einer Ausnahme von den Teilnehmern als negativ befundet. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *F. tularensis*-DNA der Teilnehmer enthielten alle eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsergebnisse beobachtet. Einer der 27 Teilnehmer hat die *F. tularensis* PCR-Befunde bei allen 4 ausgesandten Proben als „fraglich“ klassifiziert. Aus nachvollziehbaren Gründen konnte hier leider kein Zertifikat erteilt werden...

Brucella spp: 23 bzw. 22 der 24 teilnehmenden Labors berichteten für die ‚positiven‘ Proben # 1815431 und # 1815434 korrekte Ergebnisse. Ähnlich Richtigkeitsquoten fanden sich für die beiden Proben ohne Zielorganismen (#1815432 und # 1815433). Falsch-negative oder fragliche Ergebnisse sollten zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und die laborinternen Prozesse der Probenaufarbeitung zu überprüfen.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Molzym UMD (1x).

RV 544: Carbapenemase-Gene

Der seit 2015 in das reguläre Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommene Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Carbapenemase-Gene“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zur molekularen Resistenztestung bzw. dem Direktnachweis von charakteristischen Carbapenemase-Genen aus DNA-Präparationen von Reinkulturen an Enterobacteriaceae** konzipiert. Zum orientierenden Herantasten an die technische Eignung und die „Praktikabilität“ der versandten Probenmaterialien werden wir uns in den ersten Runden dieses methodisch anspruchsvollen Ringversuchs zur molekularen Resistenztestung auf die Abprüfung eines kleinen Spektrums der derzeit häufigsten Carbapenemase-Gene bei *Enterobacteriaceae* beschränken: KPC, VIM, OXA-48 ähnliche Gene, GES-Carbapenemasen, NDM, IMP und GIM. Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 22) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set vier Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1815441 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit dem OXA-181 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL), Probe # 1815442 enthielt *Escherichia coli* Zielorganismen mit dem NDM-5 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL), Probe # 1815443 enthielt *Klebsiella pneumoniae* Zielorganismen mit dem IMP-1 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL) und Probe # 1815444 enthielt *Klebsiella pneumoniae* Zielorganismen mit dem KPC-2 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL).

85 der 88 Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in der Probe # 1815441 fest. Für die Probe mit KPC-2 positiver *Klebsiella pneumoniae*

(# 1815444) wurden mit einer Ausnahme korrekte Ergebnisse berichtet. Hoch lag die Richtigkeitsquote auch für die Probe # 1815442, hier berichteten 86 Teilnehmer die Probe als „Carbapenemase-positiv“. Schwächen zeigten sich bei der Detektion der IMP-1-positiven *Klebsiella pneumoniae* in Probe # 1815443, die 17 Teilnehmern ‚durchrutschte‘. Grund hierfür ist möglicherweise, dass das IMP-1 Gen gerade in einigen ‚Multiplex‘ Testformaten nicht enthalten ist.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Direktnachweis von Carbapenemase-Genen Teilnehmer enthielten durchwegs eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID Carbapenemase (2x), AmpliGnost Carbapenemase PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Seegene Allplex Entero-DR Assay (1x) und AmpliSens® PCR Kit (1x).

RV 545: Clostridium difficile

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Clostridium difficile*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an Clostridium difficile-DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 23) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1815451 mit einer hohen Menge an *Clostridium difficile*, ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1815452 mit ca. zehnfach geringerer Menge ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1815453 und # 1815454), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden „positiven“ *Clostridium difficile* Proben # 1815451 und # 1815452 wurden erfreulicherweise von allen 154 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ klassifiziert. Die vereinzelt berichteten ‚fraglichen‘ Ergebnisse für die Proben ohne Zielorganismen (# 1815453 und # 1815454) sollten zum Anlass genommen werden, das verwendete Testsystem bzgl. analytischer Sensitivität und Spezifität zu evaluieren und auch die laborinternen Prozesse der Probenaufbereitung und -abarbeitung kritisch zu hinterfragen. Wie in Tab. 3 (Anhang 1, S. 23) angegeben, verwendete der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Altona diagnostic RealStar *C. difficile* PCR Kit (7x), Meridian Bioscience illumigene *C. difficile* (6x), r-Biopharm RIDAGENE

CD Toxin A/B (6x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (2x), HAIN Lifescience GenoType CDiff (6x), HAIN Lifescience FluoroType CDiff (1x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (2x), Seegene Allplex GI Bacteria Assay (2x), TIB Molbiol Modular Dx Kit (1x), Cobas Liat *C. diff* (1x), fast-track Diagnostics *C. difficile* (1x), Amplex eazyplex *C. difficile* complete Assay (1x) und QUIDEL AmpliVue *C. difficile* Assay (1x).

