

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2019 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 Webseite von Instand e.V. (<https://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 Ehrenschröder¹
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 gramnegative
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 burnetii*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* spp., *Pneumocystis jirovecii* (vormals *P. carinii*), *Clostridium difficile* (Toxingene), VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken) und der molekularen Resistenztestung für Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae sowie dem vor Kurzem neu ins Programm aufgenommenen Multiplex-Panel für Erreger von Urogenitalinfektionen darstellen und kurz diskutieren.

Für nähere Informationen über die Zusammensetzung der Ringversuchsproben, den 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 (<https://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

Webseite 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 wurde beispielsweise im aktuellen **RV 539 MRSA/cMRSA** eine der vier Proben mit einem **MSSA**-Patientenisolat versetzt, das zwar PCR-detektionsrelevante Segmente der *SCCmec*-Genkassette enthielt, dem aber das Methicillin-resistenzvermittelnde *mecA*-Gen fehlte (eine sog. **mecA-dropout-Variante**). Selbst bei dieser methodisch etwas anspruchsvolleren Konstellation wurden relativ wenig falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse aus dem Teilnehmerkreis berichtet, und die DNA der beiden MRSA/cMRSA-positiven Proben konnte mit den meisten der kommerziellen und Inhouse-PCR-Testsysteme zuverlässig nachgewiesen werden.

In jeweils einer der 4 Einzelproben der aktuellen Ringversuche **RV 532: Bordetella pertussis**, **RV 536: Legionella pneumophila** und **RV 560: Pneumocystis jirovecii** befanden sich diesmal relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise bereitete der zuverlässige PCR-gestützte Nachweis nur einem geringen Teil der Teilnehmer (bzw. den von ihnen eingesetzten Testsystemen) gewisse Probleme.

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 Inhouse-Testsysteme zur molekularen Carbapenemase-Detektion noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase-Genen aufweisen. Im aktuellen Ringversuch scheint dies insbesondere für OXA-245 zu gelten. Das *Klebsiella pneumoniae*-Isolat mit OXA-245 wurde aber immerhin noch von 78 der insgesamt 86 Teilnehmer detektiert.

Im Umfeld der molekularen Testung von Carbapenemase-Genen unterstützt uns Frau Dr. Agnes Anders vom NRZ für gramnegative Krankenhauserreger weiterhin bei der Auswahl von relevanten „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 nun in das reguläre Portfolio „Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. übernommen werden konnten:

- Der Ringversuch **RV 543: *Francisella tularensis*** wurde bereits in der vorherigen Ringversuchsrunde Mai 2019 um den Zielorganismus ***Brucella spp.*** erweitert und wird zukünftig routinemäßig als kombinierter Ringversuch **RV 543 F. tularensis & *Brucella spp.*** angeboten.
- Für die externe Qualitätssicherung zukünftig kommerziell verfügbarer (und damit wohl auch vermehrt eingesetzter) **PCR/NAT-gestützter Nachweisverfahren für Urogenital-Infektionen** haben wir seit Mai 2019 einen neuen Ringversuch routinemäßig etabliert, der vom Konzept her jeweils einige der nachfolgenden Erreger in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen innerhalb des 4er-Panels enthält: **RV 547 „Urogenital-Panel“** zum Nachweis von ***Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*** und ggf. ***Treponema pallidum***.

Nach 19 Teilnehmern beim Pilotringversuch im November 2018 und 57 Teilnehmern im Mai 2019 haben sich diesmal bereits 68 Teilnehmer registriert. Wir werden uns nach Kräften bemühen, der hohen Nachfrage auch mit ausreichenden Mengen an Probenmaterial nachzukommen, und sind sehr neugierig, wie sich die Auswertung der berichteten Ergebnisse zukünftig gestalten wird.

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 November 2019

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 einer relativ geringen Menge der folgenden Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1925302), *Bordetella pertussis* (Probe # 1925323), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 1925353), *Legionella pneumophila* (Probe # 1925362), *Listeria monocytogenes* (Probe # 1925383), *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 1925414), *Bacillus anthracis* (Probe # 1925421), *Brucella melitensis* (Probe # 1925432) sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1925601).

Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Auswertung 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 Realtime-PCR-Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

Bei den meisten Probenmaterialien der aktuellen Ringversuchsrunde stellen falsch-negative Ergebnisse damit

einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar.

Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung und/oder auf mangelnde Spezifität der eingesetzten Testsysteme zu betrachten. In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Tabelle 1 (Anhang 1) zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnissbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tabelle 2 (Anhang 1) nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen, und in Tabelle 3 (Anhang 1) nach der absoluten Anzahl der richtig-positiven und richtig-negativen Ergebnisse sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum „Gelegenheitsanwender“ abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen Realtime-PCR-Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR-Testsysteme) auch unter der Internetadresse <http://www.udo-reischl.de>; Unterpunkt „Auswertung der Ringversuche“ und natürlich auch über die Webseite von INSTAND e.V. (<https://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 ca. $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1925301), zwei Proben mit einer ca. 5-fach höheren Menge an *C. trachomatis* (# 1925302 und # 1925303 mit $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL), eine Probe (# 1925302) mit ca. 1×10^3 CFU/mL an *N. gonorrhoeae*, eine Probe mit einer ca. 50-fach höheren Menge an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1925301; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) sowie eine Probe mit einer sehr hohen Menge von ca. $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1925304).

Der Übersichtlichkeit halber stellen wir bei diesem kombinierten Ringversuch (CT/NG) die Ergebniskonstellation **in 5 getrennten Tabellen** (Anhang 1, S. 1–3) dar. Damit wird die diagnostische Performance der jeweiligen Testsysteme beim Nachweis von CT und NG aussagekräftiger dargestellt (Tabelle 2: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei CT, Tabelle 4: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei NG; jeweils gefolgt von den Richtigkeitsquoten nach aufgeführten Testsystemen in den Tabellen 3 und 5).

Auch wenn die etwas schwächer positive Probe # 1925301 des aktuellen Ringversuchs nur mit ca. 1×10^5 IFU/mL an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 256 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* diesmal nahezu durchwegs richtig-positive Ergebnisse. Bei den beiden ca. 5-fach stärker CT-positiven Proben # 1925303 und # 1925302 des aktuellen Probensets wurden ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern richtig-positive Ergebnisse beobachtet. Lediglich jeweils ein Teilnehmer berichtete bei der Probe # 1925301, bei der Probe # 1925302 sowie zwei Teilnehmer bei der Probe # 1925303 falsch-negative Ergebnisse. Die betreffenden Teilnehmer führten auf ihren Ergebnisformularen die Verwendung von kommerziellen und IVD-gelabelten Testsystemen an, mit denen aber viele andere Teilnehmer die *C. trachomatis*-Zielorganismen in den entsprechenden Proben problemlos nachweisen konnten. Für die *C. trachomatis*-negative Probe # 1925304 wurden aus dem gesamten Teilnehmerfeld ebenfalls nur 5 falsch-positive Ergebnisse berichtet. Da in der aktuellen Ringversuchsrunde von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei dem einzelnen falsch-negativen Ergebnis und den 5 falsch-positiven Ergebnissen vermutlich um ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die drei positiven Proben # 1925302, # 1925301 und # 1925304 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^3 , ca. 5×10^4 bzw. 5×10^5 CFU/mL) diesmal von 15 der insgesamt 256 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA bei der schwach positiven Probe # 1925302 sowie 1 falsch-negatives Ergebnis für Gonokokken-DNA bei der relativ stark positiven Probe # 1925304 mitgeteilt. Einer der Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis bei der positiven Probe # 1925301 als fraglich. Bei der GO-negativen Probe # 1925303 wurden

jedoch von 4 der insgesamt 256 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse berichtet.

Dieser im Vergleich zu früheren Ringversuchsrunden doch überraschend hohe Anteil an falsch-positiven Ergebnissen deutet auf Kontaminationseignisse oder wie auch immer geartete Template-Nukleinsäure-Verschleppungen bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung hin; vor allem, weil im aktuellen 4er-Set die GO-negative Probe # 1925303 bei sequenzieller Abarbeitung unmittelbar auf eine der GO-positiven Proben folgte. 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.

Angesichts der mit 1×10^3 CFU/mL an Zielorganismen in der GO-positiven Probe # 1925302 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern hier ebenfalls Anlass zur Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsysteme geben.

Da die beobachteten „Sensitivitätsprobleme“ diesmal jedoch nur relativ marginal ausfallen, sich offensichtlich nicht auf bestimmte Testkonzepte eingrenzen lassen und sporadisch durch das ganze Portfolio der eingesetzten Testsysteme gehen, 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. Angesichts der streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen scheint es für den Ringversuchsleiter jedes Mal aufs Neue nicht 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.

Auch wenn mit ca. 1×10^3 IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial der Probe # 1925302 die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht erreicht oder unterschritten sein sollte, stehen mit den Rückstellproben des Ringversuchs RV 530 vom November 2019 den Teilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität wieder geeignete Sets zur Überprüfung und Optimierung ihrer jeweiligen NAT-gestützten Testsysteme zur Verfügung.

Wir glauben, 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

Ringversuchsprobenmaterial 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 Ringversuchsproben 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 die *C. trachomatis*-Zielorganismen von allen 7 Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen in den drei CT-positiven Proben erfolgreich nachgewiesen. Auch in den beiden stärker GO-positiven Proben # 1925301 und # 1925304 gelang nahezu allen Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen der erfolgreiche Nachweis der *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen. Nur bei der sehr schwach GO-positiven Probe # 1925302 (in der zusätzlich noch relativ hohe Mengen an *C. trachomatis* enthalten waren) versagte der Nachweis bei Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen. Da bei der Erteilung der Zertifikate ja bekanntermaßen ein falsches Ergebnis innerhalb der 4 bewerteten Ergebnisse toleriert wird, werden auch diesmal allen 7 Teilnehmern die entsprechenden Zertifikate erteilt.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen der insgesamt 255 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionseignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit den GenProbe CT/NG, Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott Real-Time CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen in den entsprechenden Tabellen 3 und 5 (Anhang 1, S. 2–3) aufgeführten Testsystemen wird erneut eindrucksvoll deutlich, dass mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet werden konnten.

