

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2013 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.instandev.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
Thomas Holzmann¹
Martin Ehrenschwender¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Wolf Spletstösser⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷

- 1 Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg, Regensburg, Deutschland
- 2 Labor Dr. Heidrich und Kollegen MVZ GmbH, Hamburg, Deutschland
- 3 Institut für Medizinische Mikrobiologie, Klinikum der Friedrich-Schiller Universität Jena, 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, Dresden, Deutschland
- 7 Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie

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 NAT-gestützten Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *EHEC/STEC*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Legionella pneumophila*, *Salmonella enterica* und *Listeria spp.*, *MRSA* bzw. *cMRSA*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* und *Pneumocystis jirovecii* (vorm. *P. carinii*) darstellen und kurz diskutieren.

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

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

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 15 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „Highlights“: so wurde beispielsweise im aktuellen **RV 535 *Borrelia burgdorferi*** eine Probe mit *Borrelia bisetii* versandt, die innerhalb der 18 *Borrelia burgdorferi* sensu lato Spezies bisher nur sehr selten in klini-

schem Probenmaterial beobachtet bzw. nachgewiesen werden konnte. Als weiteres „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 534 ein Shiga-Toxin 2f (stx-2f)-positives EHEC-Isolat** ausgesandt, das erwartungsgemäß nicht von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen EHEC-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen detektiert werden konnte. Die Gensequenz von stx-2f weist bekanntermaßen relativ wenig Homologie zu den übrigen Shiga-Toxin-Gensequenzen auf und zudem ist dessen humanpathogene Relevanz nach wie vor etwas umstritten. Aber mehr dazu im EHEC-spezifischen Teil dieser Ringversuchsdiskussion. Mit der Probe # 1325434 des **RV 543** wurde erstmalig auch DNA der „4.“ Subspezies, von **F. tularensis (spp. novicida)** ausgesandt. Stämme dieser Subspezies treten sehr selten als Ursache einer Infektion beim Menschen auf – es gibt aber Beschreibungen von z.T. tödlich verlaufenden Einzelerkrankungen bei Patienten mit eingeschränkter Immunfunktion.

Angesichts der beiden Milzbrandfälle bei Heroinkonsumenten aus dem Raum Regensburg, die wir letztes Jahr sowohl kulturell isolieren, mittels real-time PCR identifizieren und in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (München) und dem RKI (Berlin) auch molekular feintypisieren konnten, wird der Ringversuch **RV 542 (Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii*)** zukünftig um den Zielorganismus ***Bacillus anthracis*** erweitert, und im Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. als kombinierter PCR/NAT-Ringversuch **„RV 542 Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii*/*B. anthracis*“** gelistet. Aufgrund des großen Interesses an geeigneten PCR-Protokollen und der Verfügbarkeit von entsprechendem Positivkontrollmaterial, haben wir uns entschlossen, diesen kombinierten Ringversuch **RV 542** als speziellen Service für die im L3-Bereich tätigen Kolleginnen und Kollegen, ohne Mehrkosten, im Vergleich zu dem vormaligen *C. burnetii* Ringversuch anzubieten. Bei der fachlichen Betreuung werden wir hier dankenswerterweise durch Herrn Kollegen PD Dr. Gregor Grass vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (München) unterstützt.

Nach erfolgreichem Verlauf der letzten beiden Ringversuchsrunden wurde der **RV 560** zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von ***Pneumocystis jirovecii* DNA** nun in das reguläre Ringversuchsprogramm „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. aufgenommen. Auf vielfachen Wunsch aus dem Kollegenkreis planen wir für den nächsten Aussendetermin im **Mai 2014** einen **Proberingversuch „RV 544 Differenzierter Nachweis von Carbapenemase Genen – PCR/NAT“**. An der Ringversuchsleitung und Konzeption werden meine geschätzten Kollegen Herr Dr. Martin Kaase und Herr Prof. Dr. Sören

Gatermann vom Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger in Bochum maßgeblich beteiligt sein.

Im Rahmen des Proberingversuchs mit reduzierter Teilnahmegebühr werden ca. 40 Probensets zur Verfügung stehen, die nach dem Eingangsdatum der entsprechenden Anmeldungen zugeteilt werden. Bei Interesse also schnell über INSTAND e.V. anmelden!

Kolleginnen und Kollegen 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.