RV 546: VRE

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Vancomycin-resistente Enterokokken“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an DNA Vancomycin-resistenter Enterokokken** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 24) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1815463 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecium* van A resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1815462 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge (*Enterococcus faecium* van B resistent, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1815461 mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *Enterococcus faecalis*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1815464), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden „positiven“ Proben mit vanA bzw. vanB tragenden *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* (# 1815463 und # 1815462) mit keiner bzw. 3 Ausnahmen von allen Teilnehmern als „VRE-positiv“ klassifiziert. Das heißt aber auch, immerhin 3 falsch-negative Ergebnisse wurden für den vanB-tragenden *E. faecium* Stamm (# 1815462) eingereicht. Im Falle einer Infektion mit dem Erreger kommt dem korrekten Nachweis einer Vancomycin-Resistenz natürlich eine hohe Bedeutung zu. Wie bereits im vorangegangenen Ringversuch waren alle eingereichten vanA/vanB Differenzierungen korrekt. Von den ‚negativen‘ Proben wurde # 1815464 von allen Teilnehmern korrekt klassifiziert, während für die Probe # 1815462 zwei falsch-positive Befunde zu verzeichnen waren. Bei den eingesetzten Testsystemen zeigt sich in den letzten Jahren ein Trend hin zu kommerziell erhältlichen, vorkonfektionierten Systemen. Unterschiede in Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu *in-house* Assays waren jedoch nicht zu erkennen.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: GeneProof VRE PCR Kit (2x), BioGX auf BD Max (1x), Roche LightCycler VRE Detection Kit (1x), Amplex eazyplex VRE (1x), AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz differenz. von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik

Karlsruhe (1x) und VIASURE Vancomycin Resistente Real Time PCR Detection Kit (1x).

RV 547: Urogenital panel

Nach intensiven Vorarbeiten zum Proben-Design und zur praktischen Umsetzung wird der aktuell als sogenannter „Pilot“ organisierte Ringversuch RV 547 „Urogenital-Panel“ in der aktuellen Ringversuchsrunde erstmalig durchgeführt und die Ergebniskonstellation hier diskutiert. Nicht zuletzt durch das überaus heterogene Spektrum an eingesetzten Testsystemen wurde die strukturierte Auswertung der auf den Report-Formularen mitgeteilten Ergebnisse erschwert. Daher haben wir die Tab. 2 (Anhang 1, S. 25) etwas modifiziert. Dort ist der Übersicht halber nun die Anzahl an positiven und negativen Ergebnissen für die in den jeweiligen Proben anwesenden Pathogene aufgeführt. Mit dieser Lösung sollte man eine einigermaßen informative Darstellung über das erfasste Erregerspektrum und über die Leistungsdaten einzelner Testsysteme erhalten.

Im Großen und Ganzen haben die 19 aktuell registrierten Teilnehmer die Erreger in den 4 Einzelproben entsprechend den methodischen Möglichkeiten ihrer Testsysteme zufriedenstellend nachweisen können. Dies spricht zum einen für die Praktikabilität unseres innovativen Multiplex-Ringversuchskonzepts und zum anderen für die zuverlässige Erfassung der Zielorganismen innerhalb der jeweils testspezifisch abgedeckten Erregerspektren der eingesetzten kommerziellen oder eigenentwickelten PCR/NAT Verfahren.

Wir werden jedoch für die kommenden Aussendungen des RV 547 ein einfaches Schema in Form einer 7-stelligen Zahlenkombination entwickeln, über das die einzelnen Teilnehmer das erfasste Erregerspektrum ihrer individuellen Testsysteme und Multiplex-Assays auf dem Report-Formular vorab mitteilen können. Für die Erteilung von Zertifikaten macht es nachvollziehbarerweise nur Sinn diejenigen Parameter zu bewerten und zu testieren, die von den individuellen Teilnehmern im Rahmen ihres diagnostischen Workflows prinzipiell auch als positiv bzw. negativ erfasst werden können.

Unter Code [20] „Multiplex Kit“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Seegene Allplex STI Essential Assay (2x), Seegene Allplex Genital ulcer Assay (1x) und Seegene Anyplex STI-7 Detection (1x).

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars (zusätzliche oder alternative Angabe) die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: r-Biopharm RIDAGENE STI Mycoplasma panel (3x), r-Biopharm RIDAGENE *T. vaginalis* RT PCR Kit (2x), fast-track Diagnostics Urethritis plus (3x), BIORON RealLine single und multiplex Kits (1x) und AmpliSens *C. trachomatis*, *Ureaplasma*, *M. genitalium* und *M. hominis* (1x).