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 Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: BD Max (20x),

artus CT/NG QS-RGQ Kit (3x), Urethritis Kits von fast-track Diagnostics (6x), Seegene Allplex STI Essential Assay (9x), Seegene CT (3x), GeneProof CT/NG PCR Kits (3x), BIORON CT/NG (2x), Cobas 6800 CT/NG (6x), Cobas 4800 CT/NG (2x), Sacace Biotechnologies Kits (6x), VERSANT kPCR CTGC (1x), EUROIMMUN EUROArray STI (3x), AmpliSens *C. trachomatis* (1x), AmpliSens *N. gonorrhoeae*-screen-FRT (1x), diagenode S-DiaCT (2x), diagenode S-DiaGono (3x), Mikrogen ampliCube STD Panel 1 (3x), Hologic Aptima Combo 2 CT/NG (6x), DTLite Real Time-PCR Chlamydia trachomatis test DNA Technology (1x), AB Analytica (1x), Abbott Alinty m (1x), eazplex STD complete (1x), Strata-gene Mx3005p (1x), Goffin Presto CT/NG Assay (1x), AID STD-Komplett 2111X (2x) und GenID STD (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. Bei **kombinierten Testsystemen** (Stichwort: Multiplex-PCR) kann ja bekanntlich auch die Gegenwart des einen Erregers oder Zielorganismus in hoher Menge die Nachweisempfindlichkeit für den gleichzeitigen Nachweis des/der anderen Erreger oder Zielorganismen im Multiplex-Reaktionsansatz negativ beeinflussen. Bei bestimmten suboptimal abgestimmten PCR/NAT-Testsystemen könnte die kombinierte Zusammensetzung der Probe # 1925302 des aktuellen Ringversuchs eine solche Problemkonstellation repräsentieren und in der Konsequenz die etwas schlechteren Richtigkeitsquoten für den Gonokokken-DNA-Nachweis erklären.

RV 531: Chlamydia trachomatis

Das Probenset des aktuellen Ringversuchs enthielt diesmal zwei relativ stark positive Proben mit ca. 5×10^5 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1925311 und # 1925313), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1925312 und # 1925314), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tabelle 2 (Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den 65 Teilnehmern bei den beiden *C. trachomatis*-positiven Proben # 1925311 und # 1925313 durchwegs richtig-positive und bei den beiden *C. trachomatis*-negativen Proben (# 1925312 und # 1925314) von nahezu allen Teilnehmern korrekt-negative Ergebnisse für *C. trachomatis*-DNA mitgeteilt. Lediglich zwei unserer Teilnehmer berichteten für letztere beide Proben jeweils ein falsch-positives Ergebnis.

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 zwei falsch-positiven CT-Ergebnissen für die Proben # 1925312 und # 1925314 handelt es sich vermutlich um Kontaminationsereignisse während der Probenaufbereitung und -abarbeitung der gleichzeitig prozessierten CT-positiven Proben. Wie bereits bei den vorhergegangenen Ringversuchsauswertungen bei solchen Konstellationen erwähnt, sollten diese Ergebnisse den betroffenen Laboratorien Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen der insgesamt 64 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden dabei 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 Inhouse-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf erfreulich hohem Niveau.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurden hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (3x), BD Max CT (3x), Seegene Allplex CT/NG/MG/TV Assay (1x), Sansure Biotech Kit (1x), EUROIMMUN STI (1x), diagenode S-DiaCT (1x), GenID STD (1x) und Nuclear Laser Medicine CT 16S Real Time (1x).

RV 532: Bordetella pertussis

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit ca. 5×10^5 CFU/mL an *B. pertussis* (# 1925321), eine Probe mit ca. 5×10^4 CFU/mL an *B. pertussis* (# 1925324), sowie eine Probe mit ca. 5×10^3 CFU/mL an *B. pertussis* (# 1925323). Die Probe # 1925322 enthielt keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Wie schon im letzten Ringversuch bereitete der Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in den Proben # 1925321 und # 1925324 den Teilnehmern keine allzu großen Schwierigkeiten. In der Probe # 1925321 mit einer Erregermenge von $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL wurden keine falsch-negativen Ergebnisse berichtet. Allerdings wurden bei der Probe # 1925324 (Erregermenge $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) bereits zwei falsch-negative Ergebnisse für *Bordetella pertussis*-DNA beobachtet.

In der mikrobiologischen Praxis sind vor allem bei Rachenabstrichen gelegentlich auch geringe Erregermengen zu erwarten – daher sollten falsch-negative Ergebnisse bei dem betroffenen Teilnehmer durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung seines jeweiligen NAT-gestützten

Testsystems geben. Erfreulicherweise wurden diesmal von allen der insgesamt 155 Teilnehmer für die nur mit *Escherichia coli* versetzte Probe # 1925322 durchwegs richtig-negative Ergebnisse mitgeteilt.

Unter den mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich zudem 22 falsch-negative oder als „fraglich“ klassifizierte Ergebnisse für die schwach positive Probe # 1925323. Bei einer Menge von 5×10^3 CFU/mL an *B. pertussis*-Zielorganismen (entspricht ca. 5×10^2 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 µl) nähert man sich offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1925323 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die drei grauschriftierten Felder in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 5) gekennzeichnet.

Inhibitionskontrollen wurden von 154 der insgesamt 155 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (Inhouse-)Testsysteme (38 Teilnehmer) oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifizierte kommerzielle Testkits mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen (63 Teilnehmer) zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience Kits (10x), Mikrogen ampliCube Respiratory Bacterial Panel 2 (5x), AmpliGnost *B. pertussis*/parapertussis PCR Kit (PIIM, Karlsruhe) (4x), Hologic Panther Fusion Bordetella Assay (3x), QUIDEL Solana Bordetella Complete Assay (3x), QUIDEL AmpliVue Bordetella Assay (1x), Seegene Respiratory Kits (4x), Altona diagnostic RealStar Bordetella PCR Kit (3x), fast-track Diagnostics Bordetella (2x), Roche Kits (3x), DiaSorin Liaison MDX (2x), BD MAX DNA MMK (1x), BD MAX BioGX Bordetella PCR Kits (5x), Sacace Biotechnologies *B.pert./parapert./bronch.* Real-TM (1x), BioMerieux Kit (1x), Aries Luminex (1x), ARGENE (1x), FOCUS Simplexa Bordetella Direct (1x), Meridian Bioscience Alethia (1x), Illumigene (1x), BioFire FILM-ARRAY (1x) und RespiFinder 2Smart (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit einer sehr hohen Menge an Clarithromycin-sensiblen *Helicobacter pylori* (# 1925333; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1925331; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1925332, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1925334), die nur humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden alle drei *H. pylori*-haltigen Proben (#1925331, # 1925332 und # 1925333) von nahezu allen Teilnehmern als richtig-positiv bewertet. Lediglich zwei der insgesamt 47 Teilnehmer beobachteten ein falsch-negatives PCR/NAT-Ergebnis für *H. pylori*-DNA in der schwach positiven Probe # 1925332. Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Auch bei Probe # 1925334, die keine *H. pylori*-DNA enthielt, sondern lediglich mit humanem Zellmaterial und *Escherichia coli* K12 versetzt war, wurden keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet. Inhibitionskontrollen wurden offenbar von allen der insgesamt 47 Teilnehmer durchgeführt und dabei keinerlei Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Bis auf die Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 2x *H. pylori* von Sacace Biotechnologies, 2x LightMix Helicobacter 23S Kit von TIB Molbiol, 1x LightMix Modular *H. pylori* von TIB Molbiol, 2x Allplex *H. pylori* & ClariR Assay von Seegene, 2x AmpliDiag *H. pylori* + ClariR von MOBIDIAG und 1x *H. pylori* + Clarithromycin Real TM PCR kit von VIASURE angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. Inhouse-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 41 der insgesamt 47 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines einzigen Teilnehmers waren die 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 Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen).

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei unterschiedliche, aber relativ stark EHEC-positive Proben mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1925342: *E. coli*, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv) und mit ca. 1×10^4 CFU/mL (# 1925343: *E. coli*, *stx*_{1a}-, *eae*-, *hlyA*- und O103-positiv) und eine Probe mit 5×10^4 CFU/mL an *Salmonella enterica* ser. Enteritidis (# 1925341). Die Probe

1925344 enthielt lediglich einen *E. coli* K12-Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ).

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs waren keine „exotischen“ Shiga-Toxin-Gene vertreten, sodass, begründet auf die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten PCR/NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC, bei allen Proben durchwegs hohe Richtigkeitsquoten – sowohl für positive, als auch für negative Befunde – beobachtet werden konnten. Bei den beiden EHEC-positiven Proben # 1925342 und # 1925343 wurden von 133 bzw. 132 der insgesamt 133 Teilnehmer richtig-positive EHEC-Befunde berichtet. Lediglich von einem Teilnehmer wurde bei der positiven Probe # 1925343 ein falsch-negatives PCR-Ergebnis für EHEC/STEC beobachtet. Auch die Probe # 1925344 (*E. coli* K12-Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde von allen Teilnehmern korrekterweise als negativ befundet – sie führte diesmal bei keinem der insgesamt 133 Teilnehmer zu einem falsch-positiven Ergebnis.

Eine der vier Proben (# 1925341) war diesmal mit *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) versetzt. Diese wurde erfreulicherweise von fast allen Teilnehmern (bis auf einen) korrekt als negativ für EHEC/STEC befundet. Bei der anzunehmenden sequenziellen Abarbeitung der 4 Einzelproben sollte die Ergebniskonstellation bei dem Teilnehmer mit dem falsch-positiven Ergebnis für Probe „1“ erscheinen. Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung durch Verschleppung von positivem Probenmaterial oder Nukleinsäure aus den beiden EHEC-positiven Proben „2“ und „3“ sind eher unwahrscheinlich.

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, werden bei zukünftigen Ringversuchen auch die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten, und der Schwerpunkt bleibt auf der Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme, und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze.

Neben den traditionellen Inhouse-Testsystemen werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle PCR/NAT-Assays eingesetzt. In Anbetracht der insgesamt relativ hohen Richtigkeitsquoten können aktuell keine großen Unterschiede innerhalb dieser Testkonzepte ausgemacht werden. Inhibitionskontrollen wurden von 132 der insgesamt 133 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsergebnisse wurden in keinem Fall beobachtet.

Zudem wurden von 113 Teilnehmern die 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 von zwei Teilnehmern wurden in der aktuellen Ringversuchsrunde falsche Ergebnisse für die Feintypisierung berichtet. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die

Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol Light-Mix modular stx-1/stx-2/*eae* (6x), BD Max Enteric Bacterial Panel (6x), Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Bacteria II Assay (5x), Amplex eazypex EHEC complete (3x), eazypex EHEC classic plus (1x), Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (2x), BioMerieux BioFire GI Panel (2x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit (PIIM) Karlsruhe (1x), ampliCube Gastrointestinal Bacterial Panel 2 (1x), AmpliSens Escherichioses FRT (1x), fast-track Diagnostics (1x), iQ-Check STEC VirX Kit (1x), OptiGene Isothermal Master Mix (1x) und SSI Diagnostica-DEC PCR Kit (1x)

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

Aus diesem Grund enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben eine Probe mit einer hohen Menge an *Borrelia afzelii* (# 1925352, $\sim 5 \times 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit einer etwa zehnfach geringeren Menge (# 1925351, $\sim 5 \times 10^4$ Organismen/mL), eine Probe mit einer etwa hundertfach geringeren Menge (# 1925353, $\sim 5 \times 10^3$ Organismen/mL) an *Borrelia afzelii* sowie eine Probe ohne Zielorganismen, die jedoch lediglich signifikante Mengen eines *E. coli* K12-Stammes enthielt (# 1925354).