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 # 1325304), sowie zwei der positiven Proben des RV 531 (# 1325311 und # 1325313), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1325302 und # 1325304), *Listeria* spp. (Probe # 1325383), *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 1325413), *Coxiella burnetii* (Probe # 1325422), sowie *Bacillus anthracis* (Probe # 1325423). Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäuregestützten 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. Angesichts der wachsenden Zahl an einzelnen und damit auch individuell zu diskutierenden Ringversuchen werde ich mich zukünftig bemühen, **den Umfang dieser turnusmäßigen Ringversuchsauswertung in überschaubaren Grenzen zu halten und dabei dennoch versuchen, alle relevanten Informationen für die einzelnen Teilnehmer darzustellen**. In diesem Zusammenhang freue ich mich natürlich auf jede Art von Rückmeldung aus dem Kreis der Ringversuchsteilnehmer und möchte ich mich gleichzeitig bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den vorhergegangenen Ringversuchsdiskussionen bedanken.

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Die Tabellen 1 zeigen dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert). Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in den Tabellen 2 nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen und in den Tabellen 3 nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse sowie deren prozentua-

lem 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 auch immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

Untersuchungsergebnisse November 2013

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 Analysensysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive, als auch für negative Befunde.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit relativ geringen Menge an *C. trachomatis* (# 1325303, $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL und # 1325304, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL), zwei Proben (# 1325302 und # 1325304) mit ca. 1×10^3 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* und eine Probe mit 10-fach höherer Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen (# 1325301; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Der Übersichtlichkeit halber werden wir bei diesem kombinierten Ringversuch (CT/NG) die Ergebniskonstellation zukünftig in **7 getrennten Tabellen** darstellen (vgl. Anhang 1, S. 1-4). Damit wird die diagnostische Performance der jeweiligen Testsysteme beim Nachweis von CT und NG aussagekräftiger dargestellt (Tab. 4: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei CT, Tab. 6: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei NG; jeweils gefolgt von den Richtigkeitsquoten nach aufgeführten Testsystemen in Tab. 5 und 7).

Auch wenn die beiden positiven Proben # 1325303 und # 1325304 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden waren, fanden sich unter den von insgesamt 147 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 4 falsch-negative Ergebnisse. Da von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den

falschen Ergebnissen vermutlich um Ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die Proben # 1325302 und 1325304 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^3 CFU/mL) diesmal von 19 der insgesamt 144 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken DNA mitgeteilt. In der dritten GO-positiven Probe # 1315301 befand sich mit 1×10^4 CFU/mL eine etwa 10-fach höhere Menge an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen, die diesmal erfreulicherweise von allen Teilnehmern einwandfrei nachgewiesen werden konnten.

Offenbar bereitet der spezifische Nachweis von Gonokokken-DNA in Probenmaterial, das neben Gonokokken zusätzlich auch noch *C. trachomatis*-Zielorganismen enthält, manchen Teilnehmern (bzw. den von diesen Teilnehmern eingesetzten Testsystemen) gewisse Schwierigkeiten: 12 falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1325304 gegenüber nur 7 falsch-negativen Ergebnissen bei Probe # 1325302. Für diesen Effekt, der in ähnlicher Konstellation ja bereits in einigen der vorhergehenden Ringversuchsrunden beobachtet wurde, hat der Ringversuchsleiter keine naheliegende Erklärung. Denkbar wäre natürlich eine gewisse Konkurrenzsituation der im Reaktionsgemisch der proprietären Testkits vorhandenen Primer-Moleküle. Zumindest aus wissenschaftlicher Sicht ist bei Chlamydien und Gonokokken aber davon auszugehen, dass die spezifische Amplifikation von Genomsegmenten dieser beiden unterschiedlichen Zielorganismen über unterschiedliche Primersets verläuft und seitens der Hersteller dafür keine Konsensus-Primersequenzen eingesetzt werden.

Da sich das hier beobachtete „Sensitivitätsproblem“ offensichtlich nicht auf bestimmte Testkonzepte eingrenzen lässt und sich sporadisch durch das ganze Portfolio der eingesetzten Testsysteme zieht, kann dem großen Rest des Teilnehmerfeldes erneut eine erfreulich gute analytische Sensitivität und Spezifität ihrer CT- und GO-spezifischen NAT Testsysteme, sowie der angewandten Prozeduren zur Probenaufarbeitung und -prozessierung attestiert werden.

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.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 148 Teilnehmern 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, Ar-

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

Dies gilt im aktuellen Ringversuch vor allem für den einen (!) Teilnehmer mit dem neuen Cepheid Xpert CT/NG Testsystem und den drei Teilnehmern mit dem Artus CT/NG Testkits – auch wenn diese Teilnehmer mit ihren Testsystemen im aktuellen Ringversuch nahezu durchgehend 100% Richtigkeitsquoten erzielen konnten. Von einem der drei Teilnehmer mit Artus Testkit wurde hier ein falsch-negatives Ergebnis bei NG mitgeteilt und die Richtigkeitsquote sinkt dadurch von 100 auf 89%.

