

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2016 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik

Zusammenfassung

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

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

Udo Reischl¹
Wulf Schneider¹
Martin Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Michael Baier³
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Agnes Anders⁸
Martin Kaase⁸

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

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

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

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

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

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

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

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

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

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

den Ringversuche eine Reihe weiterer Informationen auch im Internet unter <http://www.udo-reischl.de>, Unterpunkt „INSTAND-Ringversuche (PCR/NAT)“, sowie auf der Homepage von INSTAND e.V. als pdf-Files zum freien Download bereit.

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 18 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „Highlights“.

So wurde beispielsweise im aktuellen **RV 536 Legionella pneumophila** auch zwei Proben mit der Spezies **Legionella longbeachae** versandt, die von einigen unserer Ringversuchsteilnehmer fälschlicherweise als PCR-positiv getestet wurden.

Als weiteres „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 539 MRSA/cMRSA** eine Mischung aus einem Methicillin-empfindlichen *S. aureus*-Isolat (MSSA) und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies ausgesandt, das methodenbedingt bei einem Teil der aktuell eingesetzten PCR/NAT Testsysteme zu falsch-positiven MRSA Ergebnissen führte. In der mikrobiologischen Praxis wird relativ häufig die gleichzeitige Anwesenheit einer Methicillin-resistenten (also *mecA*-positiven) Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies und eines Methicillin-empfindlichen (also *mecA*-negativen) *S. aureus*-Isolates in dem entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. Obwohl bei dieser Probe, im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit ähnlicher Probenkonstellation, diesmal erfreulicherweise eine etwas höhere Richtigkeitsquote erzielt werden konnte, bestätigt die Beobachtung von über 7% falsch-positiven MRSA-Ergebnissen erneut die Sinnhaftigkeit und auch Notwendigkeit des im Rahmen der PCR/NAT-Ringversuchsdiskussionen bereits mehrfach thematisierten **begleitenden kulturellen Nachweises von MRSA**.

Die Aussendung des **B. anthracis Stamm Pasteur** (positiv für das Virulenzplasmid pXO2 und die *B. anthracis*-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker *rpoB* und *dhp61*, jedoch negativ für das lethal- und edema-factor, sowie protective antigen-(*pagA*)-tragende Virulenzplasmid pXO1)

in einer der 4 Proben des Ringversuchs RV 542: *Coxiella burnetii* & *B. anthracis* führte diesmal zu 3 falsch-negativen Ergebnissen innerhalb der Teilnehmerschaft. Mit der Auswahl eines etwas breiteren Spektrums von relevanten Carbapenemase Genen bestätigte sich im Rahmen des neu eingeführten Ringversuchs **RV 544 Carbapenemase Gene** aufs Neue die Vermutung, dass viele der derzeit verwendeten Testsysteme zur molekularen Carbapenemase Detektion noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase Genen aufweisen. Im Umfeld der molekularen Testung von Carbapenemase Genen freuen wir uns auf die **Zusammenarbeit mit Frau Dr. Agnes Anders**, die als Stellvertreterin von Herrn Professor Gatermann zukünftig (in Nachfolge von Dr. Martin Kaase) die Ringversuchsaktivitäten am „Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger“ in Bochum koordiniert.

Auch bei unseren Chlamydien-Ringversuchen haben sich **personelle Änderungen** ergeben: Herr Professor Eberhard Straube, eines der „Gründungsmitglieder“ unserer Bakteriengenomnachweis-PCR/NAT-Ringversuchsinitiative hat nach seiner Emeritierung nun auch seine langjährige Tätigkeit als Leiter des Konsiliarlabors für Chlamydien abgegeben und seinen langjährigen Mitarbeiter **Herrn Dr. Michael Baier** als Nachfolger in der Funktion des stv. Ringversuchsleiters bei den RV 530 und 531 vorgeschlagen. Nach Rücksprache mit der Direktorin des Instituts für Mikrobiologie am Universitätsklinikum Jena, Frau Professor Dr. med. Bettina Löffler, und den beteiligten Fachgesellschaften wird dieser Vorschlag seitens INSTAND e.V. gerne angenommen. Wir danken Herrn Professor Straube für die vielen tollen Ideen, u.a. das Beisteuern von besonders herausfordernden Probenmaterialien (erinnert sei an die plasmiddefekte schwedische Variante von *C. trachomatis* oder einige apathogenen Neisserienstämme) sowie sein unermüdliches Engagement zur Verbesserung der Qualitätssicherung im Umfeld der Chlamydiendiagnostik – und freuen uns auf eine gute und erfolgreiche Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Baier.

Hier noch **ein paar Reflexionen des Ringversuchsleiters**, die er sich nach der statistischen und fachlichen Auswertung der aktuellen Ringversuchsrunde nicht verkneifen konnte: viele der seriösen Diagnostikhersteller geben sich größte Mühe bei der Testentwicklung und klinischen Evaluierung – und sind dann (zurecht) stolz auf die Leistungsdaten ihrer modernen PCR/NAT-Assays. 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 herstellereitigen Vorkehrungen zur „zuverlässigen“ Durchführung und standardisierten Ergebnisinterpretation.

Die auffällige „Streuung der Performance“ (bzw. das Auftreten einzelner Ausreißer) unterstreicht aus Sicht des Ringversuchsleiters umso mehr die Bedeutung der Qualitätsstandards, wie beispielsweise das regelmäßige Mit-

führen 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. Vielleicht lohnt es sich unter diesen Gesichtspunkten doch wieder mal ein Blick in die MIQ oder RiLiBÄK um hier und dort noch ungenutztes Potential auszuschöpfen...

Maximale diagnostische Sicherheit sollte doch unser aller Prämisse sein und das unnötige bzw. fahrlässige Generieren von falsch-negativen oder falsch-positiven Befunden (und vor allem deren Folgen für die betroffenen Patienten) sind durch keine methodischen oder ökonomischen Ausflüchte zu entschuldigen!

Also „nix für ungut“ liebe Kolleginnen und Kollegen, wie der Bayer so schön sagt ;-)

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.

Untersuchungsergebnisse Mai 2016

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

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 1615301 und Probe # 1615312), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1615303), *Helicobacter pylori* (Probe # 1615333), *Borrelia afzelii* (Probe # 1615354), *Salmonella enterica ser. enteritidis* (Probe # 1615372), *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 1615413), *Coxiella burnetii* (Probe # 1615423), *Bacillus anthracis* (Probe # 1615422), sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1615604).

Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Austestung der unteren Nachweishgrenze 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 entsprechen-

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

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

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

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Die Tabellen 1 (Anhang 1) zeigen dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in den Tabellen 2 (Anhang 1) nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen, und in den Tabellen 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.

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. Trotz der relativ geringen Erregermenge in den vier unterschiedlich zusammengesetzten positiven Proben führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive, als auch für negative Befunde.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1615301), zwei Proben mit einer ca. 10-fach höheren Menge an *C. trachomatis* (# 1615303 und 1615304, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL), eine Probe (# 1615303) mit ca. 1×10^5 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* sowie eine Probe mit einer ca. 100-fach höheren Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen (# 1615301; $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL).

Der Übersichtlichkeit halber werden wir bei diesem kombinierten Ringversuch (CT/NG) die Ergebniskonstellation zukünftig in **7 getrennten Tabellen** (Anhang 1, S. 1-3) darstellen. Damit wird die diagnostische Performance der jeweiligen Testsysteme beim Nachweis von CT und NG aussagekräftiger (Tabelle 4: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei CT, Tabelle 6: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei NG; jeweils gefolgt von den Richtigkeitsquoten nach aufgeführten Testsystemen in den Tabellen 5 und 7).

Auch wenn die etwas schwächer positive Probe # 1615301 des aktuellen Ringversuchs nur mit ca. 10^4 IFU/mL an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 216 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* diesmal erfreulicherweise keine falsch-negativen Ergebnisse. Bei den beiden ca. 10-fach stärker CT-positiven Proben # 1615303 und # 1615304 des aktuellen Probensets wurden von den 216 Teilnehmern diesmal nur insgesamt ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Da hier von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei dem einzelnen falschen Ergebnis vermutlich um einen Ringversuchstypischen „sporadischen Ausreißer“. Der betreffende Teilnehmer führte auf seinem Ergebnisformular die Verwendung eines kommerziellen und IVD-gelabelten Testsystems an, mit dem aber viele andere Teilnehmer die *C. trachomatis*-Zielorganismen in dieser Probe problemlos nachweisen konnten.

Für die *C. trachomatis*-negative Probe # 1615302 wurde aus dem gesamten Teilnehmerfeld ebenfalls nur ein einzelnes falsch-positives Ergebnis berichtet.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die beiden positiven Proben # 1615301 und # 1615303 (*N. gonorrhoeae*; ca. 5×10^6 bzw. 1×10^3 CFU/mL) diesmal jedoch von neun der insgesamt 216 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnisse für Gonokokken DNA bei der schwach positiven Probe mitgeteilt. Erfreulicherweise wurde die relativ hoch positive Probe # 1615301 von allen Teilnehmern korrekt positiv befundet.

Bei den beiden GO-negativen Proben wurden jedoch von 8 bzw. 2 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse berichtet. Dieser im Vergleich zu früheren Ringversuchsrunden doch überraschend hohe Anteil an falsch-positiven Ergebnissen deutet auf Kontaminationsereignisse 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 # 1615302 (mit den 8 falsch-positiven Ergebnissen) bei

sequentieller Abarbeitung unmittelbar auf die stark GO-positive Probe # 1615301 folgt. 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 1×10^5 IFU/mL ehrlicherweise nicht als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in der CT-positiven Probe # 1615303 sowie 1×10^3 CFU/mL an Zielorganismen in der GO-positiven Probe # 1615303 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern ebenfalls Anlass zur Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen NAT-gestützten Testsysteme geben.