An dieser Stelle nochmals eine kurze Rekapitulation zu *B. burgdorferi* sensu lato: Mittlerweile sind mehr als 20 dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörige, genetisch eindeutig unterscheidbare „Genospezies“ beschrieben. Die zum Teil erhebliche Heterogenität selbst innerhalb einer Spezies – z.B. *B. garinii* – stellt hohe Anforderungen an den PCR/NAT-gestützten Nachweis von *B. burgdorferi*-DNA. Die in diesem Ringversuch eingesetzte Spezies *B. afzelii* findet sich häufig in Zecken und ist die häufigste Spezies, die bei Hautmanifestationen nachgewiesen wird: etwa 80% der Nachweise bei Acrodermatitis chronica atrophicans sind *B. afzelii*. Ebenfalls gesichert humanpathogen und weit in Europa verbreitet sind *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii*, letztere bislang nur selten bei Erkrankungen (insbesondere Haut) oder in Zecken nachgewiesen. Als möglicherweise humanpathogen werden *B. bisettiae*, *B. lusitanae* und *B. valaisiana* eingestuft, alle in Europa nachgewiesen. Eine weitere humanpathogene Spezies, vorläufig als Candidatus *B. mayonii* benannt, wurde in 2016 erstmals beschrieben: Vorkommen bislang nur in den USA bekannt und als bisher einzige *B. burgdorferi* s.l.-Spezies zuverlässig im Blut betroffener Patienten nachweisbar. Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen:

Die Detektion von *Borrelia afzelii*-DNA in den Proben mit der hohen Erregerlast (#1925352 mit ca. 5×10^5 Organismen/mL und # 1925351 mit ca. 5×10^4 Organismen/mL) bereitete lediglich jeweils einem der Teilnehmer Proble-

me, sodass hier erfreulicherweise eine Quote richtig-positiver Ergebnisse von „nahezu“ 100% erreicht wurde. Bei abnehmender Erregerlast wurde bei der Probe # 1925353 mit ca. 5×10^3 Organismen/mL von einem der insgesamt 100 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis berichtet und zwei Teilnehmer klassifizierten ihr Ergebnis hier als „fraglich“.

Einer der Teilnehmer beobachtete mit seinem Borrelien-spezifischen PCR/NAT-Testsystem ein positives Ergebnis bei der negativen Probe # 1925354. Da diese Probe lediglich signifikante Mengen eines *E. coli* K12-Stammes enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich. Laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung sind natürlich ebenfalls möglich und sollten ggf. kontrolliert und korrigiert werden. Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von allen 100 Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse 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 (Inhouse-)Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet, kommerzielle Testsysteme wurden von 51 der 100 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen (Sensitivität zwischen 99 und 100%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (Inhouse-)Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 98%) zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den drei Teilnehmern, die ein falsch-negatives Ergebnis für je eine der positiven Proben berichteten, alle durch Inhouse-Testsysteme generiert wurden. Gegebenenfalls sollte also die Sensitivität der hauseigenen 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* (6x), Mikrogen alphaCube *Borrelia* (6x), BIORON RealLine *Borrelien* Kit (3x), Gerbion Diarella *Borrelia* (2x), Ingenetix BactoReal (2x), AID GenID Zecken Screening Kit (1x), Sacace Biotechnologies *B. burgdorferi* (1x), Sacace Biotechnologies TBEV, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris* Real Time (1x), Altona diagnostics Kit (1x), Elisabeth Pharmacon EliGene *Borrelia* LC (1x) und Master diagnostica TBB (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

Aus aktuellem Anlass hier erneut vorab ein kurzer Hinweis: Dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von PCR/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.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 9) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1925364 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG1, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1925361 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG1, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1925362 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG1, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL). Probe # 1925363 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Letztere Einzelprobe wurde erfreulicherweise von 112 der insgesamt 114 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Nur zwei Teilnehmer berichteten hier ein falsch-positives Ergebnis. Da diese Probe lediglich *E. coli*-Zellen enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich. Vermutlich sind die falsch-positiven Ergebnisse hier durch laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung bedingt.

Die relativ stark positive Probe # 1925364 mit ca. 5×10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG1 wurde von 112 Teilnehmern korrekterweise als positiv interpretiert. Die zwei falsch-negativen Ergebnisse beruhen vermutlich eher auf anwendungstechnischen Problemen als auf unzureichender analytischer Sensitivität. Die etwa 10-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 1925361 (ca. 5×10^4 CFU/mL) konnte noch von 111 Teilnehmern korrekt als positiv identifiziert werden, allerdings wurden hier bereits 3 falsch-negative Ergebnisse berichtet. Um die Grenzen der analytischen Sensitivität auszuloten, enthielt die Probe # 1925362 diesmal eine sehr geringe Menge an Zielorganismen (ca. 5×10^3 CFU/mL). Für diese Probe wurden nur 92 richtig-positive Ergebnisse von den insgesamt 114 Teilnehmern berichtet. Neben 20 falsch-negativen Ergebnissen wurden auch zwei Befunde als „fraglich“ klassifiziert.

Aufgrund der geringen Erregeranzahl in Probe # 1925362 wird diese Probe im Rahmen der Ringversuchsauswertung als „edukativ“ betrachtet und die Ergebnisse bei der Erteilung der Zertifikate hier nicht als „falsch-negativ“ ge-

wertet. Allerdings sollte der aktuelle Ringversuch und insbesondere ein falsch-negatives Ergebnis bei der Probe # 1925362 bei Teilnehmern mit hohem Anspruch an die Empfindlichkeit ihrer PCR/NAT-Testsysteme zum Anlass genommen werden, die analytische Sensitivität des verwendeten Testsystems kritisch zu hinterfragen und gegebenenfalls zu optimieren.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 80 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. 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), Seegene Respiratory Bacteria (3x), Seegene PneumoBacter assay (1x), AmpliGnost *L. pneumophila* von PIIM Karlsruhe (6x), Mikrogen ampliCube Respiratory Panel 1 (6x), Diagenode Legionella real time PCR Kit (1x), GeneProof *L. pneumophila* PCR Kit (5x), fast-track Diagnostics Atypical CAP (3x), fast-track Diagnostics Bacterial pneumonia CAP (3x), BioMerieux ARGENE (3x), BioGX Atypical pneumonia (1x), BioGX auf BD Max (2x), BD Max (2x), BD Max c-CAP Assay (2x), Gerbion diarella Legionella (1x), Biolegio Atypical Pneumonia-1 Assay (1x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (1x), Luminex RPP Multiplex (1x), RespiFinder (1x), Roche TNAI (1x), Roche LightMix Modular L.spp/pn. (1x), Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (2x), BioFire FILMARRAY (1x), AnDiatec Quidel *L. pneumophila* (1x), AmpliSens *Legionella* FRT (1x) und Eazyplex PneumoBug expert (1x).

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1925373; *Salmonella enterica* ser. Tennessee, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), eine mit etwa fünffach geringerer Menge (# 1925374; *Salmonella enterica* ser. Enteritidis $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1925372 mit *Salmonella enterica* ser. Paratyphi; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1925371), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte erfreulicherweise bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Insgesamt war lediglich ein falsch-negatives Ergebnis bei der positiven Probe # 1925372 sowie ein falsch-negatives Ergebnis bei der positiven Probe # 1925374 zu beobachten. Bei den übrigen zwei Proben innerhalb des aktuellen Sets, # 1925371 und # 1925373, wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 24 Teilnehmern durchwegs korrekt-negative bzw. -positive Ergebnisse berichtet. Im direkten Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden deutet dies 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 24 Teilnehmern durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden im aktuellen Probensatz für keine der 4 Einzelproben berichtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von den Teilnehmern u.a. die Verwendung der folgenden Kits aufgeführt: BD Max Enteric Bacterial Panel (4x), TIB Molbiol LightMix Salmonella (3x), fast-track Diagnostics (1x), ampliCube Gastroenteritis Bacteria Panel 1 (1x), Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Bacteria 2 Assay (1x), eazyplex TyphiTyper (1x) und mericon Salmonella spp Kit (1x).

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 gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. Im aktuellen Ringversuch wurde jedoch eine Art Verdünnungsreihe von *Listeria monocytogenes* angefertigt, um primär die untere Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten Testsysteme abzuprüfen. Probe # 1925381 enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 5×10^5 CFU/mL), die auch von allen der insgesamt 38 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1925382 enthielt mit ca. 5×10^4 CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Mit ca. 1×10^3 CFU/mL *L. monocytogenes*/mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1925383 diesmal eine relativ geringe Menge der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise konnte selbst diese schwach positive Probe noch von 35 der insgesamt 43 Teilnehmer als „positiv“ klassifiziert werden. Lediglich 8 Teilnehmer berichteten hier ein negatives Ergebnis, was sich auch mit den Beobachtungen aus vorhergegangenen Ringversuchen mit sehr schwach positiven Einzelproben deckt.

Um mögliche Kontaminationsereignisse während der Prozessierung und DNA-Präparation bei den *L. monocytogenes*-positiven Proben aufzudecken, haben wir die negative Probe # 1925384 diesmal bewusst am Ende des 4er-Sets positioniert. Umso erfreulicher gestaltet sich die aktuelle Ergebniskonstellation: keiner der 43 Teilnehmer hat bei dieser Probe ohne Zielorganismen, die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, ein falsch-positives Ergebnis berichtet.

Im Vergleich zu den vorhergegangenen Ringversuchen deutet dies auf eine kontinuierlich verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationseignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin.

Da wir uns innerhalb dieses Ringversuchsprogramms gelegentlich auch mit einzelnen Proben an die derzeit technisch machbare untere Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns dabei sehr wohl bewusst, dass bei vielen Fragestellungen das „technisch Machbare“ nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem „diagnostisch Sinnvollen“ ist), bestand beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostische Herausforderung in der Abprüfung der analytischen Sensitivität individueller Testkonzepte. Der möglichst selektiven Detektion bzw. differenzierten Erfassung von non-monocytoenes Listerienspezies werden wir uns wieder in einigen der zukünftigen Ringversuchsrunden widmen.