RV 531: Chlamydia trachomatis

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal zwei Proben mit relativ niedriger Menge an Zielorganismen (# 1325311 und # 1325313, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL), eine Probe (# 1325314) mit ca. 5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis*, sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1325312), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 5) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei den drei positiven Proben von den insgesamt 102 Teilnehmern überwiegend korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Bei der etwas stärker positiven Probe # 1325314 fanden sich 2 falsch-negative Ergebnisse und bei den etwas schwächer positiven Proben # 1325311 und # 1325313 jeweils 2 bzw. 6 falsch-negative Ergebnisse auf den Reportformularen.

Bei der negativen Probe # 1325312, die ausschließlich nicht infizierte Humanzellen und *Escherichia coli* enthielt, sollten die falsch-positiven Ergebnisse bei den drei betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres DNA-Isolierungsprozesses bzw. des jeweiligen *Chlamydia trachomatis*-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben.

Von je einem Teilnehmer wurden die Ergebnisse bei den Proben # 1325312 und # 1325313 als „fraglich“ klassifiziert. Bei der Mitteilung von fraglichen Ergebnissen werden die entsprechenden Zertifikate nur dann erteilt, wenn diese Teilnehmer bei den übrigen 3 Proben des RV 531 korrekte Ergebnisse angegeben haben.

Die markante Übereinstimmung der aktuellen Ergebniskonstellation mit den Beobachtungen und Richtigkeitsquoten vorhergegangener Ringversuche mit ähnlicher Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen kann, zumindest indirekt, erneut als Beleg für eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz der eingesetzten Testsysteme und der Probenabarbeitung angesehen werden.

Auch wenn mit 1×10^3 IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht zu sein scheint, sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität 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.

Anmerkung: Wie bereits bei der Diskussion des RV 530 erwähnt, sollten in der Ergebnistabelle vor einer vorschnellen Bewertung einzelner kommerzieller Testsysteme erst die effektiven Teilnehmerzahlen berücksichtigt werden, die den dargestellten Richtigkeitsquoten arithmetisch zugrunde liegen. Dies gilt im aktuellen Ringversuch vor allem für den einen (!) Teilnehmer mit dem TIB Molbiol LightMix CT/NG Testsystem und die vier Teilnehmer mit dem Abbott CT/NG Test – bei kleiner Teilnehmerzahl schlagen einzelne „Ausreißer“ prozentual natürlich stärker zu Buche und interessanterweise wurden mit beiden Testsystemen von anderen Teilnehmern bei vergleichbarer Fragestellung und CT Zielorganismen-Menge im RV 530 wesentlich bessere Ergebnisse erzielt.

Inhibitionskontrollen wurden von allen 102 Teilnehmern 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 hohem Niveau mit geringer statistischer Streuung.

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal nur eine positive Probe mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (# 1325322 mit 1×10^4 CFU/mL), sowie

eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella parapertussis* als verwandte Spezies (# 1325324 mit 1×10^4 CFU/mL). Die Proben # 1325321 und # 1325323 enthielten diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA führte auch diesmal wieder zu durchweg hohen Richtigkeitsquoten sowohl bei den positiven, als auch bei den negativen Proben. Lediglich von einem der insgesamt 116 Teilnehmer wurde ein falsch-negatives Ergebnis für die positive Probe # 1325322 (*B. pertussis*, 1×10^4 CFU/mL) mitgeteilt. Bei der Probe # 1325324 mit 1×10^4 CFU/mL an *B. parapertussis* wurden von 3 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse beobachtet. Hierbei handelt es sich offensichtlich um *in-house* PCR/NAT-Testsysteme mit unzureichender Spezifität oder um laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung.