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Dieser im Jahr 2013 neu in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch RV 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum **Direktnachweis** von *Pneumocystis jirovecii*-DNA in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set drei positive Proben (siehe Tab. 1 Anhang 1, S. 26): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1815601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^5 Organismen/mL), eine Probe mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1815602; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^4 Organismen/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1815603; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^3 Organismen/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1815604) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Die „negative“ Probe # 1815604 wurde mit 2 Ausnahmen von den Teilnehmern korrekt als negativ für den Zielorganismus gewertet, lediglich 1 falsch-positives Ergebnis wurde berichtet. Der betroffene Teilnehmer sollten ggfs. die laborinterne Testdurchführung und die Performance des verwendeten Testsystems überprüfen. Im Vergleich zur vorausgegangenen Ringversuchsrunde kann jedoch insgesamt ein weiterer Rückgang falsch-positiver oder fraglicher Befunde festgestellt werden. Bei den „positiven“ Proben wurde Probe # 1815601 mit $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL von 104 der 105 Teilnehmer richtig klassifiziert. Die schwächer positive Probe # 1615602 (ca. 1×10^4 Organismen/mL) wurde von 103 Teilnehmern korrekt als „positiv“ gewertet. Für die Probe mit dem geringsten Gehalt an Zielorganismus (# 1815603, ca. 1×10^3 Organismen/mL an *Pneumocystis jirovecii*) berichteten 23 Labors falsch-negative Ergebnisse. Zugegebenermaßen ist die in der Probe vorhandene DNA Menge des Zielorganismus gering, sodass die eingereichten ‚negativen‘ Ergebnisse dieser Probe nicht als falsch gewertet werden. Inhibitionskontrollen wurden von allen 105 Teilnehmern durchgeführt, Inhibitionsereignisse wurden nicht berichtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (7x), fast-track Diagnostics *P. jirovecii* PCR Kit (5x), Biogeo Atypical Pneumonia-1 Assay (2x), BioGX *P. jirovecii* (1x), AmpliSens *P. jirovecii* FRT (1x), Genetrac *P. jirovecii* DNA Detection Kit (1x) und VIASURE *P. jirovecii* Real Time PCR Detection (1x).

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2019-10/lab000032.shtml>

1. Anhang1_lab000032.pdf (615 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ Juni 2018

Literatur

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, Bräulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 24:1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Udo Reischl, MFM
Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene,
Universitätsklinikum Regensburg (UKR),
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg,
Deutschland
udo.reischl@ukr.de

Bitte zitieren als

Reischl U, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttlar H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Juni 2018 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2019;10:Doc01.
DOI: 10.3205/lab000032, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000323

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2019-10/lab000032.shtml>

Veröffentlicht: 15.02.2019

Copyright

©2019 Reischl 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/>.

Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: comprehensive discussion of the June 2018 distribution for external quality assessment of nucleic acid-based protocols in diagnostic medical microbiology by INSTAND e.V.

Abstract

This contribution provides an analysis report of the recent proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)”. It summarizes some benchmarks and the overall assessment of results reported by all of the participating laboratories.

A highly desired scheme for external quality assessment (EQAS) of molecular diagnostic methods in the field of medical microbiology was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. This segment of the INSTAND e.V. proficiency testing program is open for diagnostic laboratories worldwide. The concept of this EQAS scheme, which is in accordance to the German RiLiBÄK, part B3, is based on two validation rounds per year (spring and autumn) and a permanently expanding coverage of relevant bacterial or fungal pathogens.

Briefly, next to “simply negative” samples the corresponding sets of QC specimens may contain some strong-positive samples, samples spiked with clinical variants or species closely related to the target organisms. Further information as well as the statistically documented and discussed results of the past rounds of this proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)” can be found at the homepage of INSTAND e.V. (<http://www.instand-ev.de>). Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least a brief discussion of the results and some key issues in English and keep the tables in a bilingual style.

Udo Reischl¹
Martin Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Michael Baier³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
Holger Scholz⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Roger Dumke⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Agnes Anders⁸

1 Institute for Clinical Microbiology and Hygiene, University Hospital Regensburg, Germany

2 Labor Dr. Heidrich und Kollegen MVZ GmbH, Hamburg, Germany

3 Institute of Microbiology, University Hospital of the Friedrich Schiller University of Jena, Germany

4 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

5 Bavarian State Office for Health and Food Safety, Oberschleissheim, Germany

6 Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Technical University Dresden, Germany

7 Institute for Medical Microbiology, Immunology

and Parasitology (IMMIP),
University of Bonn, Germany

8 National Reference
Laboratory for multidrug-
resistant Gram-negative
bacteria, Department for
Medical Microbiology, Ruhr-
University Bochum, Germany

Brief discussion of the current results

For the growing number of international participants we provide a brief discussion of the current results in an English version.

Examination results June 2018

RV 530: *Neisseria gonorrhoeae* & *Chlamydia trachomatis* (GO & CT)

Despite the relatively low amounts of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* target organisms in the current set of QC samples, the availability of well-established commercial or *in-house* NAT-assays has led to a high portion of correct results.