Für Kolleginnen und Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit dem aktuellen Ringversuch auch wieder standardisierte Rückstellproben mit geringerer Menge an Zielorganismen zur Verfügung, die als untere Messlatte bezüglich der analytischen Sensitivität dienen können und direkt über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind. Von allen 43 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionseignisse 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: Allplex Meningitis assay (2x), Progenie RealCycler *Listeria* spp. (2x), TIB Molbiol LightMix modular (1x), Sacace Biotechnologies *L. monocytogenes* Real-TM (1x), DYNEX Real Time PCR MeningoPlex (1x), Liferiver *L. monocytogenes* Real Time PCR Kit (1x), FILMARRAY/Encephalitis Panel (1x), AmpliSens *L. monocytogenes* PCR Kit (1x), eazyplex CSF direct (1x), BioGX (1x), BIRD *L. monocytogenes* (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 diagnosti-

schen Laboratorien erfolgversprechend 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. SCCmec-basierte PCR-Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCCmec-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCCmec-Kassette im *S. aureus*-Genom als Zielsequenz verwenden.

Dass aber auch die SCCmec-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCCmec-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCCmec-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCCmec-Kassette vorhandenen *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 einem klassischen und unkomplizierten MRSA-Isolat auch ein derzeit noch eher selten anzutreffendes MSSA-Isolat mit *mecA*-Deletion innerhalb der SCCmec-Kassette.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1925391 ein typisches MRSA-Patientenisolat (MRSA; PVL-negativ, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1925393 eine ca. fünffach geringere Menge des gleichen Isolats (MRSA; PVL-negativ, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), und die Probe # 1925394 eine relativ hohe Menge eines **Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Patientenisolats mit *mecA*-Deletion innerhalb der integrierten SCCmec-Kassette (sog. *mecA* dropout Mutante)** (MSSA; PVL-negativ; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL). Die letzte der 4 Proben, # 1925392, enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der positiven MRSA-Probe # 1925391 von nahezu allen der 288 Teilnehmer korrekt-positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Unter den ebenfalls nahezu korrekten Ergeb-

nissen für die zweite MRSA-positive Probe (# 1925393) fanden sich aber auch 3 falsch-negative und 3 als „fraglich“ klassifizierte Befunde. Der technische oder methodische Hintergrund der 3 als „fraglich“ bewerteten und der 3 falsch-negativen Ergebnisse bei dieser Probe 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 5×10^5 bzw. 1×10^5 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei den Proben # 1925391 und # 1925393 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus begründeten Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Bei der Probe # 1925392, die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs von 2 der 288 Teilnehmer ein als „fraglich“ klassifiziertes und von 3 Teilnehmern ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beobachtet. Hier liegt (auch angesichts der sequenziellen Folge direkt nach der MRSA-positiven Probe #1925391) 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 nahezu 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen unseres Erachtens keiner weiteren Diskussion. Die augenscheinlich „schlechte Datenlage“ bei der MSSA-positiven Probe # 1925394 (*S. aureus*-Patientenisolat) ist bei näherer Betrachtung schnell erklärt: hierbei handelt es sich um eine sog. **mecA dropout-Mutante**. Bei solchen speziellen MSSA-Isolaten liegt die SCCmec-Kassette zwar im *S. aureus*-Genom integriert vor (d.h. die SCCmec-orfX-Übergangsregion, die bei den meisten der derzeit kommerziell erhältlichen MRSA-spezifischen PCR-Testsysteme als molekularer Surrogatmarker für die Anwesenheit eines *mecA*-Gens verwendet wird, ist in diesem Isolat vorhanden), aber innerhalb dieser SCCmec-Kassette ist das Methicillin-Resistenz vermittelnde *mecA*-Gen großteils deletiert und daher phänotypisch nicht mehr funktionell ausgeprägt. Auch wenn solche *mecA*-Deletionsmutanten derzeit weiterhin eher selten beobachtet werden, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher MSSA-Isolate geweckt werden, die „leere“ SCCmec-Kassetten tragen.

Auch hier ist wieder der direkte Vergleich zu zwei unserer früheren MRSA-Ringversuche interessant. Im November 2012 wurde nämlich das gleiche *mecA* dropout MRSA-Isolat ausgesandt, und von insgesamt 210 Teilnehmern konnten damals lediglich 63 Teilnehmer (30%) einen korrekt-negativen PCR/NAT-MRSA-Nachweis führen. Der

MRSA-Ringversuch vom November 2015 enthielt ein ähnliches *mecA* dropout MRSA-Patientenisolat und hier wurde bereits von 53% aller Teilnehmer ein korrekt-negativer PCR/NAT-MRSA-Befund beobachtet. Und innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde werden bei solchen MSSA-Isolaten nun immerhin schon von 261 der insgesamt 288 Teilnehmer (ca. 90%) korrekt-negative PCR/NAT-Ergebnisse für MRSA berichtet.

Zugegebenermaßen sind *mecA* dropout-Mutanten unter den MSSA-Patientenisolaten noch relativ selten und die Ergebniskonstellation dieses Ringversuchs sollte den diagnostischen Wert von SCCmec-basierten PCR-Testkonzepten in der mikrobiologischen Praxis nicht schmälern. Nicht zuletzt an den steigenden Prozentzahlen bzw. Richtigkeitsquoten der MSSA-Ergebnisse kann man aber unschwer die Bemühungen der Testentwickler und die damit verbundenen stetigen Verbesserungen an den PCR/NAT-Testkonzepten erkennen. Ungeachtet des verwendeten Testsystems wurde aber bei der Erstellung der Zertifikate ein positives Ergebnis für die Probe # 1925394 nicht als „falsch“ bewertet.

Für Kolleginnen und Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind und/oder überprüfen wollen, ob ihr spezifisches Testsystem *mecA*-Deletionsmutanten differenziert erfassen kann, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Darüber hinaus bestätigt das „besondere“ MSSA-Isolat der aktuellen Ringversuchsrunde erneut die Sinnhaftigkeit und auch die nach wie vor bestehende Notwendigkeit des im Rahmen der PCR/NAT-Ringversuchsdiskussionen bereits mehrfach thematisierten **begleitenden kulturellen Nachweises** von MRSA.

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 103 der insgesamt 288 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt, und mit Ausnahme von drei falsch-positiven PVL-Ergebnisse waren diese diesmal durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der nach wie vor hochaktuellen cMRSA- bzw. CA-MRSA-Problematik finden sich beispielsweise in Linde et al. [2] und Witte et al. [3]. Ein gut evaluiertes Realtime-PCR-Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in Reischl et al. [4].

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Amplex eazyplex MRSA plus (4x), VELA diagnostics Sentosa SA Direct MRSA Test (4x), alphaCube MRSA (1x), BD Max MRSA XT (1x), Mikrogen (1x), GenID MRSA combi (1x), Abacus Diagnostica GenomEra MRSA/SA (1x) und Gerbion (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 4er-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 Tabelle 1 (Anhang 1, S. 13) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit einer relativ hohen Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1925402; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL) und eine Probe mit etwa hunderdfach geringerer Menge (# 1925401; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL), eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL an *Mycoplasma pneumoniae* (# 1925403), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1925404), 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 Tabelle 2 (Anhang 1, S. 13) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch alle der insgesamt 120 Teilnehmer die Zielorganismen selbst in der etwas schwächer positiven Probe # 1925401 (ca. 1×10^4 IFU/mL) noch sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Mit ca. 5×10^5 IFU/mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1925402 diesmal eine relativ hohe Menge an *C. pneumoniae*-Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde letztere Probe ebenfalls von allen der insgesamt 120 Teilnehmer als (richtig-)positiv befundet.

Für die beiden Proben ohne Zielorganismen # 1925403 (*Mycoplasma pneumoniae*) und # 1925404 (humanes Zellmaterial und nennenswerte Menge an *E. coli*) wurden ebenfalls von 118 bzw. 119 der insgesamt 120 Teilnehmer richtig-negative Ergebnisse berichtet. Dies unterstreicht wieder einmal aufs Neue die hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA. Bei dem einen isoliert falsch-positiven Ergebnis könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung gehandelt haben. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit

DNA von Mykoplasmen oder *E. coli* erscheinen eher als unwahrscheinlich.

Die Teilnehmer haben entweder kommerzielle oder selbstentwickelte (Inhouse-)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 (Inhouse-)Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 12 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 3 Teilnehmern der Diagenode MP/CP Kit, von 7 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit und von 6 Teilnehmern der AID CAP Bacteria Kit angegeben.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Seegene Kits (10x), GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (8x), Mikrogen ampliCube Respiratory Bacterial Panel 1 (8x), fast-track Diagnostics Kits (6x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (5x), BD Max (4x), AmpliSens *M. pneumoniae*/*C. pneumoniae* (3x), Sacace Biotechnologies (3x), BioGx atypical pneumonia (2x), TIB Molbiol LightMix modular *C. pneumoniae* (1x), Luminex Respiratory Pathogen Panel Multiplex (1x), RespiFinder SMART (1x) und BioFire FILMARRAY (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 4er-Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Dieses Mal waren jedoch keine Proben mit geringen Mengen an Zielorganismen im ausgesandten Probenstet vertreten.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1925413 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ Genomkopien/mL), Probe # 1925411 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL) und # 1925414 mit einer etwa hunderdfach geringeren Menge an Zielorganis-

men (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^3$ Genomkopien/mL). Probe # 1925412 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*. Mit jeweils einer Ausnahme konnten die 139 Teilnehmer die DNA von *M. pneumoniae* in den Proben # 1925411 und # 1925413 zuverlässig nachweisen. Die Probe # 1925414 mit der geringsten Menge an Zielorganismus wurde immerhin von 133 Laboratorien als positiv für *M. pneumoniae*-DNA erkannt. Für die negative, mit *E. coli* versetzte Probe # 1925412 wurden lediglich von zwei der insgesamt 139 Teilnehmer des aktuellen Ringversuchs falsch-positive Ergebnisse berichtet. Hierbei könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung gehandelt haben. Inhibitionskontrollen wurden von allen 139 Teilnehmern mitgeführt und bei keiner der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsereignisse beobachtet. Zusammenfassend bleibt anzumerken, dass wie bereits in vorausgegangenen Ringversuchsrunden die PCR/NAT-gestützte Diagnostik von *Mycoplasma pneumoniae* in vielen Labors robust und zuverlässig implementiert ist. Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 101 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Diagnostics Kits (11x), Seegene Kits (10x), Mikrogen ampliCube Respiratory Panel 1 (7x), ARGENE Ch/Myco. *pneumoniae* r-gene Kit (6x), AmpliSens *M. pneumoniae*/C. *pneumoniae*-FRP PCR Kit (3x), BioGx atypical pneumonia (3x), Sartorius Microart ATMP Mycoplasma (2x), Eazplex PneumoBug expert (2x), BD Max (2x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (1x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (1x), TIB Molbiol LightMix modular (1x), BioFire FILMARRAY (1x), RespiFinder (1x), Sacace Biotechnologies (1x), Ingenetix (1x), Meridian Bioscience Alethia Illumipro 10 (1x) und Minerva Venor GeM qEP (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 C. burnetii- und B. 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 enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *C. burnetii* ($\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1925424 und $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1925421), zwei Proben mit DNA des *B. anthracis*-„Pasteur“-Isolats

($\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL in Probe # 1925422 und $\sim 5 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1925421), eine Probe mit DNA des *B. anthracis*-UR-1-Isolats ($\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1925424), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1925423), 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 *Coxiella burnetii* in den Tabellen 2 und 3 (Anhang 1, S. 15) sowie für *Bacillus anthracis* in den Tabellen 4 und 5 (Anhang 1, S. 16).