Inhibitionskontrollen wurden von 115 der insgesamt 116 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet. Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifizierte kommerzielle Testkits mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 54 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 10 Teilnehmern die Verwendung des Pertussis Toxin Gens und von 3 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gensegments als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 7) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit einer sehr hohen Menge an Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* (# 1325332; $\sim 10^5$ CFU/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1325333; $\sim 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1325334, $\sim 10^4$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1325331), die nur humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analyse-systeme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in zwei der drei positiven Proben (# 1325332 mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL und # 1325333 mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) führte beim Nachweis von *H. pylori*-DNA im aktuellen Ringversuch erfreulicherweise zu Richtigkeitsquoten von 100%. Auch wenn diesmal keine „non-pylori“ *Helicobacter*-Spezies in einzelnen Proben des 4-er-Sets versandt wurden, deutet die Ergebniskonstellation dennoch auf eine gute analytische Spezifität und analytische Sensitivität der eingesetzten PCR-Testsysteme hin. Sowohl die kommerziellen, als auch die eigenentwickelten Testsysteme-

me schnitten im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab. 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 29 der insgesamt 35 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines einzigen Teilnehmers 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 drei unterschiedliche, aber relativ stark EHEC positive Proben: mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1325341: *E. coli*, *stx*₁-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv und # 1325343: *E. coli*, *stx*_{2f}- und *eae*-positiv) und mit ca. 1×10^4 CFU/mL (# 1325342: *E. coli*, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv). Die Probe # 1325344 enthielt einen *E. coli* K12-Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ).

Mit Ausnahme der Probe #1325343 (*stx*_{2f}-positiven EHEC-Isolat) führte die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC bei den restlichen drei Proben durchweg zu hohen Richtigkeitsquoten – sowohl für positive, als auch für negative Befunde. Von 98 der insgesamt 104 Teilnehmer wurden durchweg korrekte Ergebnisse berichtet.

Für die 3 falsch-negativen PCR-Resultate bei dem *stx*₁-positiven EHEC-Isolat (# 1325341) sowie den 6 falsch-negativen PCR-Befunden bei dem *stx*₁- und *stx*₂-positiven EHEC-Isolat (# 1325342) gibt es keine naheliegenden Erklärungen – eventuell decken die eingesetzten Testkonzepte der entsprechenden Teilnehmer nicht das gesamte zu erwartende Spektrum an „üblichen“ *stx*₁- und *stx*₂-Genen ab (Gennachweis gilt als molekularer Marker für das Vorliegen von EHEC/STEC bzw. *Shigella dysenteriae* Typ 1 bei *stx*₁). Interessanterweise waren von den falsch-negativen EHEC-Ergebnissen bei den Proben # 1325341 und # 1315342 diesmal vorwiegend Anwender mit kommerziellen Testsystemen betroffen. Da jedoch bei genauerer Betrachtung der Ergebnislage von der überwiegenden Mehrzahl der Anwender solch vorkonfektionierter und standardisierter kommerzieller PCR-Kits richtige Befunde berichtet wurden, sollten entsprechende Defizite

in Einzelfällen nicht so sehr bei den Konzepten oder dem Design der PCR-Testsysteme selbst, sondern vermutlich eher auf Seiten der betroffenen Anwender gesucht werden.

Aus wissenschaftlicher Sicht ist bei den üblicherweise eingesetzten PCR/NAT-Testsystemen eine „diagnostische Lücke“ allenfalls für *stx*_{2f} aufgrund der deutlich von den anderen Shiga-Toxin-Genen abweichenden Gensequenz zu erwarten. Dies wurde im aktuellen Ringversuch mit der Probe # 132343 eindrucksvoll bestätigt. Hier wurde lediglich von 25 der insgesamt 104 Teilnehmer ein positives Ergebnis für die Anwesenheit von Shiga-Toxin-Genen berichtet. Auch wenn die humanpathogene Relevanz von ***stx*_{2f}-positiven EHEC-Isolaten** in der Fachwelt nach wie vor umstritten ist, soll hier an einem Beispiel aus der mikrobiologischen PCR-Routinediagnostik wieder einmal die überraschende Vielfalt an möglichen Genkonstellationen im Umfeld von EHEC-Isolaten aufgezeigt werden.

Der bisher einzige Nachweis eines *stx*_{2f} positiven EHEC-Isolates in unserem Hause erfolgte aus einer Lebensmittelprobe, als im Zuge des EHEC-Ausbruchsgeschehens im Jahre 2011 umfangreiche Screeninguntersuchungen aus Stuhl-, Umwelt- und Lebensmittelproben durchgeführt wurden. In diesem Fall passte der *stx*_{2f}-Nachweis übrigens „anamnestisch“ hervorragend zu den bekannten Übertragungsrouten (Blattsalat aus Gewächshaus, das aus ökologischen Gründen mit Regenwasser aus der Dachrinne bewässert wurde; das Dach dieses Gewächshauses war ein beliebter Rastplatz für die Bewohner von umliegenden Taubenkobeln ...). Zur Thematik der „*stx*_{2f}-positiven *E. coli*-Isolate“ sind inzwischen auch zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht worden. Exemplarisch sei hier auf eine Publikation von Mitarbeitern des RKI in Wernigerode aus dem Jahre 2009 verwiesen [2].