The current set of QC samples contained two samples with almost identical amounts of *C. trachomatis* ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL; # 1815302 and # 1815303), one sample with $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL of *C. trachomatis* (# 1815304) and three samples with various amounts of *N. gonorrhoeae* organisms ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1815302, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 1815304, and $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL in sample # 1815303). As depicted in tab. 2 (Attachment 1, p. 1), the reported results were almost correct for the three *C. trachomatis*-positive samples and the one *C. trachomatis*-negative sample among the current set – only one false-positive and one false-negative result was observed among the datasets submitted by the 258 participating laboratories.

Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 14 of the 256 participants for sample # 1815303, which contained a very low number of *N. gonorrhoeae* target organisms (5×10^2 CFU/mL), and by one participant for sample # 1815304. Also false-positive results for the GO-negative sample # 1815301 were reported by 4 participants.

Since the amount of target organisms in the CT- and GO-positive sample # 1815304 could not be considered as “extremely low”, false negative results should encourage the participant to review and optimize their CT- and GO specific NAT-based assays. Inhibition controls were in-

cluded by 257 of the 258 participants and no inhibitory events were reported.

Tables 4 to 7 (Attachment 1, p. 2–4) were included this time to enable a detailed evaluation of the *C. trachomatis*- and GO-specific NAT components of combined GO/CT test systems. In tables 4 and 5 only the *C. trachomatis* (CT) specific results and in the tables 6 and 7 only the *Neisseria gonorrhoeae* (GO) specific results are presented and evaluated statistically.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three positive samples: # 1815312 and # 1815314 with $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms and sample # 1815311 with $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Sample # 1815313 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in tab. 2 (Attachment 1, p. 5) the reported results were generally correct for the three positive samples.

For the *C. trachomatis*-negative sample # 1815313 containing only non-infectious human cells and *E. coli*, 6 false-positive results were observed among the 83 participants.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the “negative” samples “3” by target organism or PCR product carry-over from the positive samples “1” and “2” might have occurred within the sample prep and amplification workflow of these laboratories. So false positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system. This striking match of the current results with observations and accuracy rates in the last years can be considered as an evidence for a high reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing.

Run controls were performed by all of the 83 participants and inhibition events were not observed this time. In this context, it should be noted, that we have not added putative inhibitory substances into the samples of the current distribution.

Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity were observed for the *C. trachomatis*-specific NAT assays used by the 83 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1815321; 1×10^6 CFU/mL), one sample with an approximately hundredfold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1815324; 1×10^4 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella parapertussis* (# 1815322 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1815323).

The availability of well-established commercial or *in-house* PCR/NAT-assays has led to a high portion of correct results. All of the 167 participating laboratories reported correct results for the very strongly *B. pertussis* positive sample # 1815321 (1×10^6 CFU/mL). Only 9 of the 167 participants reported false-positive results for the *B. parapertussis* sample # 1815322. The false-positivity issue with sample 2 of the current set is probably due to cross-reactions of the applied PCR/NAT test systems (insufficient analytical specificity) or just due to simple contamination events in the course of sample preparation. For sample # 1815324 (10^4 CFU/mL of *B. pertussis*) 38 false-negative and 2 questionable results were observed.

With an amount of 10^4 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms, the lower limit of detection of appropriate test systems is obviously reached and so the results for the latter sample were not considered in the course of issuing the certificates (indicated by the three gray-shaded boxes in tab. 2 (Attachment 1, p. 6).

For the detection of *B. pertussis*, most participants used self-developed (in house) test systems with inhibition and/or positive controls. Therefore, 53 participating laboratories used IS481 insertion sequence, 9 the pertussis toxin coding gene and 2 ribosomal genes. Run controls were performed by 166 of 167 participants and no inhibition events were observed with the samples of the current distribution.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained two samples with a relatively high amount of target organisms. Sample # 1815331 contained approximately 5×10^4 CFU/ml of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain, and sample # 1815333 contained approximately 5×10^4 CFU/ml of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*.

The availability of well evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in the two *Helicobacter pylori*-positive samples (# 1815331: $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL and # 1815333: $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) led to positive predictive values of nearly 100%. Also for the *Helicobacter pylori*-negative sample # 1815332 correctly negative PCR/NAT-results were reported by nearly all the participating laboratories. Sample # 1815334 of the current distribution contained a culture suspension of *Campylobacter jejuni* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml), which was cor-

rectly reported “negative” by 51 of the 53 participants. Except the two false-positive results, this indicates an overall good analytical specificity of the used PCR test systems.

As noted in the description of RV 533, clarithromycin resistance testing in the examined *H. pylori* isolates could be performed by participants on a voluntary basis. This molecular resistance testing is usually based on amplification and sequencing of characteristic regions within the *H. pylori* 23 S rDNA or the use of hybridization probes based qPCR assays. Results for clarithromycin resistance were reported by 47 of the 53 participants. With three exceptions, the molecular antibiotic resistance testing results were correct.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed previously, the challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenic factors (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin).