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Altona diagnostics RealStar Anthrax PCR Kit (3x), Progenie RealCycler *Coxiella burnetii* (3x), Sacace Biotechnologies *C. burnetii* Real-TM (1x), a-Cube (1x), Life Technologies LSI VetMAX Absolute quant. *C. burnetii* (1x) und Master diagnostica Tick-borne bacterial flow chip (1x).

***Coxiella burnetii*:** Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich einfach. Sowohl die etwas stärker positive Probe # 1925424 mit ca. 5×10^4 Genomkopien *C. burnetii*/mL als auch die zweite positive Probe # 1925421 des Probesets (ca. 1×10^4 Genomkopien/mL) wurden von allen der insgesamt 41 Teilnehmer mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Diese Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus den vorherigen Ringversuchen. Bei der Probe ohne Zielorganismus # 1925423 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie der zweiten „negativen“ Probe # 1925422, welche ca. 1×10^6 Genomkopien/mL *Bacillus anthracis*-DNA enthielt, wurden insgesamt 2 falsch-positive sowie ein fragliches Ergebnis berichtet. Mit 33 diagnostischen Labors, welche Inhouse-Testsysteme zum spezifischen Nachweis von *C. burnetii* verwenden, waren die selbstentwickelten Assays den vorkonfektionierten kommerziellen Testkits zahlenmäßig überlegen. Ausnahmslos enthielten die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA aller Teilnehmer eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

***Bacillus anthracis*:** Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Alle 22 Teilnehmer konnten mit ihren jeweils vor Ort etablierten *B. anthracis*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die negative Probe ohne entsprechende Zielorganismen # 1925423 korrekt als negativ befunden. Von 21 der 22 Teilnehmer wurden korrekt-positive Ergebnisse für die Proben # 1925422 und # 1925424 berichtet. Die Probe # 1925422 enthielt **B. anthracis-Stamm Pasteur**: dieser ist zwar **positiv für das Virulenzplasmid pXO2 und die B. anthracis-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker rpoB und dhp61**, jedoch (im Gegensatz zum Stamm UR-1) **negativ für das**

letal- und Ödem-Factor, sowie Protektives Antigen („kodierende“) Virulenzplasmid pXO1. Die Probe # 1925424 enthielt *B. anthracis*-Stamm UR-1, $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL und *C. burnetii* $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL). Mehr Probleme bereitete die dritte positive Probe # 1925421 (*B. anthracis*-Stamm Pasteur, $\sim 5 \times 10^3$ Genomkopien/mL). Hier erfolgte nur von 15 Teilnehmern eine korrekte Klassifizierung der Probe; berichtet wurden zudem 5 negative und 2 fragliche Ergebnisse. Diese positive Probe enthielt zugegebenermaßen eine recht niedrige Menge des Zielorganismus, weshalb wir bei den negativen Ergebnissen ein Auge zudrücken. Dennoch sollte die Probe zum Anlass genommen werden, sich die Sensitivität des eigenen Testsystems vor Augen zu führen. 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 *F. tularensis*-DNA und *Brucella* spp.-DNA** aus geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tabelle 1, Anhang 1, S. 17) enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *F. tularensis* subsp. *holarctica*-DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in Probe # 1925432 und $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in Probe # 1925433), drei Proben mit verschiedenen Mengen an *Brucella melitensis*-DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in Probe # 1925431 und $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL in Probe # 1925432 und $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in Probe # 1925433), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1925434), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Master diagnostica Tick-borne bacterial flow chip (1x), Applied Biosystems *Brucella* (1x) und Sacace Biotechnologies *Brucella* Real-TM (1x).

***Francisella tularensis*:** Kurz und knapp: 24 bzw. 22 der insgesamt 25 Teilnehmer haben die beiden positiven Proben (# 1925432 und # 1925433) korrekt klassifiziert. Für die beiden negativen Proben (# 1925431 und # 1925434) wurden mit Ausnahme jeweils eines fraglichen Ergebnisses korrekt-negative Resultate übermittelt.

***Brucella* spp:** Hier galt es diesmal, 3 positive Proben zu detektieren: # 1925431 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), # 1925433 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und # 1925432 (1×10^3 CFU/mL). Mit absteigender Menge des Zielorganismus bereitete diese „Verdünnungsreihe“ den Teilnehmern Probleme. Während die am stärksten positive Probe # 1925431 von allen 23 Teilnehmern korrekt als positiv berichtet wurde, fanden sich bei der Probe mit zehnfach geringerer Erregermenge (# 1925433) bereits 2 falsch-negative und ein fragliches Ergebnis. Die am schwächsten positive Probe (# 1925432) wurde nur noch von 8 (!) Teilnehmern als positiv bewertet. Die Menge des Zielorganismus in dieser Probe war zugegebenermaßen sehr gering, die Probe wurde daher als „edukativ“ klassifiziert und aus der Wertung genommen. Aber es schadet sicherlich nicht, sich der Sensitivität seines Testsystems bewusst zu sein. Ausnahmslos wurden Inhibitionskontrollen mitgeführt, Inhibitionsergebnisse wurden jedoch nicht beobachtet.

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 Tabelle 1 (Anhang 1, S. 19) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1925441 enthielt *Klebsiella oxytoca*-Zielorganismen mit den Genen für KPC-3 und VIM-1 (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL), Probe # 1925443 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit dem OXA-245-Gen (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL) und Probe # 1925444 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit dem NDM-9-Gen (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 1925442 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

Alle 86 Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in der Probe # 1925441 fest. Für die Probe mit NDM-9-positiver *K. pneumoniae* (# 1925444) wurden mit einer Ausnahme korrekte Ergebnisse berichtet. Hoch lag die Richtigkeitsquote auch für die Probe # 1925442, hier berichteten alle Teilnehmer die Probe als „Carbapenemase-negativ“. Kleinere Schwächen zeigten sich bei der Detektion der OXA-245-positiven *K. pneumoniae* in Probe # 1925443, die 8 Teilnehmern

offenbar „durchrutschte“. Grund hierfür ist möglicherweise, dass das OXA-245-Gen gerade in einigen Multiplex-PCR/NAT-Testformaten nicht als Target enthalten ist.

Hier noch ein kurzer **aktueller Kommentar von Frau Dr. Agnes Anders vom NRZ für gramnegative Krankenhausreger**: Interessanterweise haben wir bei der Auswahl der letztjährigen Stämme offenbar hellseherische Fähigkeiten bewiesen. Der Ringversuch November 2018 enthielt nämlich zwei Stämme, deren Carbapenemasen denen diesjähriger Ausbruchsstämme entsprachen (siehe auch [5], [6]). Das Robert Koch-Institut und das Nationale Referenzzentrum für gramnegative Krankenhausreger bitten um Mithilfe bei der Aufklärung der bundesweiten Häufung von *E. coli* mit einer Carbapenemase vom Typ OXA-244. Hierfür müssen Carbapenemasen vom Typ OXA-48-like weitergehend differenziert und an die Gesundheitsämter entsprechend übermittelt werden. Die alleinige Angabe von „OXA-48-like-Carbapenemase“ kann zum Übersehen dieses Ausbruchsstamms führen. **Deshalb bietet das NRZ für gramnegative Krankenhausreger kostenfrei eine genauere Differenzierung an, wenn Laboratorien nicht über die technischen Möglichkeiten verfügen, OXA-48-like-Carbapenemasen weiter zu differenzieren und somit OXA-244 zu diagnostizieren.** Gute Voraussetzung zur Erkennung des zweiten Ausbruchsstamms erfüllten Sie, wenn Sie in der Lage waren, die beiden Carbapenemasen aus dem Ringversuch November 2018 (NDM-1 und OXA-48) simultan zu detektieren.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Direktnachweis von Carbapenemase-Genen aller Teilnehmer enthielten mit einer Ausnahme eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Seegene Kits (5x), AID Carbapenemase (2x), Sacace Biotechnologies MDR MBL Real-TM (1x), Sacace Biotechnologies MDR KPC/OXA Real-TM (1x), AmpliGnost Carbapenemase PCR Kit von PIIM Karlsruhe (1x), Amplex eazypex SuperBug complete A (1x), GenID Carbapenemase (1x) und BD Max CPO 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 geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 21) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1925451 mit einer hohen Menge an *Clostridium difficile*, ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL), Probe # 1925454 mit ca. zehnfach geringerer Menge ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL)

sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1925452 und # 1925453), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden *Clostridium difficile*-positiven Proben # 1925451 und # 1925454 wurden erfreulicherweise von 148 bzw. 146 der 149 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ klassifiziert. Falsch-negative Ergebnisse sollten auch hier 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. Letzteres gilt insbesondere für die Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen für die lediglich *E. coli*-enthaltenden Proben # 1925452 und # 1925453. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich. Inhibitionskontrollen wurden durchwegs mitgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse wurden für keine der Proben berichtet. Wie in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 21) angegeben, verwendete der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme, während selbstentwickelte Testkonzepte in 11 Laboratorien zum Einsatz kamen. In dieser Ringversuchsrunde zeigten sich (vergleichbar mit der vorausgegangenen) zwischen den kommerziellen Testsystemen und den Eigenentwicklungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Alethia illumigene (8x), Altona diagnostic RealStar *C. difficile* PCR Kit (7x), HAIN Lifescience Kits (7x), Seegene Allplex GI Bacteria Assay (5x), Amplex eazypex *C. difficile* complete Assay (3x), BD Max *C. difficile* assay (2x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (2x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B von PIIM Karlsruhe (2x), TIB Molbiol Modular Dx Kit (2x), TIB Molbiol LightMix (1x), fast-track Diagnostics *C. difficile* (1x), Abacus Diagnostica GenomEra *C. difficile* (1x) und Solana (1x).