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

Ich glaube, es ist auch für den Leser dieser Ringversuchsdiskussion weitgehend nachvollziehbar, dass wir als Organisatoren von Testkonzept- und Testplattform-übergreifenden Ringversuchen bei der Konfektionierung unserer Probenmaterialien leider nicht jede Besonderheit im Abarbeitungsprotokoll von kommerziellen Testsystemen berücksichtigen oder unterschiedliche Arten von Ringversuchprobenmaterial 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 Ringversuchproben 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 10 Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen in beiden positiven Proben erfolgreich nachgewiesen. Auch in der relativ stark GO-positiven Probe # 1615303 gelang allen Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen der erfolgreiche Nachweis der *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen. Nur bei der sehr schwach GO-positiven Probe # 1615303 (in der zusätzlich noch relativ hohe Mengen an *C. trachomatis* enthalten war) versagte der Nachweis bei 9 der insgesamt 10 Teilnehmer 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 10 Teilnehmern die entsprechenden Zertifikate erteilt.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von 215 der insgesamt 216 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

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

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

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType CT (12x), HAIN Lifescience FluoroType NG (11x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (2x), BD Max CT/GC/TV assay (7x), Seegene Anyplex™ II STI-7 Detection (5x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (5x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (3x), VERSANT

CT/GC DNA Assay von Siemens (4x), Urethritis basic von fast-track Diagnostics (3x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (3x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (2x), Amplex Hyplex STD *Chlamydia* und *Neisseria* (2x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae* Real-TM (2x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (2x), AmpliSens *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (2x), Bioron RealLine *C. trachomatis*/ *N. gonorrhoeae* (1x), QIAGEN artus CT/GC QS-RGQ Kit (1x), Aptima Combo 2 assay CT/GC (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex PCR-ELISA (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), operon CT Oligogen (1x), operon NG Oligogen (1x), Liferiver *C. trachomatis* Real Time PCR Kit (1x) und Liferiver *N. gonorrhoeae* Real Time PCR Kit (1x). Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems soll in diesem Zusammenhang auch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in Gegenwart von relativ hohen Mengen an Zielorganismen (bzw. deren Nukleinsäure) die interne Kontrollreaktion aufgrund der „Konkurrenzsituation“ mit der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz durchaus negativ ausfallen kann, obwohl keine Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt. 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 Zusammensetzung der Probe # 1615303 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 eine Probe mit ca. 1×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1615312), zwei Proben mit ca. 1×10^5 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1615311 und # 1615314), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1615313), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tab. 2 (Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den insgesamt 95 Teilnehmern bei der negativen Probe # 1525313 sowie bei zwei der drei positiven Proben (# 1525311 und # 1525314) diesmal durchwegs korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Bei der dritten positiven Probe # 1525312, die im Vergleich zu den anderen beiden positiven Proben ca. zehnmal weniger *C. trachomatis* enthielt, wurde lediglich von einem der 95 Teilnehmer ein falsch-negatives Resultat beobachtet. 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.

Auch wenn mit ca. 1×10^4 IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht erreicht oder unterschritten sein sollte, sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität generell sowohl falsch-negative, als auch falsch-positive Ergebnisse Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Angesichts der nach wie vor anhaltenden Diskussion um das „Pooling“ von entsprechendem Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

Inhibitionskontrollen wurden von 94 der insgesamt 95 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in-house*-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf erfreulich hohem Niveau.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (5x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (5x), BD Max CT/GC/TV assay (4x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (1x), AmpliGnost *C. trachomatis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x) und Genetrac DK-CHT *C. trachomatis* DNA Detection Kit (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal zwei identische Proben mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (# 1615321 und # 1615324; *B. pertussis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), sowie eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella holmesii* als verwandte Spezies (# 1615322 mit 1×10^6 CFU/mL). Die Probe # 1615323 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanem Zellmaterial.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA führte diesmal sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben zu relativ hohen Richtigkeitsquoten.

Wie schon im letzten Ringversuch bereitete der spezifische Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in den bei-

den positiven Proben # 1615321 und 1615324 den insgesamt 152 Teilnehmern keine allzu großen Schwierigkeiten. Während bei der Probe # 1615321 mit einer Erregermenge von $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL durchwegs richtig-positive Ergebnisse berichtet wurden, befanden sich unter den PCR/NAT-Ergebnissen für die (eigentlich identische) Probe # 1615324 interessanterweise jedoch zwei falsch-negative Resultate. Ohne den beiden betroffenen Teilnehmern, die mit ihren kommerziellen PCR/NAT-Testsystemen die *B. pertussis*-Zielorganismen in der zweiten positiven Probe offenbar nicht nachweisen konnten, zu nahe treten zu wollen, deutet dieser Umstand in solchen 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.

Im RV 532 befand sich diesmal wieder ein IS481-positives *Bordetella holmesii*-Isolat, das (Methoden- bzw. Zielsequenz-bedingt) mit einigen *B. pertussis*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen kreuzreagierte. Die Aktualität dieser Problematik spiegelt sich beispielsweise in einer Veröffentlichung französischer Kollegen wider [2].

Insgesamt betrachtet scheint aber der Vorteil einer hochsensitiven Detektion von *B. pertussis* und *B. holmesii* über die Verwendung der repetitiven IS481-Zielsequenz die Nachteile einer (eher aus akademischer Sicht wünschenswerten) Differenzierungsmöglichkeit zwischen den beiden Spezies in der PCR-Routinediagnostik mehr als aufzuwiegen. Zudem scheint in unseren Breiten *B. holmesii* eher selten aufzutreten (siehe [3]) und Infektionen mit beiden Spezies scheinen eine gleichermaßen „behandlungsbedürftige“ Symptomatik hervorzurufen. Eine Abgrenzung zu den übrigen (IS481-negativen) *Bordetella*-Spezies muss jedoch aus diagnostischer Sicht stets gewährleistet sein (siehe Ringversuchsdiskussion April 2011 [4]).

Angesichts der sehr hohen Richtigkeitsquoten für die beiden *B. pertussis*-positiven Proben # 1615321 und # 1615324 und der technisch bzw. methodisch bei der Verwendung der IS481-Zielsequenz zu erwartenden Kreuzreaktion mit *B. holmesii* in Probe # 1615322 hat sich der Ringversuchsleiter (in enger Abstimmung mit dem Sollwertlabor) dazu entschlossen, bei der Erteilung der Zertifikate die falsch-positiven Ergebnisse bei *B. holmesii* nicht als falsch-negativ zu bewerten.

Der eine Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der *E. coli*-positiven Probe # 1615323 sollte jedoch intensiv daran arbeiten, die analytische Spezifität seiner jeweiligen Testsysteme zu verbessern.

Inhibitionskontrollen wurden von 150 der insgesamt 152 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden bei dem aktuellen Probenstet bei keinem der Teilnehmer innerhalb der jeweils ausgesandten vier Einzelproben beobachtet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete ungefähr die Hälfte der Teilnehmer ($n=63$) selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifizierte kommerzielle Testkits ($n=5$) mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen

zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 43 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 6 Teilnehmern die Verwendung des Pertussis-Toxin-Gens und von 2 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit (9x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP *B. pertussis* (7x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (1x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Bio-Evolution real time PCR kit *B. pertussis/parapertussis* (2x), Attomol *Bordetella* Realtime LT (2x), Seegene Anyplex II RB5 Detection (2x), Seegene Seeplex Pneumobacter ACE Detection (1x), ARGENE *Bordetella* R-gene (1x), fast-track Diagnostics *Bordetella* (1x), Meridian Bioscience illumigene Pertussis (1x), AmpliSens *Bordetella* multi FRT PCR Kit (1x), LabSystems Diagnostics *B. pertussis* + *B. parapertussis* Duplex Real-Time PCR (1x), Ingenetix Bacto Real *B. pertussis/B. parapertussis* (2x), Altona diagnostic RealStar *Bordetella* PCR Kit (1x), DYNEX Real Time PCR PneumoPlex (1x) und Qiagen RspiFinder RG Panel (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt Probe # 1615331 des aktuellen Ringversuchs eine relativ hohe Menge an Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* ($\sim 10^5$ Organismen/mL). Die Probe # 1615333 enthielt das gleiche Isolat in einer etwa hundertfach geringeren Menge ($\sim 10^3$ CFU/mL). Probe # 1615332 enthielt eine Kultursuspension der mit dem Zielorganismus verwandten Spezies *Helicobacter felis* ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml) und Probe # 1615334 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden sowohl die etwas stärker positive *H. pylori*-Probe # 1615331 und die *H. pylori*-negative Probe 1615334 von allen der insgesamt 48 Teilnehmer ausnahmslos als richtig-positiv bzw. -negativ bewertet. Die Probe #1615334 enthielt diesmal eine relativ geringe Menge an *Helicobacter pylori*-Zielorganismen und wurde insgesamt von 2 Teilnehmern als falsch-negativ befundet. In der aktuellen Ringversuchsrunde wurde zudem die analytische Spezifität der verwendeten Testsysteme durch die Probe # 1615332 überprüft, welche mit *Helicobacter felis* eine „non-pylori“ *Helicobacter*-Spezies enthielt. Für diese Probe wurden diesmal 5 falsch-positive Ergebnisse sowie ein fragliches Ergebnis berichtet. Falsch-positive *H. pylori*-Ergebnisse bei dieser Probe sollten jedoch zum Anlass genommen werden, die Speziespezifität des verwendeten PCR/NAT-Testsystems zu überprüfen. Möglicherweise lag hier bei dem einen oder anderen Teilnehmer aber auch ein laborinternes Kontaminationsergebnis mit Template-DNA oder Verschleppung von Probenmaterial aus der relativ stark *H. pylori*-positiven Probe

1615331 zugrunde, was ebenfalls eine Überprüfung der Arbeitsabläufe und ggfs. auch des verwendeten Testsystems nach sich ziehen sollte.