The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1815343 (*E. coli*, 1×10^6 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive) and # 1815344 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive). The other two EHEC-negative samples contained an *eae*-positive EPEC strain (sample # 1815341; 1×10^4 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1815342). All of the 140 participants correctly reported negative results for samples # 1815342, containing only *E. coli* K12, and correctly detected the relatively high numbers of EHEC target organisms (1×10^6 and 1×10^5 CFU/mL) in samples # 1815343 and # 1815344. The other “negative” sample (# 1815341), containing an *eae*-positive but *stx*-negative EPEC isolate, was reported EHEC-negative by all but one of the participating diagnostic laboratories. The other participants, who reported a (false) positive result for sample # 1815341, indicated the molecular detection of the *eae*/intimin gene only. For an EPEC strain, the reported “*eae*-positive” result is theoretically correct. So we re-assigned the solely positive *eae* detection as EPEC and modified them as “negative” for EHEC target organisms.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 120 of the 140 participating laboratories. With the exception of two laboratories, all reported results

were correct. None of the participants observed significant inhibition of the NAT-reaction.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Due to numerous requests, here a short note for our participants outside Europe: as this proficiency testing panel is designed for a specific and sensitive detection of *B. burgdorferi* sensu lato DNA, the positive samples **do not necessarily** contain suspensions of “prototype” isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto and in many of the bi-annual rounds of our external quality assessment scheme (EQAS) also other **B. burgdorferi genotypes or genospecies will be present** in individual samples.

Short recapitulation: So far more than 20 different species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato complex were described, that naturally present genetic differences in commonly used target genes. To further address this heterogeneity and to monitor the analytical sensitivity and specificity of the PCR/NAT assays applied by the diverse group of international participants, *Borrelia bissettiae* and *Borrelia garinii* was included in the current EQAS distribution.

While *B. garinii* is a well-known human pathogenic species present in Europe and Asia, *Borrelia bissettiae* was isolated from ticks in the United States but never found in patient specimen. In Europe this species is still extremely rare in ticks (detected by PCR only) and patients, but one patient isolate (neuroborreliosis, Germany) is available.

The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (# 1815353; $\sim 5 \times 10^5$ organisms/mL), one sample with *Borrelia garinii* OspA type 3 (sample # 1815352; $\sim 5 \times 10^5$ organisms/mL) and one sample with *Borrelia bissettiae* (sample # 1815354; $\sim 5 \times 10^5$ organisms/mL). Sample # 1815351 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. With the exception of three false-negative results for sample # 1815352 (containing a high number of *B. garinii* target organisms), two false-negative result for sample # 1815354 (*B. bissettiae*) and two results classified as “questionable”, all participants reported correct results for the three positive samples and the negative sample. As always, obtaining false-negative results should prompt thorough re-evaluation of the assay’s specificity and/or sensitivity.

Approximately half of the participating laboratories used self-developed (in-house) tests with inhibition and/or positive controls. None of the participants noted significant inhibition of the NAT-reaction. Looking at the species composition of the current panel, slight differences in test performance are getting apparent between commercially available kits and in-house assays for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

RV 536: *Legionella pneumophila*

Due to numerous requests: this EQA scheme is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for direct detection of low amounts of *Legionella*

pneumophila from appropriate clinical specimens. Individual samples may contain relatively small amounts of the corresponding target organism. For this reason, participation is promising only for diagnostic laboratories, which have established a highly sensitive and specific PCR-/NAT-based method for the detection of *L. pneumophila* DNA or who want to evaluate their method with the help of an external quality control scheme.

The current set of QC samples contained only one positive sample with *Legionella pneumophila* serogroup 2 (# 1815364; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) next to two samples containing *Legionella hackeliae* (# 1815362; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL und # 1815363; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). Sample # 1815361 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. The *L. pneumophila*-positive sample # 1815364 was correctly tested positive by 120 of the 126 participating laboratories. The negative sample # 1815361 was also correctly tested negative nearly all of the participants. Samples # 1815362 and # 1815363, which contained $\sim 1 \times 10^4$ and $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL of *Legionella hackeliae*, were classified false-positive by 6 and 5 of the participating laboratories, respectively. Observing false-positive *L. pneumophila* PCR-results for non-pneumophila *Legionella* spp. should encourage the corresponding participants to review and optimize the analytical specificity of their “*L. pneumophila*-specific” assays or PCR/NAT-protocols.

All but one of the 126 participants indicated the use of internal or external inhibition controls in their assay concepts and none of the investigated samples showed inhibition.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Salmonella enterica* serovar Typhi: sample # 1815371 contained 5×10^4 CFU/ml, sample # 1815374 contained 5×10^3 CFU/ml and sample # 1815373 contained 5×10^2 CFU/ml. Sample # 1815372 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. Almost all participants reported correct results for the negative sample # 1815372, and for the positive samples # 1815371 and # 1815374. Although spiked with relatively low amounts of *S. enterica* target organisms ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), reporting a false-negative PCR/NAT result for sample # 1815374 should prompt a thorough re-evaluation of the performance of the test system.