RV 546: VRE

Der neu ins Ringversuchsprogramm aufgenommene 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 geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 22) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1925461 mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecalis* vanA-resistent, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), Probe # 1925464 mit ca. der gleichen Menge (*Enterococcus faecium* vanA-resistent, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1925463 mit ca.

$\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *Enterococcus faecalis*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1925462), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden VRE-positiven Proben # 1925461 und # 1925464 (je ca. $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) mit vanA- bzw. vanA- und vanB-tragenden Enterokokken mit insgesamt nur zwei Ausnahmen von den Teilnehmern korrekterweise als „VRE-positiv“ klassifiziert.

Von den eingereichten 53 vanA/vanB-Differenzierungen waren 48 korrekt. Auch die beiden „negativen“ Proben # 1925462 und # 1925463 mit *E. coli* bzw. *E. faecalis* wurden diesmal ausnahmslos als „VRE-negativ“ befundet. Gerade der Nachweis von VRE verkompliziert das Management und ggfs. eine erforderliche antibiotische Therapie erheblich, sodass „Laborenten“ unbedingt vermieden werden müssen. Bei den eingesetzten Testsystemen überwogen kommerziell erhältliche, vorkonfektionierte Systeme gegenüber den Eigenentwicklungen.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Seegene eazyplex VRE Allplex Entero DR Assay (6x), BioGx Vancomycin resistance (2x), Roche LightCycler VRE Detection Kit (1x), TIB Molbiol (1x), Amplex eazyplex VRE (1x) und AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz differenz. von PIMM Karlsruhe (1x).

RV 547: Urogenital panel

Nach intensiven Vorarbeiten zum Proben-Design, zur praktischen Umsetzung und der Aussendung von zwei sogenannten „Piloten“ wird der komplexe Ringversuch RV 547 „Urogenital-Panel“ zukünftig im Rahmen des regulären Ringversuchsprogramms von INSTAND e.V. durchgeführt und die Ergebniskonstellation hier diskutiert. Das überaus heterogene Spektrum an eingesetzten Testsystemen erschwert natürlich nach wie vor eine strukturierte und übersichtliche Auswertung der auf den Report-Formularen mitgeteilten Ergebnisse. Daher haben wir im Vergleich zu den übrigen Ringversuchen der hier diskutierten Ringversuchsreihe „Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT“ die ursprüngliche Tabelle 3 etwas differenzierter dargestellt (jetzt: „erregerspezifische“ Auswertung in den Tabellen 2 bis 7, Anhang 1, S. 23–25). 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 können. Im Großen und Ganzen haben die 68 aktuell registrierten Teilnehmer die Erreger in den 4 Einzelproben entsprechend den methodischen Möglichkeiten ihrer Testsysteme zufriedenstellend nachweisen können. Wie aus den Tabellen 2 bis 7 (Anhang 1, S. 23–25) zu entnehmen, wurden insgesamt nur sehr wenige (sporadische) falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse berichtet.

So wurden in der aktuellen Ringversuchsrunde vereinzelt falsch-positive sowie falsch-negative Ergebnisse für *Trichomonas vaginalis* oder *Gardnerella vaginalis* beobachtet, und von einem Teilnehmer wurde innerhalb des aktuellen Sets bei der *Mycoplasma genitalium*-positiven Probe # 1925474 ein positives Ergebnis für *Treponema pallidum*-DNA berichtet. Bei den falsch-positiven Befunden könnte es sich eventuell um labor- oder testinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung gehandelt haben. Inhibitionskontrollen wurden von 22 Teilnehmern mitgeführt und nur von einem Teilnehmer wurden bei 2 Einzelproben des ausgesandten 4er-Sets Inhibitionsergebnisse beobachtet.

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.

Wie bereits in der vorhergehenden Ringversuchsdiskussion erwähnt, haben wir für im Rahmen der Online-Ergebnisübermittlung des RV 547 eine Option in der Eingabemaske entwickelt, über die die einzelnen Teilnehmer das aktuell erfasste Erregerspektrum ihrer individuellen Testsysteme und Multiplex-Assays während der Ergebniseingabe mitteilen. Für die Erteilung von Zertifikaten macht es nachvollziehbarerweise nur Sinn, dass diejenigen Parameter bewertet und testiert werden, die von den individuellen Teilnehmern im Rahmen ihres diagnostischen Workflows prinzipiell auch als positiv bzw. negativ erfasst werden können.

Der Ringversuchsleiter ist natürlich stets für weitere konstruktive Kommentare und Vorschläge aus dem Teilnehmerkreis dankbar. Trotz des relativ vielfältigen Spektrums an unterschiedlichen Testsystemen und -konzepten werden wir uns nach Kräften bemühen, die Teilnehmer bei den zukünftigen Ringversuchsrunden mit aussagekräftigen Zertifikaten versorgen zu können.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Seegene Allplex STI Essential Assay, Seegene Allplex Genital ulcer Assay, Seegene Allplex Bacterial Vaginosis plus Assay, Seegene STARMag96, Seegene eazyplex STD complete, Seegene Anyplex STI-5 Detection, fast-track Diagnostics Kits, TIB Molbiol LightMix modular, AmpliGnost von PIMM Karlsruhe, bioGx Mycoplasma-Ureaplasma, Bioron *Ureaplasma*, *Trichomonas*, *M. hominis/genitalium*, *Gardnerella*, EUROIMMUN EUROarray STI-11, Hain Lifescience FluoroType STI, GenID STI Kit, Mikrogen ampliCube STD Panel 2, Mikrogen STD Panel, r-Biopharm RIDAGENE Kits und Roche Cobas TV/MG (1x).

RV 560: Pneumocystis jirovecii

Der Ringversuch „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direkt-nachweis von *Pneumocystis jirovecii*-DNA** in geeigneten

klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-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 wieder drei positive Proben (siehe Tabelle 1, Anhang 1, S. 26): eine Probe mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (# 1925602; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^5 Organismen/mL), eine Probe mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1925603; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^4 Organismen/mL), eine Probe mit ca. zwanzigfach geringerer Menge (# 1925601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 5×10^3 Organismen/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1925604) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanem Zellmaterial.

Die „negative“ Probe # 1925604 wurde diesmal von allen der insgesamt 120 Teilnehmer korrekterweise als negativ für den Zielorganismus *Pneumocystis jirovecii* befundet. Bei den „positiven“ Proben wurde Probe # 1925602 mit $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL von allen Teilnehmern richtig klassifiziert. Die schwächer positive Probe # 1925603 (ca. 1×10^4 Organismen/mL) wurde von allen bis auf einen der 120 Teilnehmer korrekt als „positiv“ gewertet. Für die Probe mit dem geringsten Gehalt an Zielorganismen (#1925601, ca. 5×10^3 *Pneumocystis jirovecii* Organismen/mL) berichteten bereits 14 Laboratorien falsch-negative Ergebnisse und ein Teilnehmer klassifizierte hier seinen Befund als „fraglich“.

Zugegebenermaßen ist in letzterer Probe die vorhandene Menge an Zielorganismus relativ gering, sodass die mitgeteilten „negativen“ Ergebnisse dieser Probe im Zuge der Zertifikatserstellung nicht als falsch gewertet werden. Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern durchgeführt und dabei wurden keine signifikanten Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Diagnostics *P. jirovecii* PCR Kit (9x), Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (8x), BioGx *P. jirovecii* (4x), eazyplex *P. jirovecii* (3x), Biolegio Atypical Pneumonia-1 Assay (3x), Amplex eazyplex *P. jirovecii* (1x), AmpliSens *P. jirovecii* FRT (1x), Ademtec MYCOgenie (1x) und pathoNostic PneumoGenius (1x).

Anhänge

Verfügbar unter

<https://www.egms.de/de/journals/lab/2020-11/lab000037.shtml>

1. Anhang1_lab000037.pdf (388 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ November 2019

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. Mikrobiologe. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem Staphylococcus aureus: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Pantone-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant Staphylococcus aureus: impact of Pantone-Valentine leukocidin]. Dtsch Med Wochenschr. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with Pantone-Valentine leukocidin genes in central Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24(1):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
5. Robert Koch Institut. Überregionale Häufung von Carbapenemase-produzierenden Enterobacterales bei Krankenhauspatienten. Epidemiologisches Bulletin. 2019 Jul 18;29:271. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/29_19.pdf
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Outbreak of carbapenemase-producing (NDM-1 and OXA-48) and colistin-resistant Klebsiella pneumoniae ST307, north-east Germany, 2019. ECDC: Stockholm; 2019. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Klebsiella_pneumoniae-resistance-Germany-risk-assessment.pdf

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, Ehrenschröder 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 November 2019 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab. 2020;11:Doc02.
DOI: 10.3205/lab000037, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000376

Artikel online frei zugänglich unter

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2020-11/lab000037.shtml>

Veröffentlicht: 28.05.2020

Copyright

©2020 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 November 2019 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 schemes (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 INSTAND e.V. website (<https://www.instand-ev.de>). Although the preferred language of these documents is German, we aim 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 Ehrenschröder¹
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 November 2019

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

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

The current set of QC samples contained three samples with similar amounts of *C. trachomatis* ($\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL in samples # 1925302 and # 1925303, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL in sample # 1925301) and three samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms: $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1925304, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 1925301, and $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL in sample # 1925302.

Due to the relatively high amounts of *C. trachomatis* target organisms in the three positive samples of the current distribution, all but four of the 256 participants reported correct-positive CT results for samples # 1925301, # 1925302 and # 1925303. For the CT-negative sample # 1925304, only 5 false-positive results were noted. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 15 of the 256 participants for sample # 1925302, which contained a relatively low number of *N. gonorrhoeae* target organisms (1×10^3 CFU/mL) next to a high amount of *C. trachomatis* (5×10^5 IFU/mL). Also 4 false-positive results for the GO-negative sample # 1925303 were reported by the participants. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, contamination events of the GO-negative sample “3” by target organisms or PCR products of the positive samples “1” or “2” are by

far not unlikely in the current sample constellation. As a consequence, observation of false-positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their GO-specific NAT-based test system.

Since the amount of target organisms in the GO-positive sample # 1925302 could not be considered as “extremely low”, false-negative results should also encourage the corresponding participants to carefully investigate and optimize their GO-specific NAT-based assays (or at least the GO-specific components if they are using multiplex assay concepts).