Inhibitionskontrollen wurden von allen der insgesamt 48 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Sowohl die kommerziellen, als auch die eigenentwickelten Testsysteme schnitten im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab. So erreichten die *in-house* Testsysteme wie auch die kommerziellen Assays sehr hohe Richtigkeitsquoten was die richtig-positiven Ergebnisse betrifft. Auch bei den richtig-negativen Ergebnissen waren keine signifikanten Unterschiede in den Richtigkeitsquoten von *in-house* Testsystemen und kommerziellen Assays auszumachen.

Bis auf 10 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 6x RIDAGENE *Helicobacter pylori* von r-Biopharm und 1x *H. pylori* Real TM von Sacace Biotechnologies angegeben) verwendeten ungefähr die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte, sog. *in-house* Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori*.

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 40 der insgesamt 48 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme von 3 Ergebnissen waren die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

RV 534: EHEC/STEC

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei unterschiedliche, aber relativ stark EHEC-positive Proben: mit ca. 5×10^4 CFU/mL (# 1615344: *E. coli*, *stx*_{2c}-, *eae*-, *hlyA*- und O26:H11-positiv) und mit ca. 5×10^5 CFU/mL (# 1615342: *E. coli*, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv) sowie eine Probe mit 5×10^4 CFU/ml eines EPEC-Isolats (# 1615341, *eae*-positiv) und eine Probe mit 5×10^4 CFU/ml eines EIEC-Isolats (# 1615343). In diesem Ringversuch waren keine „exotischen“ Shiga-Toxin-Gene vertreten, sodass, begründet auf die Verfüg-

barkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC, bei allen Proben durchwegs hohe Richtigkeitsquoten – sowohl für positive, als auch für negative Befunde – verzeichnet werden konnten.

Die beiden EHEC-positiven Proben # 1615342 bzw. # 1615344 wurden jeweils von 124 der insgesamt 125 Teilnehmer als richtig-positiv berichtet. Eine naheliegende Erklärung für die einzelnen falsch-negativen Ergebnisse bei der *stx*₁-, *stx*₂-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1615342 und der *stx*_{2c}-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1615344 gibt es aus Sicht der Ringversuchsauswertung nicht.

Sowohl das EPEC-Isolat in Probe # 1615341 (*E. coli*, *eae*-positiv, *hlyA*-negativ) als auch das EIEC-Isolat in Probe # 1615343 wurde jeweils von 123 der insgesamt 125 Teilnehmer korrekterweise als negativ befundet. Von zwei Teilnehmern wurde hier jedoch ein positives PCR-Ergebnis für EHEC berichtet. Bei genauerer (visueller) Prüfung der jeweiligen Ergebnisbögen, der handschriftlichen Kommentare sowie der angegebenen Code-Nummern war aber in ersterem Fall rasch klar, dass es sich hier offenbar um einen positiven PCR-Nachweis des *eae*-Gens (bei negativem PCR-Nachweis der *stx*-Gene) handelte. Daher haben wir diese auf dem Ergebnisformular präzise spezifizierten Ergebnisse bei der Bewertung zur Erteilung der Zertifikate methodisch und fachlich korrekt als „EPEC-positiv“ aber „EHEC-negativ“ umklassifiziert. Die beiden falsch-positiven EHEC-Ergebnisse bei der EIEC-positiven Probe # 1615343 konnten wir auch nach Durchsicht der entsprechenden Ergebnisbögen nicht genauer auflösen.

Wie bereits in den vorhergegangenen Ringversuchsrunden zu beobachten, führt die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten – sowohl für positive als auch für negative Befunde. Zudem waren in der aktuellen Runde des EHEC-PCR-Ringversuchs auch keine Isolate mit „exotischen“ Varianten der Shiga-Toxin-Gene vertreten.

Die beiden EHEC-positiven Proben # 1615342 bzw. # 1615344 wurden problemlos von nahezu allen der insgesamt 125 Teilnehmer auch als solche erkannt und im Ergebnisformular als richtig-positiv berichtet. Die wenigen Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für die positive EHEC-Probe verwenden vermutlich Testsysteme mit geringerer analytischer Sensitivität oder verlieren etwas Sensitivität beim Aufschluss des Probenmaterials. Insgesamt gesehen sollte das aber nicht weiter schlimm sein, da in den meisten der teilnehmenden Laboratorien ein NAT-gestützter Nachweis von Shiga-Toxin-Genen im Umfeld der EHEC-Diagnostik primär als Kulturbestätigungstest eingesetzt wird. Bei zukünftigen Ringversuchen werden wir uns bemühen, dass die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten und der Schwerpunkt somit auf einer Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme liegt und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze.

Neben *in-house* Testsystemen werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle Assays eingesetzt. In den Richtigkeitsquoten zeigte sich keine Über- bzw. Unterlegenheit eines Systems, was für die breite Etablierung PCR-/NAT-gestützter Testsysteme spricht. Inhibitionskontrollen wurden von 123 der 125 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionseignisse wurden in keinem Fall beobachtet. Zudem wurden von 112 Teilnehmern die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolyisin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt. Lediglich ein Teilnehmer berichtete hier falsche Ergebnisse. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (3x), BD Max Enteric Bacterial Panel (3x), TIB Molbiol LightMix modular stx-1/stx-2/*eae* (2x), Sacace Biotechnologies EHEC Real-TM (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), fast-track Diagnostics (1x) und SureFood pathogen STEC screening PLUS von Congen (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* (# 1615353, $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit einer etwa zehnfach geringeren Menge (# 1615351, $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL), eine Probe mit einer etwa hundertfach geringeren Menge (# 1615354, $\sim 1 \times 10^3$ Organismen/mL) an *Borrelia afzelii* sowie eine Probe ohne Zielorganismen, die jedoch mit einer relativ hohen Menge *Treponema phagedenis* enthielt (# 1615352, $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL).

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 *B. burgdorferi*-Nachweis. 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 humanpatho-

gen werden *B. bissettae*, *B. lusitaniae* 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 hoher Erregerlast (#1615353 mit ca. 1×10^5 Organismen/mL und # 1615351 mit ca. 1×10^4 Organismen/mL) bereitete lediglich einem der Teilnehmer Probleme, so dass hier erfreulicherweise eine Quote richtig-positiver Ergebnisse von nahezu 100% erreicht wurde.

Bei abnehmender Erregerlast wurde bei der Probe # 1615354 mit ca. 1×10^3 Organismen/mL von drei der insgesamt 121 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis berichtet. Ein Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis bei der schwach positiven Probe # 1615354 als „fraglich“. Drei Teilnehmer beobachteten mit ihren Borrelien-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen ein positives Ergebnis bei der negativen Probe # 1615352. Da diese Probe lediglich relativ hohe Mengen der verwandten Spirochäte *Treponema phagedenis* enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr wahrscheinlich. 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 120 der 121 Teilnehmer mitgeführt, signifikante Inhibitionseignisse der PCR-Reaktion wurden im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie bei den vorhergehenden Ringversuchsrunden haben auch diesmal wieder ungefähr knapp die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet, kommerzielle Testsysteme wurden von 71 der 121 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 (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 97%) zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den drei Teilnehmern, die ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe # 1615354 mit relativ geringer Erregerlast berichteten, zwei davon durch *in-house* Testsysteme generiert wurden. Gegebenenfalls sollte also die Sensitivität der haus-eigenen Testsysteme überprüft werden.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (12x), HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (3x), BIORON RealLine Borre-

lien Kit (3x), EliGene Borrelia RT von Elisabeth Pharmacon (3x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (2x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (2x), Atto-mol *B. burgdorferi* Realtime LT (2x), AmpliGnost *B. burgdorferi* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x) und DYNEX Real Time PCR *B. burgdorferi* (1x).

RV 536: Legionella pneumophila

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal nur eine *Legionella pneumophila*-positive Probe # 1615361, die mit einer Menge von ca. 10^5 CFU/mL an *L. pneumophila*-Serogruppe 1 versetzt war. Die Probe # 1615364 des aktuellen Sets enthielt ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella longbeachae* und Probe # 1615363 enthielt eine ca. zehnfach geringere Menge an *L. longbeachae* (10^4 CFU/mL). Die dritte für den entsprechenden Zielorganismus „negative“ Probe # 1615362 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*.

Die relativ stark positive Probe # 1615361 mit ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG2 wurde dabei von allen 117 Teilnehmern korrekterweise als positiv befundet.

Auch die „richtig negative“ Probe # 1615362 (nur *E. coli*) wurde noch von 114 der insgesamt 117 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Drei Teilnehmer berichteten bei dieser Probe jedoch ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila*. Die betroffenen Laboratorien sollten mögliche laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während ihrer individuellen Probenextraktion und -abarbeitung ggf. kontrollieren und bestmöglich korrigieren.

Die beiden mit relativ hohen Mengen an *Legionella longbeachae* ($\sim 1 \times 10^5$ bzw. $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) versetzten Proben wurden von 109 der insgesamt 117 Teilnehmer mit ihren *L. pneumophila*-spezifischen PCR-/NAT-Testsystemen korrekt als negativ befundet. Jeweils 8 Teilnehmer berichteten bei beiden Proben ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila*-DNA, was auf eine Kreuzreaktion

bzw. mangelnde Speziespezifität der Zielsequenz zurückzuführen sein dürfte. Vor allem *in-house* real-time PCR-Protokolle mit ribosomalen Zielsequenzen zeigten in der Vergangenheit immer wieder Probleme bei der Speziespezifität. Bei Verwendung von nested Block-Cycler PCR-Protokollen zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und optionaler DNA-Sequenzierung sollte jedoch der Fehler eher auf Anwenderseite gesucht werden (beispielsweise Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung), da dieses Testkonzept in jedem Fall die Unterscheidung zwischen *Legionella longbeachae* und *Legionella pneumophila* erlauben sollte. Inhibitionskontrollen wurden von 115 der 117 Teilnehmer durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden offenbar nicht beobachtet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 75 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Signifikante Unterschiede bezüglich der analytischen Sensitivität zwischen kommerziellen und selbstentwickelten Testsystemen (von 44 Teilnehmern verwendet) fanden sich nicht.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 43 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: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (10x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), Mikrogen Diagenode Lpn-050 Kit (6x), r-Biopharm RIDAGENE *Legionella* (4x), r-Biopharm SureFast *L. pneumophila* PLUS (2x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE detection (3x), Biologig ReadyMax B-CAP Assay (2x), ARGENE Legio pneumo/Cc r-gene (2x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (2x), Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (2x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (1x), Seegene Anyplex II RB5 Detection (1x) und DYNEX Real Time PCR PneumoPlex (1x).