Sample # 1815373, containing a very low amount of *Salmonella enterica* serovar Typhi target organisms ($\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL) was correctly identified as “positive” by 17 of the 30 participants. Inhibitory components in the sample matrix or -events during PCR-/NAT-reaction were not detected by any of the participants.

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained two samples without the corresponding target organisms (# 1815382 und # 1815383; only *E. coli* cells), one sample positive

for *L. monocytogenes* (# 1815384 with $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) and one sample with *Listeria ivanovii* (# 1815381) as a *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. The *Listeria monocytogenes*-containing sample (# 1815384) was correctly reported positive by all of the 42 participating diagnostic laboratories. In addition, the “negative” *E. coli* containing samples # 1815382 and # 1815383 were correctly identified as negative by all laboratories. Thirty-eight of the 42 participants indicated the use of *Listeria monocytogenes*-specific PCR/NAT assays, which is reflected by the high number of “false-negative” results for sample # 1815381, containing 5×10^4 CFU/mL of *Listeria ivanovii* organisms. However, as noted in the report form, participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT-assays may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. In this case, (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species do not negatively affect issuing the corresponding QC certificates. In sum, the current results indicate a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA DNA in typical clinical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs, so the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a background of human cells and other components. It is therefore important to note that NAT assays designed mainly for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set.

Sample # 1815394 of the current distribution contained a mixture of a *S. aureus* strain (cMSSA, PVL-positive, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and a CoNS strain (*S. epidermidis*; mecA-positive, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Correct (negative) results were reported by 285 of the 307 participating laboratories. Most of the 8 participants who reported “questionable” for sample # 1815394 indicated the use of assay concepts for the independent detection of the *mecA* gene and a *S. aureus* species marker gene (where “questionable” is the expected and correct classification for this mixed sample). Some of the 14 participants who reported (false-) positive MRSA PCR-results listed the use of *in-house* or commercial assay concepts relying on the quantitative detection of the *mecA* and *S. aureus* target genes.

Sample # 1815391 contained a typical cMRSA or CA-MRSA isolate (MRSA, PVL-positive, spa:t 008; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 304 participating laboratories. One sample of the current set (# 1815392) contained a relatively high number of a typical clinical MRSA isolate (MRSA, PVL-negative, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) which was also

found correctly MRSA positive by 304 of the participants. The last sample of the current set (# 1815393) contained no target organisms but only *E. coli* cells. Again, correct (negative) results were reported by 304 of our 307 participating laboratories. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, contamination events of the “negative” sample 3 by target organisms or PCR products originating from the positive samples “1” or “2” can not be ruled out. The false positive results, however, should encourage the affected participant to review and optimize their DNA extraction procedures and/or the MRSA specific NAT-based test systems. Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported correct PCR/NAT results for MRSA. This indicates excellent sample workup functioning of laboratory-specific prevention measures to avoid the risk of contamination and carry-over events.

Also, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor PVL (Panton-Valentine Leukocidin) or its coding gene *lukF/S-PV* was inquired. Corresponding results were reported by 50 of the 307 participating laboratories and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were correct in all but one case. Additional information can be found at: Linde et al. [2]; or Witte, W. et al. (2005) [3]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at Reischl et al. [4].

In addition, commercial real-time PCR assays reliably targeting PVL-genes in MRSA and MSSA isolates are available in the meantime (for example: r-biopharm or TIB Molbiol).

RV 540: Chlamydia pneumoniae

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. pneumoniae* in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory materials. So the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components. As a consequence, diagnostic assays designed for *C. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *C. pneumoniae* infected cells in individual samples of the QC set.

The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1815402 was spiked with $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml of *C. pneumoniae* whereas sample # 1815401 contained an approximately ten fold lower number of *C. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml). Sample # 1815404 contained significant numbers of *Legionella pneumophila* organisms to assess analytical specificity. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1815403. As depicted in tab. 2 (Attachment 1, p. 15), all participants reported correct results for the posit-

ive sample # 1815402. For the ten-fold low concentrated *C. pneumoniae* positive sample # 1815401 ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml), still 138 from the 140 participants observed correct positive results. No false-positive results were observed for the “negative” sample # 1815403. Only three of the 140 participants reported false-positive results for sample # 1815404 (*Legionella pneumoniae*). As significant cross-reactions of *C. pneumoniae*-specific primer and probe sequences are not expected on molecular level with the use of well-evaluated PCR assays, these false-positives are probably due to cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. Overall there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *M. pneumoniae* in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we aim to mimic the situation of processing typical clinical specimens like BAL or other respiratory materials. Therefore, the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. As a consequence, diagnostic assays designed for *M. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *M. pneumoniae* infected cells in individual samples of the RV 541 distributions.