Inhibition controls were included by nearly all of the participants and no inhibitoric events were reported. Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity were observed for the *C. trachomatis*- and *N. gonorrhoeae*-specific NAT assays used by the 256 participants.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three positive samples: # 1925311 and # 1925313 with $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Samples # 1925312 and # 1925314 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in Table 2 (Attachment 1, p. 4), the reported results were generally correct for the two *C. trachomatis*-positive samples. For the two *C. trachomatis*-negative samples # 1925312 and # 1925314, containing only non-infectious human cells and *E. coli*, only two false-positive results were observed by two laboratories among the 65 participants.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the “negative” sample “2” or “4” by target organism or PCR product carry-over from the positive samples “1” and “3” might have occurred within the sample prep and amplification workflow of the affected laboratory. In general, the observation of false-positive and/or false-negative results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system. However, this striking match of the current results with observations and accuracy rates during the past distributions of our EQAS scheme can again be considered as evidence for the high

reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing.

Run controls were performed by nearly all of the 65 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 65 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1925321; 5×10^5 CFU/mL), one sample with an approximately ten-fold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1925324; 5×10^4 CFU/mL), one sample with an approximately hundred-fold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1925323 with $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1925322).

The availability of well-established commercial or in-house NAT assays has led to a high portion of correct results. All of the 155 participants reported correct-positive results for the relatively strong positive sample # 1925321 (*B. pertussis*, 5×10^5 CFU/mL). Sample # 1925324, which contained $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL of *Bordetella pertussis*, was correctly tested by 153 of the 155 participants, whereas only 133 of the participating laboratories observed positive PCR/NAT results for *B. pertussis* DNA with the weak positive sample # 1925323. It should be noted that the amount of 5×10^3 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms is significantly above the previously observed lower limit of detection for the corresponding PCR assays or test systems. However, given the relatively small amount of target organisms in the sample # 1925323, reported results were not included in the assessment for the EQAS certificates. This fact is characterized by the three gray shaded boxes in Table 2 (Attachment 1, p. 5).

Sample # 1925322 of the current distribution contained only *E. coli*. All participants correctly reported this sample as negative for *Bordetella pertussis* DNA.

For the detection of *B. pertussis*, most participants used self-developed (in-house) test systems with inhibition and/or positive controls. According to our report files, 54 participating laboratories indicated the use of the IS481 insertion sequence, 12 the pertussis toxin coding gene, and 5 participants mentioned ribosomal genes as the PCR/NAT target region. Run controls were performed by 154 of 155 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 three samples with a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain in a kind of dilution series. Sample # 1925333 contained approximately 5×10^5 CFU/mL, sample # 1925331

approximately 5×10^4 CFU/mL, and sample # 1925332 approximately 5×10^3 CFU/mL of the respective target organisms.

The availability of well-evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in the two *Helicobacter pylori*-positive samples (# 1925333: $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL and # 1925331: $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) led to correctness values of 100% for the positive as well as for the negative result (sample # 1925334) reported by the 47 participants. For the weaker positive sample # 1925332, all but 2 of the participating laboratories observed correct-positive PCR/NAT results for *Helicobacter pylori* DNA.

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 probe-based qPCR assays. Results for clarithromycin resistance were reported by 41 of the 47 participants for the three *H. pylori*-positive samples of the current distribution. With the exception of one result, all of the reported molecular clarithromycin 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: # 1925342 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive) and # 1925343 (*E. coli*, 1×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*_{1a}-positive, *stx*₂-negative, *eae*-positive and *hlyA*-positive). The other two EHEC-negative samples contained a *Salmonella enterica* ser. Enteritidis strain (sample # 1925341; 5×10^4 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1925344).

Almost all of the 133 participants reported correct EHEC/STEC-negative results for sample # 1925341, containing only *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. The second "negative" sample (# 1925344), containing only *E. coli* K12 was with one exception also correctly reported as EHEC/STEC-negative by all of our participants. For the EHEC/STEC-positive samples # 1925342 and # 1925343, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation (and relatively high numbers of target organisms present in the respective samples) resulted in consistently high accuracy rates. Sample # 1925343 was correctly reported EHEC/STEC-positive by 132 of the 133 participants, while all of the 133 participants observed correct-positive PCR/NAT results for sample # 1925342.

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 analytical sensitivity or lower limit of detection. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 113 of the 133 participating laboratories. Except of two molecular typing results, all of the reported results were correct. None of the participants observed significant inhibition of the PCR/NAT reaction with the samples of the current distribution.

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.

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *B. afzelii* organisms in our proprietary matrix: sample # 1925352 (5×10^5 *B. afzelii* organisms/mL), sample # 1925351 (5×10^4 organisms/mL) and sample # 1925353 (5×10^3 organisms/mL). Sample # 1925354 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

With the exception of one false-negative result and two results classified as “questionable” for sample # 1925353 (containing the lowest amount of target organisms), one false-negative result for samples # 1925351 and # 1925352 (containing the highest amount of target organisms), the three *B. afzelii*-containing samples were correctly identified by the 100 participating laboratories. At least the three false-negative results for the positive samples should prompt re-evaluation of the assay’s sensitivity. The “negative” sample # 1925354 was classified false-positive by one laboratory and one participant reported a “questionable” PCR/NAT result for *B. burgdorferi* DNA. Potentially, the false-positive results are probably due to contamination events during sample preparation or analysis. Therefore, the workflow should be optimized to minimize clinically misleading false-positive results for the detection of *B. burgdorferi*.

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. There were also no significant differences in test performance between commercially available kits and in-house assays for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

RV 536: *Legionella pneumophila*

Referring to some recent requests of candidate participants: this EQAS panel is designed exclusively for assessment of PCR/NAT-based methods and protocols for direct detection of low amounts of *Legionella pneumophila* from appropriate clinical specimen (such as respiratory specimens for example). 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 newly established methods or protocols with the help of an external quality control.

In order to assess the analytical sensitivity of certain *Legionella pneumophila*-specific PCR assays, the current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Legionella pneumophila* serogroup 1: sample # 1925364 (5×10^5 CFU/mL), sample # 1925361 (5×10^4 CFU/mL), and sample # 1925362 (5×10^3 CFU/mL). Sample # 1925363 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive samples # 1925361 ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) and # 1925364 ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) were correctly tested positive by 112 and 111 of the 114 participating laboratories, respectively. For the third positive sample within the current distribution, # 1925362, which contained a significantly lower amount of *L. pneumophila* target organisms ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), only 92 of the 114 participants reported a correctly positive result. With an amount of 5×10^3 CFU/mL of *L. pneumophila*, the lower limit of detection of several PCR/NAT test systems and analytical workflows is obviously reached, and the results for the latter sample were not considered in the course of issuing the certificates. Since the amount of target organisms in *L. pneumophila*-positive samples # 1925361 and # 1925364 could not be considered as “extremely low”, false-negative results should encourage the participants to review and optimize the workflow and concept of their individual *L. pneumophila*-specific PCR/NAT assays.

Sample # 1925363, which contained only *E. coli*, was classified as false-positive by two laboratories. This is probably due to contamination events in the course of sample preparation or PCR/NAT amplification. All participants have included inhibition controls in their test systems and no significant inhibitions of the PCR/NAT reactions were observed or reported.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained one sample with *Salmonella enterica* serovar enteritidis (sample # 1925374 with 1×10^5 CFU/mL. Sample # 1925372 contained *Salmonella enterica* serovar paratyphi (with 5×10^4 CFU/mL), sample # 1925373 contained *Salmonella enterica* serovar tennessee (with 5×10^5 CFU/mL) and

sample # 1925371 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

All of the 24 participants reported correct *Salmonella enterica*-positive PCR/NAT results for sample # 1925373 and correct results for the negative sample # 1925371. Sample # 1925372, containing $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL *Salmonella enterica* serovar *paratyphi*, and # 1925374, containing $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*, were correctly identified as “positive” by 23 of the 24 participants. Reporting a false-negative result for these samples should prompt a thorough re-evaluation of the performance of the test system.

Inhibitory events in the PCR/NAT reaction were not detected by any of the 24 participants.

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1925384; only *E. coli* cells), and three samples positive for *L. monocytogenes* (# 1925381, # 1925382 and # 1925383). The *Listeria monocytogenes*-containing samples # 1925381 (with 5×10^5 CFU/mL of *L. monocytogenes*) and # 1925382 (with 5×10^4 CFU/mL of *L. monocytogenes*) were correctly reported positive by all of the 43 participants. In addition, the “negative” *E. coli* containing sample # 1925384 was also correctly identified as negative by all laboratories. Most of the participants used very sensitive *Listeria monocytogenes*-specific assays, which is reflected by the high number of correctly positive results for sample # 1925383, containing only 1×10^3 CFU/mL of *L. monocytogenes*. Only 8 of the 43 participants observed a false-negative PCR/NAT result for this very weak positive sample. Due to the relatively small amount of target organisms in sample # 1925383, the respective results were not included in the assessment for the EQAS certificates.

It should be noted that 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 aim to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs. Consequently, 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.

Samples # 1925391 and # 1925393 of the current set contained a relatively high number of **methicillin-resistant** *S. aureus* isolate (MRSA, PVL-negative; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL and $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL respectively), sample # 1925394 of the current set contained relatively high amounts of a **mecA dropout** MSSA isolate, and only *E. coli* and human cells were present in sample # 1925392 of the current distribution.

The MRSA-negative sample # 1925392 was correctly reported negative by 283 of the 288 participants. Only two participants classified their results as “questionable” and three participants reported false-positive results, presumably due to intra-laboratory contamination events from the highly positive sample # 1925391 during the sample preparation, amplification or detection. The MRSA-positive samples # 1925391 and # 1925393 were correctly reported positive by 286 and 282 of the 288 participants, respectively. Participants with false-negative results are encouraged to analyse and optimize their PCR/NAT-based assays, because the amount of MRSA target organisms in samples # 1925391 and # 1925393 (1×10^5 and 5×10^5 CFU/mL) were not abnormally low.

Twenty-three false-positive MRSA results were reported for MSSA sample # 1925394 and four participants classified their results as “questionable” for MRSA. The apparently “bad” performances for this MRSA-negative sample are quickly explained on closer inspection: it contained one of the yet still relatively rare *S. aureus* strains that belongs to the group of so-called **mecA dropout MSSA** isolates: Oxacillin-sensitive *S. aureus* strains which contain the MRSA-typical SCCmec cassette, but significant parts or the entire *mecA* gene are deleted on the genomic level. Consequently, only 261 of the 288 participants reported correct-negative MRSA results for this tricky sample. Compared to the previous rounds of PCR/NAT external quality assessment, a much better diagnostic performance was observed for this variant *S. aureus* genetic constellation. The *mecA* dropout variant, sent out formerly in the November 2012 distribution, was detected by 30% of the participants. A similar *mecA* dropout variant MSSA strain, sent out in the November 2015 distribution, was detected by 53% of the participants, whereas around 90% (!) of the participants correctly reported MRSA-negative results in the current distribution. This situation nicely reflects the various (and obviously successful) efforts of diagnostic companies and in-house assay development teams to continuously improve and adapt their protocols to the current challenges of direct PCR/NAT testing for MRSA.