RV 537: Salmonella enterica

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1615371; *Salmonella enterica* ser. enteritidis, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1615373; *Salmonella enterica* ser. tennessee $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1615372 mit *Salmonella enterica* ser. enteritidis; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1615374), 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 diesmal bei 3 der 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Bezüglich der analytischen Sensitivität wurde es erst bei Probe # 1615372 ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) „inter-

essant“. Nur mehr 17 der insgesamt 25 Teilnehmer berichteten hier ein positives Ergebnis für den erfolgreichen Nachweis von *Salmonella enterica*-DNA. Auch in vorausgegangenen Ringversuchen waren bei relativ niedrigen Erregerlasten immer wieder falsch-negative Ergebnisse berichtet worden, was im Einzelfall eine etwas eingehendere Überprüfung der individuell etablierten PCR/NAT-Testsysteme nach sich ziehen sollte.

Da in der aktuellen Ringversuchsrunde keine falsch-positiven Befunde für „negative“ Proben mitgeteilt wurden, deutet dies, im Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden, auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Inhibitionskontrollen wurden von allen 25 Teilnehmern durchgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse wurden im aktuellen Probensatz für keine der 4 Einzelproben berichtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: r-biopharm RIDAGENE Bacterial Stool Panel (4x), Congen SureFood pathogen Salmonella PLUS (3x), BD Max Enteric Panel (2x), fast-track Diagnostics (2x) und Mikrogen Diagenode Gastroenteritis Bacteria Panel (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, wie in dieser Ringversuchsrunde, auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein. So wie im Fall der Probe # 1615381, die diesmal relativ hohe Mengen an *L. innocua* enthielt. Proben # 1615382 und # 1615384 enthielten eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 1×10^5 CFU/mL), die von allen der insgesamt 39 Teilnehmer korrekt erfasst wurden. Erfreulicherweise wurde auch die Probe # 1615383, welche ausschließlich *E. coli* enthielt, von allen Laboratorien als „negativ“ befundet, was für eine sehr gute Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden Laboratorien spricht.

Da von allen Teilnehmern die ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen angegeben wurde, sind die durchwegs negativen Ergebnisse bei Probe # 1615381 (*L. innocua*, ca. 10^5 CFU/mL) nicht verwunderlich oder als falsch-negativ für den eigentlichen Zielorganismus „*Listeria* spp.“ dieses

Ringversuchs zu bewerten. Im Umkehrschluss spricht diese Datenlage für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung: hält ein Teilnehmer lediglich ein **L. monocytogenes-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben, und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Von allen 39 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Sacace Biotechnologies *L. monocytogenes* Real-TM (2x), DYNEX Real Time PCR MeningoPlex (1x), *r-Biopharm SureFast L.monocytogenes* PLUS (1x), Diarella *Listeria* real time PCR Kit TM von Gerbion (1x), Liferiver *L. monocytogenes* Real Time PCR Kit (1x) und Seegene Seeplex Meningitis ACE Detection (1x).

RV 539: MRSA

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

Wie an dieser Stelle bereits mehrfach thematisiert basieren einige der derzeit etablierten eigenentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum Direktnachweis von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern, Staphylokokkenspezies-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen in der entsprechenden Nukleinsäurepräparation. Da sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken das *mecA*-Gen für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Aussagekraft dieser PCR-gestützten Testsysteme für den Direktnachweis von MRSA aus nati-

vem Patientenmaterial eingeschränkt, wenn beim Patienten eine gleichzeitige Besiedelung mit *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. SCC*mec*-basierte PCR-Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCC*mec*-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCC*mec*-Kassette im *S. aureus*-Genom als Zielsequenz verwenden. Dass aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCC*mec*-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCC*mec*-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCC*mec*-Kassette vorhandenen *mecA*-Gens versandt.

Da wir diesmal, abgesehen von einer Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (eine Konstellation die in der täglichen Praxis nicht gerade selten beobachtet wird), keine „interessanten“, „schwierigen“ oder komplexen Probenkonstellationen versandt haben, wurden von den insgesamt 310 Teilnehmern mit ihren unterschiedlichsten NAT-gestützten Testsystemen nahezu durchweg korrekte PCR-Ergebnisse für 3 der insgesamt 4 Proben des aktuellen Panels berichtet.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1615391 diesmal ein Gemisch aus einem *S. aureus*-Isolat (MSSA, PVL-negativ, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; *mecA*-positiv, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), die Probe # 1615392 eine relativ hohe Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (cMRSA; PVL-positiv; spa:t310, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), die Probe # 1615394 eine etwas höhere Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (cMRSA; PVL-positiv; spa:t008 $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), und die Probe # 1615393 ein „ordinäres“ *mecA*-negatives *Staphylococcus epidermidis*-Isolat ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml).

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der relativ stark positiven cMRSA-Probe # 1615394 von 309 der insgesamt 310 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Auch wenn sich in der zweiten MRSA-positiven Probe # 1615392 eine etwas geringere Menge an entsprechenden Zielorganismen befand, so ist die diesmal beobachtete Richtigkeitsquote von 99 % als durchaus respektabel zu bezeichnen. Für diese Probe wurden von 307 Teilnehmern korrekt positive Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 2 falsch-negativen Ergebnisse bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden von diesen beiden Teilnehmern selbstentwickelte (in-house) PCR-Testsysteme mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt oder es ging während der Probenaufarbeitung ein gewisser Anteil der Template-DNA bei der DNA-Isolierung

oder der Komplettierung der PCR-Ansätze verloren. Angesichts der mit 1×10^4 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1615392 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben. Im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit vergleichbarer Probenkonstellation wurde bei Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies in Probe # 1615391 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 286 der insgesamt 310 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere 7 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von 5 dieser 7 Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruht. Damit dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA*-Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall „fraglich“ auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis.

Anmerkung des Ringversuchsleiters: Bei der Mitteilung von fraglichen Ergebnissen werden die entsprechenden Zertifikate in der Regel nur dann erteilt, wenn diese Teilnehmer bei den übrigen 3 Proben des Ringversuchs korrekte Ergebnisse angegeben haben.

Die restlichen 17 Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Diesen 17 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 1615391 ist dringend anzuraten, ihre Testsysteme zu überprüfen bzw. die methodische Eignung ihres jeweiligen Testkonzepts zu hinterfragen. In der mikrobiologischen Praxis wird relativ häufig die gleichzeitige Anwesenheit einer Methicillin-resistenten (also *mecA*-positiven) Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies und eines Methicillin-empfindlichen (also *mecA*-negativen) *S. aureus*-Isolates in dem entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. In diesem Fall würden die Testsysteme der letztgenannten 16 Teilnehmer vermutlich fälschlicherweise einen Hinweis auf das Vorliegen einer MRSA-Infektion bzw. -Besiedelung anzeigen (mit allen hinlänglich bekannten Konsequenzen für den betroffenen Patienten!).

Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 1615391 in Tab. 3 (Anhang 1, S. 12) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird schnell ersichtlich dass alle der derzeit etablierten SCC*mec*-basierten Testsysteme bei diesem Gemisch korrekterweise MRSA-negative Befunde liefern (da das *S. aureus*-Genom der MSSA-Komponente ja *de facto* keine integrierte SCC*mec*-Kassette aufweist).

Bei der Probe ohne MRSA-Zielorganismen (# 1615393), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an einem „ordinären“ *mecA*-negativen *Staphylococcus epidermidis*-Patientenisolat enthielt, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von 3 der 310 Teilnehmer ein falsch-positives MRSA Ergebnis beobachtet. Dabei liegt das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontaminationsereignisses oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe. Solche „Ausreißer“ sind bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion.

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

Abgesehen von der zuletzt diskutierten Probe spricht die Ergebnislage dieses Ringversuchs erneut für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine-Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 64 der insgesamt 310 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diesmal sowohl die negativen, als auch die positiven Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise unter: Linde et al. (2005) [5] oder Witte et al. (2005) [6]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR-Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in: Reischl et al. (2007) [7]. Mittlerweile sind auch schon einige kommerzielle *real-time* PCR-Testsysteme für den zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis von PVL-Genen bei MRSA- und MSSA-Isolaten verfügbar (z.B. von r-biopharm oder von TIB Molbiol).