The current set of QC samples contained three positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1815413. An approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) was present in sample # 1815411 and sample # 1815414 contained an approximately hundred fold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL). The set was completed by sample # 1815412, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli*. With the exception of two laboratories, which classified their results as “questionable” in the report forms, all of the 159 participants reported correct positive PCR/NAT results for samples # 1815411 and # 1815413.

The negative sample # 1815412 (containing only *E. coli* and uninfected human cells), was correctly reported “negative” by all of the 159 participants.

However, 28 laboratories reported false-negative results for the very weak positive sample # 1815414, containing the lowest amount of target organism ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL). Due to the relatively low amount of target organisms, results were not involved in the review for the certificates, but the 28 affected laboratories are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the

analytical sensitivity of their PCR/NAT assays. Comparable results from some of our previous EQAS distributions (November 2016 and November 2011) let assume, that the lower detection limit of current *M. pneumoniae*-specific PCR/NAT assays is in the range between 5×10^2 to 10^2 *M. pneumoniae* genome copies/mL in appropriate sample material.

RV 542: *Coxiella burnetii* & *Bacillus anthracis*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. burnetii* DNA and/or *Bacillus anthracis* DNA in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we aimed to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples (Tab. 1: Attachment 1, p. 18) contained two samples with different amounts of *C. burnetii* DNA ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL in sample # 1815423 and $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 1815424) and two samples with different amounts of *B. anthracis* strain UR-1 DNA ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1815423 and $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 1815421). Sample # 1815422 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

For convenient data presentation and analysis, we decided to depict the PCR/NAT-results for each target organisms within this combined EQAS scheme in two separate tables: please see tables 2 and 3 (Attachment 1, p. 18) for the *C. burnetii*-specific results and tables 4 and 5 (Attachment 1, p. 19) for the *B. anthracis*-specific results.

***Coxiella burnetii*:** The relatively high amount (1×10^5 genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1815424 was correctly reported by all participants. The hundred-fold lower concentration of the pathogen in sample # 1815423 was correctly identified by 42 of the 44 participating laboratories. The two “negative” samples (# 1815421 containing only *B. anthracis* and # 1815422 containing only *E. coli*) were correctly reported as negative by all participants. Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good correlation with the expected results was observed.

***Bacillus anthracis*:** With the exception of one “questionable” result, all participants correctly reported negative results for the samples # 1815422 and # 1815424 which did not contain the target organism. The “positive” sample # 1815421 containing $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL *B. anthracis* strain “UR-1” was correctly reported by all 25 participants. The second positive sample # 1815423 ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL of *B. anthracis* strain “UR-1”) was correctly reported by 23 of the 25 participants. With the completion of this round of external quality as-

assessment, “standardized samples” are again available for colleagues who are interested in obtaining *B. anthracis* DNA positive material for assay validation purposes. Requests for backup samples should be addressed to the EQAS coordinator (udo.reischl@ukr.de).

RV 543: *Francisella tularensis* & *Brucella* spp.

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *F. tularensis* DNA and *Brucella* spp. DNA in typical sample material.** With the development and composition of the corresponding sample materials we aim to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens.

The current set of QC samples (Tab. 1, Attachment 1, p. 20) contained two samples with different amounts of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1815432 and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 1815434) two samples with different amounts of *Brucella melitensis* DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1815431 and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 1815434). Sample # 1815433 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Francisella tularensis: Similar to QC samples from past distributions, the positive samples # 1815432 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *tularensis*) and # 1815434 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *tularensis*) were correctly tested positive by 25 and 26 of the 27 participating laboratories, respectively. Notably, one laboratory reported a ‘questionable’ result for the ‘negative’ samples # 1815431 and # 1815433. This should prompt an assessment of the performance of the test system used and the process of sample preparation.

Brucella spp.: The ‘positive’ samples # 1815431 and # 1815434 were correctly reported by 23 and 22 laboratories, respectively. In both samples without target organism (# 1815432 and # 1815433), a total of 3 ‘questionable’ results were reported. None of the participants observed an inhibition of the nucleic acid amplification.

RV 544: Carbapenemase genes

The concept of this novel EQAS-panel for the detection of carbapenemase genes is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for molecular resistance testing or the direct detection of carbapenemase genes from DNA preparations of *Enterobacteriaceae* culture isolates. Because of the methodologically challenging design of EQAs for the molecular resistance testing of the wide range of known carbapenemase

coding genes in different bacteria, the panel is narrowed down to a small selection of the currently most common carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae*: KPC, VIM, OXA-48 like genes, GES carbapenemases, NDM, IMP, and GIM. As shown in tab. 1 (Attachment 1, p. 22), the current set contained four samples with different carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1815441 contained a *Klebsiella pneumoniae* with a OXA-181 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), sample # 1815442 contained an *Escherichia coli* with a NDM-5 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), sample # 1815443 contained *Klebsiella pneumoniae* with a IMP-1 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL) and sample # 1815444 contained a *Klebsiella pneumoniae* isolate with a KPC-2 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL).