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 115 of the 288 participating laboratories, and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were correct in all but three cases. Additional information can be found in Linde et al. [2] and Witte et al. [3]. A well-evaluated protocol for

the detection of PVL-positive PVL isolate can be found in Reischl et al. [4].

In addition, commercial real-time PCR assays reliably targeting PVL genes in MRSA and MSSA isolates are now available (for example: r-biopharm and 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 intended to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory materials. Consequently, 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 # 1925402 was spiked with $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL of *C. pneumoniae*, whereas sample # 1925401 contained an approximately ten-fold lower number of *C. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL). Sample # 1925403 contained significant numbers ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) of *Mycoplasma pneumoniae* organisms to assess analytical specificity. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1925404.

As depicted in Table 2 (Attachment 1, p. 13), all of the 120 participants reported correct results for the strong-positive sample # 1925402, and all of the participants also reported correctly positive results for the slightly weaker positive sample # 1925401, which still contained a relatively high concentration of *C. pneumoniae* target organisms (1×10^4 IFU/mL). Only one participant classified his result as “questionable” for the negative sample # 1925404 (*E. coli* and non-infected human cells) and one participant reported a false-positive result for the negative sample # 1925403 (containing a significant number of *Mycoplasma pneumoniae* organisms), which could probably be 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.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

A 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* ($\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1925413. An approximately ten-fold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL) was present in sample # 1925411, and sample # 1925414 contained an approximately hundred-fold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^3$ genome copies/mL). The set was completed by sample # 1925412, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli*. With the exception of 2 laboratories, all of the 139 participants correctly reported samples # 1925411 and # 1925413 positive for *M. pneumoniae* DNA. The third positive sample with a relatively low amount of the target organisms (#1925414) was correctly identified by 133 participants. Sample # 1925412, which contained only human cells and *E. coli*, was correctly reported as negative for *M. pneumoniae* DNA by 137 laboratories. Only two participants observed false-positive results for the “negative” sample, which could be 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.

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

A 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 *B. anthracis* 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. Consequently, 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 samples with different amounts of *Coxiella burnetii* organisms ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1925424 and $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1925421), one sample with $\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL of *Bacillus anthracis* (sample # 1925424) and two samples with $\sim 1 \times 10^6$ and $\sim 5 \times 10^3$ genome copies/mL of a *Bacillus anthracis* Pasteur Strain (sample # 1925422 and sample # 1925421, respectively). Sample # 1925423 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 organism within this combined EQAS scheme in two separate tables: please see Tables 2 and 3 (Attachment 1, p. 15) for the *C. burnetii*-specific results and Tables 4 and 5 (Attachment 1, p. 16) for the *B. anthracis*-specific results.

***Coxiella burnetii*:** The relatively high amount ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1925424 was correctly reported by all participants, as well as the five-fold lower concentration of the pathogen in sample #1925421. The two “negative” samples (#1925423 contained only *E. coli* and #1925422 contained only *B. anthracis*) were correctly reported negative by all but three 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*:** The results for this newly introduced EQAS scheme are easily discussed. 21 of the 22 participants correctly reported positive results for sample # 1925422 ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL) and # 1925424 ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL). The third “positive” sample # 1925421 contained $\sim 5 \times 10^3$ genome copies/mL of *B. anthracis* strain “Pasteur”. Only 15 participants reported correct results for this sample. This particular strain is positive for the virulence plasmid pXO2 and the *B. anthracis*-specific chromosomal markers *rpoB* and *dhp61*, but does not harbor “protective antigen, lethal and edema factor” encoding plasmid pXO1, and is therefore also negative for the commonly used pathogenicity marker *pagA*. All participants correctly reported negative results for the “negative” sample # 1925423 (containing *E. coli* and human cells). After this very successful round of external quality 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 (U. Reischl).

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

A 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. Consequently, 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 (Table 1, Attachment 1, p. 17) contained two samples with different amounts of *F. tularensis* subsp. *holarctica* DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1925432 and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 1925433), three samples with different amounts of

Brucella melitensis DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1925431, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL in sample # 1925432, and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 1925433). Sample # 1925434 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

***Francisella tularensis*:** Similar to QC samples from past distributions, the positive samples # 1925432 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *F. tularensis* spp. *holarctica*) and # 1925433 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *F. tularensis* spp. *holarctica*) were correctly tested positive by 24 and 22 of the 25 participating laboratories, respectively.

***Brucella* spp.:** The ‘positive’ samples # 1925431 and # 1925433 were correctly reported by 23 and 20 of the participating laboratories, respectively. The third positive sample #1925432 contained a relatively low amount of the target organism ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL), and only 8 participants correctly reported positive results. The sample without target organism (# 1925434) was correctly classified as ‘negative’ by all laboratories. 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 Table 1 (Attachment 1, p. 19), the current set contained three samples with different carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1925441 contained a *Klebsiella oxytoca* isolate with two carbapenemase genes: KPC-3 and VIM-1 ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL), sample # 1925443 contained a *Klebsiella pneumoniae* with an OXA-245 gene ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL), sample # 1925444 contained *Klebsiella pneumoniae* with a NDM-9 gene ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL). The fourth sample # 1925442 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes. All participating laboratories reported sample # 1925441 (*K. oxytoca* carrying a KPC-3 & VIM-1 carbapenemase) as “carbapenemase-positive”. Notably, 8 of the 86 participants missed the carbapenemase gene in sample # 1925443 (*K. pneumoniae* carrying OXA-245). The third “positive” sample # 1925444 (containing *K. pneumoniae* with an NDM-9 gene) was correctly reported by 85 of the 86 participants. Additionally, no false-positive results were submitted for sample # 1925442, which contained carbapenemase-negative *E. coli* K12.

Interestingly, two of last year's samples (November 2018 distribution) turned out to be candidates for two outbreaks this year in Germany (see [5], [6]).

Laboratories can support the outbreak investigation initiated by the Robert Koch Institute and German National Reference Laboratory if the lab is able to specify and report OXA-48-like carbapenemases as OXA-244 carbapenemases. If this is not the case, the German National Reference Lab may help you free of charge to identify OXA-48-like carbapenemases. The second outbreak strain requires the ability to detect two carbapenemases simultaneously (NDM-1 and OXA-48).

RV 545: *Clostridium difficile*

A 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 aim 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 # 1925451 with $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL, and sample # 1925454 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL. Samples # 1925452 and # 1925453 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. The "positive" samples # 1925451 and # 1925454 were correctly reported as "positive" by 148 and 146 of the 149 participating laboratories, respectively. False-negative results should prompt a thorough evaluation of the test system and the workflow. The latter is definitely warranted for the participants reporting false-positive results for samples # 1925452 and # 1925453, containing only *E. coli*, but no target organism. As cross-reaction of the applied test system with *E. coli* DNA is unlikely; probably cross-contamination during the process of sample preparation and analysis is causative. All but two participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 546: VRE

A 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 aim to mimic the situation of processing typical clinical samples. Consequently, 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 # 1925461 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecalis* vanA ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and sample # 1925464 contained a similar amount of *Enterococcus faecium* vanA ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Sample # 1925463 contained *Enterococcus faecalis* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), and sample # 1925462 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

Of the 56 participating laboratories, 56 and 54 correctly reported positive results for the samples # 1925461 and 1925464, respectively. Of note, 53 participants reported dedicated vanA/vanB identification for these two samples, 48 were correct. We were pleased to see that also for the "negative" samples #1925462 and # 1925463, all participants reported correct results. All but one participant 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. Making some helpful experiences during the pilot phase of two previous distributions, we are starting with our first "regular distribution" in the current round.

Regarding the statistical analysis, data presentation and results discussion, 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 68 registered participants are depicted in Tables 2 to 7 (Attachment 1, p. 23–25), and a good overall correlation between the expected results (Table 1, Attachment 1, p. 23) and the reported results was observed. Briefly, only sporadic false-negative or false-positive results were observed. For example, one false-positive *Treponema pallidum* DNA result was reported for sample # 1925474 of the current 4-sample set, which could probably be due to cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification, or amplicon detection steps.

The online results input mask of RV 547 distributions now contains extra fields where participants are asked to specify the theoretical pathogen spectrum of their individual assay concepts. This extra information will help to consider and fairly assess the broad spectrum of different commercial and in-house PCR/NAT assays regarding species coverage, differentiation, and multiplex capabilities.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

A general note to our participants: the concept of this external quality assessment scheme is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *P. jirovecii* DNA

in suitable clinical sample material. With the development of diagnostic material similar to clinical samples, we aim to mimic the situation of processing typical clinical samples. Consequently, 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 three positive specimens (see Table 1, Attachment 1, p. 26). A relatively high concentration of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) was present in sample # 1925602, whereas in sample # 1925601 a ten-fold lower ($\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL), and in sample # 1925603 an approximately twenty-fold lower concentration of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL) were present. The set was completed by sample # 1925604, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

For sample # 1925602, which contained *P. jirovecii* target organisms ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) at a relatively high concentration, all of the 120 participants reported correctly positive results. Sample # 1925603 of the current distribution, with a ten-fold lower concentration of *P. jirovecii*, was tested “positive” by all but one of the 120 participating laboratories. Sample # 1925601, which contained a relatively low amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 5 \times 10^3$ organisms/mL) was still classified as “positive” by 105 of the 120 participants of the current distribution. The negative sample within the current distribution (# 1925604, containing only *E. coli*) was correctly classified “negative” by all of our 120 participants.

Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good correlation with the expected results was observed.

Attachments

Available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2020-11/lab000037.shtml>

1. Anhang1_lab000037.pdf (388 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and fungal genome detection (PCR/NAT)” November 2019

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. *Mikrobiologe*. 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):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
5. Robert Koch Institut. Überregionale Häufung von Carbapenemase-produzierenden Enterobacterales bei Krankenhauspatienten. *Epidemiologisches Bulletin*. 2019 Jul 18;29:271. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/29_19.pdf
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Outbreak of carbapenemase-producing (NDM-1 and OXA-48) and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307, north-east Germany, 2019. ECDC: Stockholm; 2019. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Klebsiella-pneumoniae-resistance-Germany-risk-assessment.pdf>

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, Ehrenschröder 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 November 2019 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2020;11:Doc02. DOI: 10.3205/lab000037, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000376

This article is freely available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2020-11/lab000037.shtml>

Published: 2020-05-28

Copyright

©2020 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/>.