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience Genotype MRSA (4x), HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (2x), HAIN Lifescience Genoquick MRSA (2x), Amplex easypex MRSA (2x), r-biopharm RIDAGENE PVL PCR (1x), GeneProof MRSA PCR Kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA combi (1x) und Congen Sure-Fast MRSA 4Plex (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

Eine wichtige Anmerkung wie immer 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 erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *C. pneumoniae*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1615404; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml) und eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1615401; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml), eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml an *Chlamydia trachomatis* (# 1615403), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1615402), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden Proben ohne Zielorganismen # 1615402 und # 1615403 wurden mit einer bzw. zwei Ausnahmen korrekt als „negativ“ befundet. Hierbei dürfte es sich am ehesten um eine laborinterne Kontamination bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von *E. coli* erscheinen eher als unwahrscheinlich. Erfreulich ist auch, dass die Probe # 1615404 *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml) von 129 der 131 Teilnehmer als „positiv“ erkannt wurde. Leider wurden für die zweite *Chlamydia pneumoniae*-haltige Probe # 1615401 10 falsch-negative Resultate berichtet. Gegenüber vorausgehenden Ringversuchsrunden ist hier ein Anstieg nicht korrekter Ergebnisse zu verzeichnen. Da ebenfalls in vorausgegangenen Ringversuchen auch noch etwa zehnfach geringere Erregerlasten (ca. 10^3 IFU/mL) detektiert werden konnten, sollte ein falsch-negatives Ergebnis der *C. pneumoniae*-haltigen Proben sicherlich zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und ggfs. auch die Prozessabläufe bei der Probenaufarbeitung zu hinterfragen. Inhibitionskontrollen wurden von 130 der 131 Teilnehmer durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden nicht berichtet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 13 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 11 Teilnehmern der Diagenode MP/CP Kit und von 6 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit angegeben. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwen-

dung folgender Testkits aufgeführt: GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (9x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac community acquired Pneumonia Kit (8x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (1x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (3x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE Detection (3x), Seegene Anyplex RB5 detection (1x), Biologig ReadyMax B-CAP Assay (2x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (2x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 21 (1x), Ingenetix Bacto Real *M. pneumoniae* (1x), Euroclone Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit (1x), AmpliSens *M. pneumoniae*/*C. pneumoniae* (1x), r-Biopharm RIDAGENE *C. pneumoniae* (1x), Labsystems Diagnostics *C. pneumoniae* + *M. pneumoniae* Duplex Real-Time PCR (1x), Vircell Speed-oligo *Chlamydomphila pneumoniae* (1x), RespiFinder SMART (1x) und DYNEX Real Time PCR PneumoPlex (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 Probenset vertreten.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1615412 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL), Probe # 1615414 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) und # 1615413 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL). Probe # 1615411 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*. Mit jeweils einer Ausnahme konnten die 143 Teilnehmer die DNA von *M. pneumoniae* in den Proben # 1615412 und 1615414 zuverlässig nachweisen. Die Probe # 1615413 mit der geringsten Menge an Zielorganismus wurde von 136 Labors als „positiv“ erkannt. Für die „negative“, mit *E. coli* (# 1615411) versetzte Probe wurden erfreulicherweise ausschließlich korrekte Ergebnisse berichtet. Inhibitionskontrollen wurden von 142 der 143 Teilnehmer mitgeführt, für keine der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsereignisse berichtet. 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. Dieses positive Zwischen-

fazit sollte jedoch nicht zum Anlass genommen werden, die Anstrengungen zu reduzieren!

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 32 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt: LightMix *M. pneumoniae* [n=14], Minerva Venor Mp [n=1], AmpliGnost MP PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe [n=7], Diagenode MP/CP [n=10], sowie „andere kommerzielle Testsysteme“ [n=66]. Teilnehmer mit den ersten vier der aufgeführten Testkits konnten damit durchwegs Richtigkeitsquoten von 100 %, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika CAP Bacterial Kit (9x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (9x), fast-track Diagnostics Kits (6x), Chla/Myco pneumo r-gene (3x), r-Biopharm RIDAGENE *M. pneumoniae* (3x), Ingenetix Bacto Real *Mycoplasma pneumoniae* (2x), Seegene PneumoBacter ACE detection (2x), Seegene Anyplex RB5 detection (2x), AmpliSens *M. pneumoniae*/*C. pneumoniae*-FEP PCR Kit (2x), Biologig ReadyMax B-CAP Assay (2x), Euroclone Duplica Real Time *M. pneumoniae* Detection Kit (1x), Labsystems Diagnostics *C. pneumoniae* + *M. pneumoniae* Duplex Real-Time PCR (1x), RespiFinder SMART (1x), Vircell Speed-oligo *Mycoplasma pneumoniae* (1x) und DYNEX Real Time PCR PneumoPlex (1x).

RV 542: Coxiella burnetii & B. anthracis

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Coxiella burnetii* ($\sim 5 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1615423 und $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1615421), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* „Pasteur“-Isolats ($\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1615423), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* UR-1 Isolats ($\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1615422), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1615424), 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. 16) sowie für *Bacillus anthracis* in den Tabellen 4 und 5 (Anhang 1, S. 17). Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Sacace Bio-

technologies *C. burnetii* Real-TM (2x), Altona diagnostics RealStar Anthrax PCR Kit (2x), Liferiver *C. burnetii* real time PCR Kit (1x) und Life Technologies LSI VetMAX COX B ABSO QUANT (1x).

Coxiella burnetii: Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich. Die etwas stärker positive Probe # 1615421 mit ca. 5×10^4 Genomkopien *C. burnetii*/mL wurde von allen der insgesamt 30 Teilnehmer mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Die zweite positive Probe # 1615423 des Probesets (ca. 5×10^3 Genomkopien/mL von *C. burnetii* zusammen mit 1×10^4 Genomkopien/mL *Bacillus anthracis* „Stamm Pasteur“) wurde von 32 Labors korrekt berichtet, hier sind 2 falsch-negative Befunde zu registrieren. Dies ist im Vergleich zur vorausgegangenen Ringversuchsrunde eine Steigerung und sollte in den betroffenen Labors zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems zu hinterfragen und die Prozesse der Probenaufarbeitung ggfs. zu optimieren. Gleiches gilt für das falsch-positive und „fragliche“ Ergebnis der Probe # 1615422, welche nicht den Zielorganismus, sondern eine relevante Menge des *Bacillus anthracis* UR-1 Isolats enthielt. Da eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme eher unwahrscheinlich erscheint, sollten insbesondere Kontaminationsereignisse im Rahmen der Probenaufarbeitung ins Auge gefasst und abgestellt werden. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA der Teilnehmer enthielten mit einer Ausnahme 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, allerdings muss im Vergleich zu vorausgehenden Ringversuchsrunden eine unerfreuliche Zunahme falsch-positiver und -negativer Ergebnisse angemerkt werden. 19 der 20 Teilnehmer konnten mit ihren jeweils vor Ort etablierten *B. anthracis*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die „negative“ Probe # 1615421 korrekt identifizieren, ein falsch-positives Ergebnis könnte am ehesten auf Kontaminationsereignisse bei der Probenaufarbeitung zurückgeführt werden, was aufgrund der weitreichenden Konsequenzen des Befundes dringend zum Anlass einer detaillierten Nachschau genommen werden sollte. Von 17 der 20 Teilnehmer wurde die Probe # 1615422 (*B. anthracis* Stamm UR-1, $\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL), gleiches gilt für die zweite „positive“ Probe (# 1615423), welche den *B. anthracis*-Stamm Pasteur zusammen mit ca. 5×10^3 Genomkopien/mL von *C. burnetii* enthielt. Zur kurzen Rekapitulation: **B. anthracis Stamm Pasteur 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 „lethal- und edema-factor, sowie protective antigen-(pagA)-“ tragende Virulenzplasmid pXO1.** Aufgrund der nicht geringen Mengen des Zielorganismus im Probenmaterial

sollte ein falsch-negatives oder fragliches Ergebnis bei den „positiven“ Proben # 1615422 und # 1615423 unbedingt zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und ggfs die laborinternen Abläufe der Probenaufarbeitung zu prüfen. 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

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 18) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1615431 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1615433 mit ca. zehnfach geringerer Menge (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Im Ringversuchsprobenset befanden sich zudem zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1615432 und # 1615434), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielten. Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier alle der 22 Teilnehmer die positiven Proben # 1615431 und # 1615423 als positiv identifiziert. Die *F. tularensis*-negative Probe # 1615434 wurde von allen Teilnehmern erfreulicherweise als negativ befundet, für die zweite „negative“ Probe # 1615432 wurde ein falsch-positives Ergebnis eingereicht. Die gesamte Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorherigen Ringversuchen und spricht erneut für ein gutes Funktionieren sowohl der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme, als auch der implementierten laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *F. tularensis*-DNA der Teilnehmer enthielten mit einer Ausnahme eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse 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 Spektrum der derzeit häufigsten Carbapenemase-Gene bei *Enterobacteriaceae* beschränken: KPC, VIM, OXA-48 ähnliche Gene, GES-Carbapenemasen NDM, IMP und GIM. Im Gegensatz zur vorausgegangenen Ringversuchsrunde beschränkten wir uns diesmal auf die „mittlerweile gängigen“ Carbapenemasen.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 19) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1615441 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit dem KPC-3 Gen (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL), Probe # 1615442 enthielt *Serratia marcescens*-Zielorganismen mit dem NDM-1 Gen (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL) und Probe # 1615444 enthielt *E. cloacae-complex*-Zielorganismen mit den Genen für OXA-48 und VIM-1 (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 1615443 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

Alle Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in der Probe # 1615444 (*E. cloacae-complex* mit VIM-1 und OXA-48 Gen) fest. Ähnlich erfreulich waren die eingesandten Ergebnisse für die Probe # 1615442 (*Serratia marcescens* mit NDM-1 Gen): alle 61 Labors berichteten korrekt positive Ergebnisse. Für die Probe # 1615441 berichteten 59 der 61 Teilnehmer ein positives Ergebnis (*Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit den Genen für KPC-3). Ein falsch-negatives Ergebnis sollte Anlass geben, einerseits die „Coverage“ des verwendeten Carbapenemase-Assays zu evaluieren und sich andererseits der möglichen Lücken bewusst zu sein.

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

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Sacace Biotechnologies MDR MBL Real-TM (1x), Sacace Biotechnologies MDR KPC/OXA Real-TM (1x), AmpliGnost Carbapenemase PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Amplex eazyplex SuperBug complete A (1x) und Autoimmun Diagnostika Gen ID Carbapenemase (1x).