85 of the 88 participating laboratories reported sample # 1815441 (*K. pneumoniae* carrying a OXA-181 carbapenemase) as “carbapenemase positive”. Notably, all but 2 participants were able to detect carbapenemase genes in sample # 1815442 (*E. coli* carrying NDM-5). The third “positive” sample # 1815444 (containing *K. pneumoniae* with a KPC-2 gene) was correctly reported by 87 of the 88 participants. Apparently, not all test systems used were able to detect IMP-1, as 17 participants incorrectly reported ‘negative’ results for the IMP-1-carrying *K. pneumoniae* (sample # 1815443).

RV 545: *Clostridium difficile*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *C. difficile* DNA in typical sample material.** With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. The lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained two *Clostridium difficile* positive samples: sample # 1815451 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL, and sample # 1815452 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL. Samples # 1815453 and # 1815454 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. The “positive” samples # 1815451 and # 1815452 were correctly reported as “positive” all participating laboratories. For the two ‘negative’ samples # 1815453 and # 1815454, 2 and 1 ‘questionable’ results were reported, respectively. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 546: VRE

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of vancomycin-resistant enterococci DNA in typical sample material.** With the development

and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens.

Sample # 1815463 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecium* vanA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1815462 contained an approximately ten fold lower amount of *Enterococcus faecium* vanB ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Sample # 1815461 contained *Enterococcus faecalis* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1815464 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. Of the 54 participating laboratories, 51 and 54 correctly reported positive results for the samples # 1815462 and 1815463, respectively. Of note, the reported dedicated vanA/vanB identifications for these two samples were all correct. We were pleased to see that also for the “negative” samples #1815461 and # 1815464 in total only two incorrect results were reported. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 547: Urogenital panel

The concept of this novel EQAS-panel for the detection of the most prominent urogenital pathogens was recently established to meet the demands of current and future multiplex PCR/NAT assay concepts. As the current and the forthcoming distribution (November 2018) are classified as “pilot studies”, we are still in the learning phase to optimize the informative and intuitive depiction of the complex result constellations as well as developing a rational scheme for issuing individual certificates for the participants. The results reported by the 19 registered participants are depicted in tab. 2 (Attachment 1, p. 25) and a good overall correlation between the expected results (tab. 1, Attachment 1, p. 25) and the reported results was observed. The report forms of forthcoming RV 547 distributions will contain an extra field for a simple 7-digit code, where participants can specify the theoretical pathogen spectrum of their individual assay concepts. This will help to fairly consider the broad spectrum of different commercial and *in-house* PCR/NAT assays regarding species coverage, differentiation and multiplex capabilities.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series, which was started in 2013, is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *P. jirovecii* DNA in typical sample material**. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural

background of human cells and other components typically present in patient specimens.

The latest set of QC samples contained three positive specimens (see tab. 1: Attachment 1, p. 26). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) was present in sample # 1815601, an approximately tenfold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL) was present in sample # 1815602 and an approximately hundredfold lower amount ($\sim 1 \times 10^3$ organisms/mL) was present in sample # 1815603. The set was completed by sample # 1815604 which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Sample # 1815601, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) and sample # 1815602 with a ten-fold lower concentration of *P. jirovecii*, were both reported “positive” by 104 and 103 of the 105 participating laboratories, respectively. The sample containing the lowest amount of target organism (# 1815603) was correctly reported by 82 participants, 23 laboratories reported false-negative results. Admittedly, the amount of *P. jirovecii* was really low and we thus decided not to rate a negative result as ‘false negative’. Nevertheless, participants should be aware of the potential limitations of the test system used. The “negative sample” (# 1815604, containing only *E. coli*) was correctly classified “negative” by all but two participants. In case of false-positive results, this should definitely prompt investigations to control all processes involved in sample preparation and analysis in order to optimize the NAT assay used.

Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2019-10/lab000032.shtml>

1. Anhang1_lab000032.pdf (615 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and fungal genome detection (PCR/NAT)” June 2018

References

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, Bräulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 24:1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x

4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

Corresponding author:

Prof. Dr. Udo Reischl, MFM
Institute for Clinical Microbiology and Hygiene, University
Hospital Regensburg (UKR), Franz-Josef-Strauß-Allee 11,
93053 Regensburg, Germany
udo.reischl@ukr.de

Please cite as

Reischl U, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Juni 2018 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab.* 2019;10:Doc01. DOI: 10.3205/lab000032, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000323

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2019-10/lab000032.shtml>

Published: 2019-02-15

Copyright

©2019 Reischl 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/>.