RV 545: *Clostridium difficile*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 20) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben. Probe # 1615451 mit einer relativ hohen Menge an *Clostridium difficile* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), Probe # 1615453 mit ca. zehnfach geringerer Menge ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1615452 und # 1615454), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden „positiven“ *Clostridium difficile*-Proben # 1615451 und # 1615453 wurden erfreulicherweise von 109 bzw. 108 der 110 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 Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen für die lediglich *E. coli*-enthaltende Proben # 1615452 und # 1615454. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden für keine der Proben berichtet. Wie in Tab. 3 (Anhang 1, S. 20) angegeben, verwendete der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme. 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: r-Biopharm RIDAGENE CD Toxin A/B (21x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (6x), Altona diagnostic RealStar *C. difficile* PCR Kit (10x), HAIN Lifescience GenoType CDiff (9x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (2x), Meridian Bioscience illumigene *C. difficile* (2x), fast-track Diagnostics *C. difficile* (2x) und eazyplex *C. difficile* complete Assay (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** geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 21) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben drei positive Proben: Probe # 1615461 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecium* mit vanB Gen, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1615464 mit ca. gleiche Menge (*Enterococcus faecium* mit vanA-Gen, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1615462 mit ca. $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL an vanA-positiven *Enterococcus faecium*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1615463), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt. Erfreulicherweise wurde die positive Probe # 1615461 (*Enterococcus faecium* mit vanB Gen, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) von allen Teilnehmern korrekt als „VRE-positiv“ berichtet. Auch die vanA-positive Probe mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL *Enterococcus faecium* wurde von 40 der 41 teilnehmenden Labors korrekt erkannt, während bei der „positiven“ Probe mit der geringsten Erregerlast ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL *Enterococcus faecium* mit vanA-Gen) 5 falsch-negative Ergebnisse zu verzeichnen waren. Wie bereits im vorangegangenen Ringversuch waren alle eingereichten vanA/vanB-Differenzierungen korrekt. Im Vergleich zu vorausgegangenen Ringversuchsrunden war diesmal eine Steigerung der „falsch-negativen“ Ergebnisse zu verzeichnen, was zum Anlass genommen werden sollte die Sensitivität des verwendeten Testsystems sowie die Prozesse der Probenaufbereitung und -Analyse kritisch zu hinterfragen. Dies gilt selbstverständlich auch für die 2 Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen für Probe # 1615463, welche lediglich *E. coli* enthielt. Bei den eingesetzten Testsystemen hielten sich kommerziell erhältliche, vorkonfektionierte Systeme und Eigenentwicklungen in etwa die Waage. Bezüglich analytischer Sensitivität und Spezifität waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen, wenngleich einschränkend angemerkt werden muss, dass für eine verlässlichere Beurteilung weitere Ringversuchsrunden abgewartet werden sollten. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: HAIN Lifescience GenoType Enterococcus (8x), Roche LightCycler VRE Kit (1x), AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz differenz. von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), GeneProof VRE PCR Kit (1x) und QIAGEN artus VanR QS-RGQ Kit (1x).

RV 560: Pneumocystis jirovecii

Dieser im Jahr 2013 neu in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch RV 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum **Direktnachweis von Pneumocystis jirovecii-DNA** in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 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 drei positive Proben (siehe Tab. 1: Anhang 1, S. 22): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1615601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^6 Organismen/mL), eine Probe mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1615603; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^5 Organismen/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1615604; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^4 Organismen/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1615602) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Die „negative“ Probe # 1615602 wurde von nahezu allen Teilnehmern korrekt als negativ für den Zielorganismus gewertet, lediglich 1 falsch-positives Ergebnis wurde berichtet. Der betroffene Teilnehmer sollten ggfs. die laborinterne Testdurchführung und die Performance des verwendeten Testsystems überprüfen. Im Vergleich zur vorausgegangenen Ringversuchsrunde kann jedoch insgesamt ein weiterer Rückgang falsch-positiver oder fraglicher Befunde festgestellt werden. Bei den „positiven“ Proben wurde Probe # 1615601 mit $\sim 1 \times 10^6$ Organismen/mL von 89 der 90 Teilnehmer richtig klassifiziert. Die schwächer positive Probe # 1615603 (ca. 1×10^5 Organismen/mL) wurde ebenfalls von 89 Teilnehmern korrekt als „positiv“ gewertet. Für die Probe mit dem geringsten Gehalt an Zielorganismus (# 1615604, ca. 1×10^4 Organismen/mL an *Pneumocystis jirovecii*) berichteten 6 Labors falsch-negative Ergebnisse. Wie bereits in der vorausgegangenen Ringversuchsrunde muss hier erneut angemerkt werden, dass 10^4 Organismen/mL nicht gerade als „äußerst geringe“ Menge gelten und durchaus mit adäquaten Testsystemen und Arbeitsabläufen detektierbar sind. Leider ist auch in dieser Ringversuchsrunde (im Vergleich zu den zwei vorherigen) erneut keine Steigerung der Performance zu sehen. Inhibitionskontrollen wurden von allen 90 Teilnehmern durchgeführt, Inhibitionsereignisse wurden nicht berichtet. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Diagnostics *Pneumocystis jirovecii* (3x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (2x), Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (2x) und SureFast *Pneumocystis jirovecii* PLUS (1x).

Danksagung

Wie gehabt möchten wir uns an dieser Stelle recht herzlich bei allen Kollegen in den zahlreichen nationalen und internationalen Sollwertlaboratorien sowie bei den Kollegen und Mitarbeitern in Jena, Salzburg, Hamburg, Ober-schleißheim, Bonn, Dresden, München, Berlin, Bochum und Regensburg bedanken, die nach wie vor hochmotiviert an der praktischen Umsetzung unseres gemeinsamen Vorhabens zur externen Qualitätssicherung mitarbeiten.

Zugleich hoffen wir weiterhin auf rege Teilnahme und einen reibungslosen Ablauf der zukünftigen Ringversuchsrunden.

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2016-7/lab000023.shtml>

1. Anhang1_lab000023.pdf (348 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ Mai 2016

Literatur

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11.
3. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanper M, Mkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46331-0
4. Mai M, Müller I, Hunfeld KP. Qualität bakteriologisch-infektionsserologischer Verfahren in Deutschland: Auswertung der infektionsserologischen Ringversuche 2011 – Beitrag der Qualitätssicherungskommission der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab*. 2014;5:Doc05. DOI:10.3205/lab000014

5. 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
6. 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 Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 24:1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
7. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

Korrespondenzadresse:

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

Bitte zitieren als

Reischl U, Schneider W, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Anders A, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2016 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab*. 2016;7:Doc03. DOI: 10.3205/lab000023, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000232

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2016-7/lab000023.shtml>

Veröffentlicht: 05.07.2016

Copyright

©2016 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: discussion of the May 2016 distribution for external quality assessment of nucleic acid-based protocols in diagnostic medical microbiology by INSTAND e.V.

Abstract

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

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

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

Udo Reischl¹
Wulf Schneider¹
Martin Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Michael Baier³
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttler⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Agnes Anders⁸
Martin Kaase⁸

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

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

3 Institute of Medical 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 of 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 May 2016

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 different amounts of *C. trachomatis* (~ 1×10^5 IFU/mL in samples # 1615303 and # 1615304, and ~ 1×10^4 IFU/mL in sample # 1615301) and two samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms (~ 10^6 CFU/mL in sample # 1615301 and ~ 10^3 CFU/mL in sample # 1615303).

Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target organisms in the positive sample # 1615301, all of the 216 participants reported correct positive CT results. For the two samples with a ten-fold higher amount of (# 1615303 and # 1615304), only 1 false-negative result was observed in the current distribution. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by only 9 of the 216 participants for sample # 1615303, which contained a low number of *N. gonorrhoeae* target organisms (1×10^3 CFU/mL) next to a high amount of *C. trachomatis* (1×10^5 IU/mL). Also 10 false-positive results for the two GO-negative samples were reported by participants. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, contamination events of the "GO-negative" samples "2" and "4" by target organism or PCR products of the positive samples "1" and/or "3" is by far not unlikely in the current

sample constellation. So the 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 # 1615303 could not be considered as "extremely low", false negative results should also encourage the corresponding participants to review 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 all but one of the participants and no inhibitory 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 216 participants

Tables 4 to 7 (Attachment 1, p. 2-3) were included this time to enable a detailed evaluation of the *C. trachomatis*- and GO-specific NAT components of combined GO/CT test systems. In Tab. 4 and 5 (Attachment 1, p. 2) only the *C. trachomatis* (CT) specific results and in Tab. 6 and 7 (Attachment 1, p. 3) only the *Neisseria gonorrhoeae* (GO) specific results are presented and evaluated statistically.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three positive samples: # 1615311 and # 1615314 with ~ 1×10^5 IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, and sample # 1615312 with ~ 1×10^4 IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Sample # 1615313 of the current set contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 4), all of the results reported for the negative sample # 1615313 and two of the positive samples # 1615311 and # 1615314 were correct.

For the *C. trachomatis*-positive sample # 1615312, containing a slightly weaker amount of target organisms, one false-negative result was observed among the 95 participants.

This striking match of the current results with observations and accuracy rates in the last years can be con-

sidered as an evidence for a high reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing.

Run controls were implemented and performed by all but one of the 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 95 participants.

RV 532: Bordetella pertussis

The current set of QC samples contained two identical samples with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1615321 and # 1615324; 1×10^5 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella holmesii* (# 1615322; 1×10^5 CFU/mL, IS481-positive strain !), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1615323).

The availability of well-established commercial tests or in-house PCR/NAT-assays has led to a high portion of correct results. Although none of the 152 participants reported false-negative results for the sample # 1615321 (*B. pertussis*, 1×10^5 CFU/mL), very surprisingly two participants observed negative results for the almost identical sample # 1615324 of the current distribution. Analytical sensitivity issues can be ruled out since the amount of 10^5 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.

Only one false-positive result was observed for the negative sample # 1615323 (*E. coli*) whereas the *B. holmesii* sample was tested false-positive by 101 of the 152 participants. Since it is well known that *B. holmesii* strains may contain copies of the most popular *B. pertussis* target gene IS 481, the high rate of false-positives is not really surprising for the latter sample. Considering that the detection rate of the *B. pertussis* samples # 1615321 and # 1615324 was very high (indicating a good performance of the *B. pertussis*-specific PCR/NAT assays), and IS481 is still one of the most practical and sensitive target genes, we have not scored those (false) positive results for the *B. holmesii* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. Colleagues who are interested in the IS481 topic may read the following article: Njamkepo et al. (2011) [2].

However, for participants who have observed false-positive *B. pertussis* results with sample # 1615323 or false-negatives with sample # 1615324, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity and/or sensitivity of their assay concepts. All of the remaining results reported by the 152 participants were correct. Run controls were performed by 150 participants and inhibition events were not observed among the samples of the current distribution.

RV 533: Helicobacter pylori

The current set of QC samples contained two samples with a clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain. Sample # 1615331 contained approximately 1×10^5 CFU/mL and sample # 1615333 approximately 1×10^3 CFU/mL of the respective target organisms. Sample # 1615333 contained culture suspensions of the related species *Helicobacter felis* ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL).

The availability of well evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in the two *Helicobacter pylori*-positive samples # 1615331 and # 1615333 led to very high positive predictive values.

Two false-negative results were observed among the 48 participants for sample # 1615333, which contained only a very low amount of *H. pylori* target organisms (1×10^3 CFU/mL) next to a significant number of *E. coli* cells within our proprietary sample matrix. Of note, five false-positive results and one result classified as “questionable” by the participant were reported for sample 1615332, containing $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL *Helicobacter felis*. This may be indicative of “simple” DNA or sample contamination events originating from the strong positive sample # 1615333 or an insufficiently low level of analytic specificity of the applied PCR/NAT assays. Both possible reasons should prompt re-evaluation in the laboratories of the affected participants.

As noted in the description of RV 533, clarithromycin resistance testing in the examined *H. pylori* isolates could be performed by participants on a voluntary basis. This molecular resistance testing is usually based on amplification and sequencing of characteristic regions within the *H. pylori* 23 S rDNA or the use of hybridization probes based qPCR assays. Results for clarithromycin resistance were reported by 38 of the 48 participants. With one exception, the 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: # 1615342 (*E. coli*, 5×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- and O157-positive) and # 1615344 (*E. coli*, 5×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*_{2c}- and *eae*-positive). The other two EHEC-negative samples contained an EPEC strain (sample # 1615341; 5×10^4 CFU/mL) and an EIEC strain (sample # 1615343; 5×10^4 CFU/mL).

All but 2 participants correctly reported negative results for sample # 1615341, containing no EHEC target organisms but only relatively high numbers of an *eae*-positive EPEC strain. The other “EHEC-negative” sample (#1615343), containing a significant amount of EIEC

isolate was also reported PCR-negative by all but two participants. For the EHEC/STEC positive samples # 1615342 and # 1615344, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in consistently high accuracy rates. Sample # 1615342 was correctly reported positive by 124 of the 125 participants and, again, all but one of the 125 participants detected the target organisms in the EHEC/STEC-positive sample # 1615344 correctly.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 112 of the 125 participating laboratories. With one exception, the reported results were correct. None of the participants observed significant inhibition of the NAT-reaction.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *B. afzelii* organisms in our proprietary matrix: sample # 1615353 (1×10^5 *B. afzelii* organisms/mL), sample # 1615351 (1×10^4 organisms/mL) and sample # 1615354 (1×10^3 organisms/mL). Sample # 1615352 contained no *Borrelia* organisms but a strain of *Treponema phagedenis*.

With the exception of 3 false-negative results and one result classified as “questionable” for sample # 1615354 (containing the lowest amount of target organisms), and one false-negative result for sample # 1615353 (containing the highest amount of target organisms) all other *B. afzelii*-containing samples were correctly identified by the 121 participating laboratories. The false-negative result for sample # 1615353 should prompt re-evaluation of the assay sensitivity.

The “negative” sample # 1615352 was classified false-positive by three laboratories. Potentially, this is either due to cross-reactivity with this closely related spirochete or due to a contamination during sample preparation or analysis. Therefore, the workflow should be optimized to minimize clinically misleading false-positive results.

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*

Due to numerous requests: this test is designed exclusively for the testing of 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 method with the help of an external quality control.

The current set of QC samples contained only one positive sample with *Legionella pneumophila* serogroup 1 (# 1615361; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) next to two samples containing *Legionella longbeachae* (# 1615364; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL and # 1615363; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Sample # 1615362 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) sample # 1615361 was correctly tested positive by all of the 117 participating laboratories. Both of the *L. longbeachae*-positive samples (# 1615363 and # 1615364) were correctly tested negative by 109 participants. Sample # 1615362, which contained only *E. coli*, was tested false-positive by 3 participants whereas the remaining 114 participants reported correct negative PCR/NAT results for *L. pneumophila* DNA. The overall result constellation indicates that at least 3 participants may have contamination problems (false-positive results for sample # 1615361) and some more participants may have specificity problems (false-positive results for samples # 1615363 and # 1615364) with their PCR/NAT-assays. All but two participants have implemented inhibition controls in their test systems and no inhibition events were observed among the samples of the current distribution.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained two samples with *Salmonella enterica* serovar enteritidis (sample # 1615371 with 1×10^6 CFU/ml, and sample # 1615372 with 5×10^4 CFU/ml). Sample # 1615373 contained *Salmonella enterica* serovar tennessee (with 1×10^5 CFU/ml) and sample # 1615374 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

All of the 25 participants reported correct *Salmonella enterica* positive PCR/NAT-results for sample #1615371 and correct results for the negative sample # 1615374. Sample #1615373, containing $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL *Salmonella enterica* serovar tennessee, was correctly identified

as “positive” by 24 of the 25 participants. Reporting a false-negative result for this sample should prompt a thorough re-evaluation of the performance of the test system. The weak-positive sample #1615372, containing only $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL of *Salmonella enterica* serovar enteritidis, was correctly reported “positive” by 17 of the 25 participants. Affected participants may consider to improve the analytical sensitivity of their PCR/NAT assay concepts.

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

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1615383; only *E. coli* cells), two samples positive for *L. monocytogenes* (# 1615382 and # 1615384 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL and one sample with *Listeria innocua* (# 1615381) as *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. The results discussion of the current distribution is easy: all of the 39 participating laboratories detected the *Listeria monocytogenes* target organisms in the two (relatively strong) positive samples # 1615382 and # 1615384. In addition, the “negative” *E. coli* containing sample # 1615383 and the sample containing only *Listeria innocua* (# 1615381) were identified as negative by all laboratories. All of the participants used *Listeria monocytogenes*-specific assays, which is reflected by the high number of “false-negative” results for sample # 1615381. However, as noted in the report form, participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT-assays may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. In this case, (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species do not negatively affect issuing the corresponding QC certificates. In sum, the current results indicate a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA DNA in typical clinical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs, so the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a background of human cells and other components. It is therefore important to note that NAT assays designed mainly for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set. Except of one sample containing an MSSA isolate together with almost equal amounts of a methicillin-resistant *mecA*-positive coagulase negative *Staphylococcus* species, no “difficult” or “interesting” *Staphylococcal* strains were included into the current panel.

Sample # 1615391 of the current distribution contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and a CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-positive, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL).

Sample # 1615394 contained a cMRSA or CA-MRSA isolate (MRSA, PVL-positive, spa:t 008; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 313 participating laboratories.

Sample # 1615392 contained a cMRSA isolate (MRSA, PVL-positive, spa:t 310; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 313 participating laboratories. One sample of the current set (# 1615393) contained no MRSA target organisms but only a clinical isolate of an oxacillin-sensible CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-negative, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL).

The MRSA negative sample # 1615393 was tested by 307 of 310 participants with their PCR-based MRSA-specific test systems as “negative”, so only three participants observed a false positive result for sample # 1615393, which may have probably been caused by contamination with MRSA DNA during the sample preparation, amplification or detection. Fortunately, for the relatively strong positive cMRSA sample # 1615394, positive results were reported by almost all participants. Even if sample # 1615392 contained a slightly lower amount of MRSA target organisms (1×10^4 CFU/mL), correct positive results were still reported by 307 participants, leading to positive predictive values of above 99%. The 2 false negative results and one result classified as “questionable” by the participating laboratory are probably due to an insufficient analytical specificity of the used in-house or commercial PCR/NAT test systems.

For the sample # 1615391, which contained a MSSA isolate together with a methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species, 286 of 310 participants reported their results correctly as “MRSA-negative” and 7 participants classified the results as “questionable”. Five of these 7 participants indicated the use of test systems, which are based on a separate detection of the *mecA* gene and *S. aureus* specific target genes. With this separate detection assays, the origin of the *mecA* target gene cannot definitively be correlated with the *S. aureus* or the coagulase-negative *Staphylococcus* species. Regarding this aspect, “questionable” is the scientifically correct result in the case when using duplex PCR/NAT assays, which are correlating quantitative results and using a kind of software algorithm for confirming or ruling out the presence of *mecA*-positive *S. aureus* organisms in the investigated sample. The remaining 17 participants reported false-positive results for MRSA for sample # 1615391, containing a mixture of a MSSA isolate and a methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species. These participants are encouraged to analyse the appropriateness of PCR/NAT their test systems or assay concepts since the simultaneous presence of MSSA and *mecA*-positive CoNS organisms is a relatively common scenario for microbiological routine diagnostics of nasal swabs. On the other hand, all participants, who used

SCCmec based test systems, reported correct MRSA-negative results for sample # 1615391.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported correct results for all 4 samples of the current EQAS distribution. This indicates excellent sample workup functioning of laboratory-specific prevention measures to avoid the risk of contamination and carry-over events.

Also, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor **PVL (Panton-Valentine Leukocidin)** or its coding gene *lukF/S-PV* was inquired. Corresponding results were reported by 63 of the total 310 participating laboratories and within the current distribution the results for the molecular PVL testing were correct in all but one case. Additional information can be found at: Linde et al. (2005) [5] or Witte et al. (2005) [6]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at: Reischl et al. (2007) [7].

In addition, commercial real-time PCR assays reliably targeting PVL-genes in MRSA and MSSA isolates are available from a number of diagnostic companies in the meantime (e.g., r-biopharm or TIB Molbiol).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. pneumoniae* in typical (clinical) 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 specimens. So the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components. As a consequence, diagnostic assays designed for *C. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *C. pneumoniae* infected cells in individual samples of the QC set.

The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1615404 was spiked with $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml of *C. pneumoniae*, whereas sample # 1615401 contained an approximately ten fold lower amount of *C. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml). Sample # 1615403 contained significant numbers of *C. trachomatis* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml). Only *E. coli* and human cells were present in sample # 1615402.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 14), with two exceptions all participants reported correct results for the positive sample # 1615404. However, for the second sample containing a tenfold lower amount of *C. pneumoniae* (# 1615401) 10 false-negative results were reported. For the "negative" samples # 1615403 and # 1615402 (containing *Chlamydia trachomatis* and *E. coli*, respectively), 129 and 130 of 131 laboratories reports correct negative results. False-positive results are most probably due to (cross-)contamination during sample processing and extraction, as cross-reactivity of NAT/PCR-

based assays specific for *Chlamydia pneumoniae* with *Escherichia coli* or *Chlamydia trachomatis* is unlikely. Certainly, a false-positive result should prompt investigations and improvement of the diagnostic workflow.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

The current set of QC samples contained three positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL) was present in sample # 1615412. An approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1615414 and sample # 1615413 contained an approximately hundred fold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL). The set was completed by sample # 1615411, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli*. With the exception of one laboratory, all participants correctly reported samples # 1615412 and # 1615414 as positive. However, 7 laboratories reported false-negative results for sample # 1615413, containing the lowest amount of target organism ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL). The *E. coli* (# 1525413) containing sample was correctly reported "negative" by all 143 participants.

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

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

The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *Coxiella burnetii* organisms ($\sim 5 \times 10^3$ genome copies/mL in sample # 1615423 and $\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1615421), one

sample with $\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL of *Bacillus anthracis* (sample # 1615422) and one sample with $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL of a *Bacillus anthracis* Pasteur Strain (sample # 1615423). Sample # 1615424 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

For convenient data presentation and analysis, we decided to depict the PCR/NAT-results for each target organisms within this combined EQAS scheme in two separate tables: please see Tab. 2 and 3 (Attachment 1, p. 16) for the *Coxiella burnetii*-specific results and Tab. 4 and 5 (Attachment 1, p. 17) for the *Bacillus anthracis*-specific results.

Coxiella burnetii: The relatively high amount (5×10^4 genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1615421 was correctly reported by all participants. The ten-fold lower concentration of the pathogen in sample # 1615423 was correctly identified as “positive” by 32 of the 34 participating laboratories. False-negative results should prompt a reassessment of the performance of the test system used and evaluation of processes regarding sample workup and analysis. The two “negative” samples (# 1615424 contained only *E. coli* and # 1615422 contained only *B. anthracis*) were correctly reported negative by 34 and 32 participants, respectively. 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: All participants correctly reported negative results for the sample # 1615424 which did not contain the target organism. For the second “negative” sample (# 1615421), we received one false-positive result. The “positive” sample # 1615422 containing $\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL *B. anthracis* strain “UR-1” was correctly reported by 17 of the 20 participants. Additionally, we received one questionable result and two false-negative results, which should definitely prompt investigations regarding sample workup and performance of the test system, as the amount of the target organism in the sample is still above the lower limit of detection. With the exception of three participants, the second positive sample # 1645423 ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL of *B. anthracis* strain “Pasteur”) was correctly reported. This particular strain is positive for the virulence plasmid pXO2 and the *B. anthracis*-specific markers *rpoB* and *dhp61*, but does not harbor “lethal and edema factor” encoding plasmid pXO1 and is therefore also negative for the commonly used pathogenicity marker *pagA* (coding for the “Protective Antigen”) After this 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

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is to determine the analytical

sensitivity and specificity of NAT-based assays for the **direct detection of *F. tularensis* DNA in typical sample material**. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained two positive samples: a high amount of *Francisella tularensis* spp. *tularensis* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1615431 and an approximately ten-fold lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1615433. Similar to QC samples from past distributions, the positive samples # 1615431 and # 1615433 were correctly tested positive by all of the 22 participating laboratories. The “negative” samples # 1615432 and # 1615434, both containing only *E. coli*, were correctly reported by 21 and 22 of the 22 participating laboratories. Overall, these results corroborate the lower limits of detection observed in our previous EQAS distributions. Although the number of participating laboratories is still not very high, the results of the present distribution indicate that the lower limit of detection is about or slightly below 10^4 organisms/mL when using currently employed and well evaluated PCR/NAT-based assay concepts for the detection of *F. tularensis* DNA.

RV 544: Carbapenemase genes

The concept of this novel EQAS-panel for the detection of carbapenemase genes is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for molecular resistance testing or the direct detection of carbapenemase genes from DNA preparations of *Enterobacteriaceae* culture isolates. Because of the methodologically challenging design of EQAs for the molecular resistance testing of the wide range of known carbapenemase coding genes in different bacteria, the panel is narrowed down to a small selection of the currently most common carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae*: KPC, VIM, OXA-48 like genes, GES carbapenemases, NDM, IMP, and GIM.

As shown in Tab. 1 (Attachment 1, p. 19), the current set contained three samples with different carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1615441 contained *Klebsiella pneumoniae* with a KPC-3 gene ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL), sample # 1615442 contained an *Serratia marcescens* isolate with a NDM-1 gene ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL), and sample # 1615444 contained an *Enterobacter cloacae*-Complex with a VIM-1 and OXA-48 genes ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL). The fourth sample # 1615443 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes.

All participants detected a carbapenemase gene in the NDM-1 positive *S. marcescens* sample (# 1615422). Additionally, all participants classified the sample # 1615444 (*E. cloacae*-complex with VIM-1 and OXA-48 genes) correctly as positive for the presence of car-

bapenemase genes. The third “positive” sample # 1615441 (containing *Klebsiella pneumoniae* with a KPC-3 gene) was correctly reported by 59 participants. A false-negative result for this sample should prompt investigations regarding the coverage of carbapenemase genes by the test system used.

RV 545: Clostridium difficile

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of C. difficile DNA in typical sample material**. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. The lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained two *Clostridium difficile* positive samples: sample # 1615451 with $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL and sample # 1615453 with $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL. Samples # 1615452 and # 1615454 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

The samples # 1615451 and # 1615453 containing relatively high amounts of *C. difficile* (1×10^4 CFU/mL and $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) were correctly reported as “positive” by 109 and 108 of the 110 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 # 1615452 and # 1615454, 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 participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 546: VRE

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

Sample # 1615461 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecium* vanB ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1615464 contained a similar amount of *Enterococcus faecium* vanA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1615462 contained a ten-

fold lower amount of *Enterococcus faecium* vanA ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and sample # 1615463 contained no target organisms but only human cells and *E. coli*. Of the 41 participating laboratories, 41 and 40 correctly reported positive results for the samples # 1615461 and 1615463, respectively. Of note, the reported dedicated vanA/vanB identifications for these two samples were all correct. Sample # 1615462 contained the lowest amount of target organism (*Enterococcus faecium* vanA, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and only 36 laboratories identified the sample as “VRE-positive”. This should prompt investigations regarding the sensitivity of the used test system as well as re-evaluation of sample processing and -analysis. Importantly, this should also be considered by the two participants reporting false-positive results for sample # 1615463. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 560: Pneumocystis jirovecii

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

The latest set of QC samples contained three positive specimens (see Table 1: Attachment 1, p. 22). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) was present in sample # 1615601, an approximately tenfold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) was present in sample # 1615603 and an approximately hundredfold lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL) was present in sample # 1615604. The set was completed by sample # 1615602 which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Sample # 1615601, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) and sample # 1615603 with a ten-fold lower concentration of *P. jirovecii*, were both reported “positive” by 89 out of the 90 participating laboratories. Although this could be due to a loss of template DNA during pre-analytical sample preparation procedures or other reasons, observation of false-negative results should certainly trigger reassessment of the diagnostic workflow, sensitivity and/or specificity of the individual assay concept. The sample containing the lowest amount of the target organism (# 1615604, $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL) was correctly identified as positive by 84 participants, 6 false-negative results were recorded. The “negative sample” (# 1615602, containing only *E. coli*) was correctly classified “negative” by 89 participants. In case of false-positive

results, this should definitely prompt investigations to control all processes involved in sample preparation and analysis in order to optimize the NAT assay used.

Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2016-7/lab000023.shtml>

1. Anhang1_lab000023.pdf (348 KB)
Results of the proficiency testing scheme "Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)" May 2016

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. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11.
3. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanper M, Mkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46331-0
4. Mai M, Müller I, Hunfeld KP. Qualität bakteriologisch-infektionsserologischer Verfahren in Deutschland: Auswertung der infektionsserologischen Ringversuche 2011 – Beitrag der Qualitätssicherungskommission der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab*. 2014;5:Doc05. DOI:10.3205/lab000014

5. 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
6. 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 Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 24:1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
7. 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

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, Schneider W, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Anders A, Kaase M. *Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2016 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik*. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab*. 2016;7:Doc03. DOI: 10.3205/lab000023, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000232

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2016-7/lab000023.shtml>

Published: 2016-07-05

Copyright

©2016 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/>.