Anmerkung an die Teilnehmer des aktuellen Ringversuchs: bitte keine Angst um die Zertifikate, denn diese Probe wurde als „edukative Probe“ deklariert und die entsprechenden Ergebnisse werden daher bei der offiziellen Bewertung zur Erteilung von Ringversuchszertifikaten außen vor gelassen.

Die Probe # 1325344 (*E. coli* K12-Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde von nahezu allen Teilnehmern korrekterweise als negativ befundet – sie führte lediglich bei 2 der insgesamt 104 Teilnehmer zu einem falsch-positiven Ergebnis.

Zudem wurden von 95 der insgesamt 104 Teilnehmer die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsserie bereits mehrfach angesprochen, sind die starken Schwankungen

vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *B. burgdorferi* sensu lato-Genotypen bzw. auch OspA-Typen, die in Europa und Asien mit relativ hoher Inzidenz gefunden werden, nach wie vor ein zentrales Problem der NAT-gestützten Borrelien-Diagnostik. Diese Situation spiegelte sich auch in gewissem Umfang bei der Auswertung der bisherigen Ringversuche zum Nachweis von Borrelien-DNA wider. Im Umfeld des aktuellen Ringversuchs wollten wir uns bei der Auswahl von Art und Menge der Zielorganismen wieder auf die Abprüfung der analytischen Spezifität fokussieren.

Diesmal wurden bei der Konzeption des Ringversuchs unterschiedliche Borrelien-Spezies in 3 der 4 Einzelproben an die Teilnehmer versandt, und das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher eine Probe mit ca. 1×10^4 Organismen/mL an *Borrelia bissetii* (# 1325351), eine Probe mit ca. 1×10^4 Organismen/mL an *Borrelia spielmanii* (# 1325353), eine Probe mit ca. 1×10^4 Organismen/mL an *Borrelia afzelii* (# 1325354) sowie eine Probe, die ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial enthielt (# 1325352).

Zur kurzen Rekapitulation

Mittlerweile sind 18 verschiedene dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörige, genetisch eindeutig unterscheidbare Spezies beschrieben, die selbstverständlich auch entsprechende Unterschiede bei verschiedenen Zielgenen aufweisen. Von besonderem Interesse – da gesichert humanpathogen und weit in Europa verbreitet – sind *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* und die aktuell als neue Spezies akzeptierte *B. bavariensis*. Zur Häufigkeit der ebenfalls gesichert humanpathogenen *B. spielmanii* existieren bislang keine breit angelegten Studien. *B. spielmanii* wurde bislang nur bei Hautmanifestationen der Lyme-Borreliose beschrieben und scheint insgesamt nur selten an Erkrankungen beteiligt zu sein. Als möglicherweise humanpathogen werden *B. bissetii*, *B. lusitanae* und *B. valaisiana* eingestuft. Bezogen auf das OspA zeigt insbesondere *B. garinii* eine auffällige Heterogenität mit wenigstens 5 verschiedenen genetisch differenzierbaren Typen.

B. bissetii und **B. spielmanii** wurden bewusst als ungewöhnliche bzw. seltene *B. burgdorferi*-Spezies in den Ringversuch eingeschlossen. Beide Stämme wurden von Patienten isoliert. **Der Patient mit der B. spielmanii-Infektion** hatte im Vorfeld der aktuellen Infektion schon drei bei uns mittels Erregernachweis oder PCR gesicherte Borrelieninfektionen – jeweils durch exogene Re-Infektion, da es sich um unterscheidbare Stämme handelte. Der *B. spielmanii*-Stamm konnte nach verlängerter (10-wöchiger) Kultur aus einem Erythema migrans isoliert werden, welches sich im Bereich einer zuvor abgeheilten Acrodermatitis chronica atrophicans entwickelt hatte. Der Patient hatte bei Zustand nach mehreren Borrelien-Infektionen sehr hohe IgG-Antikörpertiter, und ein breites Spektrum erkannter Banden im IgG-Blot, was erneut zeigt, dass

vorhandene Antikörper nicht zuverlässig gegen eine Re-Infektion schützen.

Der **B. bissetii-Stamm** konnte aus dem Liquor eines Patienten isoliert werden, der nur leichte Symptome einer Neuroborreliose präsentierte. Auch der Liquor zeigte nur schwache entzündliche Veränderungen. Diese Spezies konnte ansonsten bislang nur bei wenigen Patienten aus Slowenien angezüchtet werden, wobei diese Stämme nicht mehr existieren. Interessanterweise wurde diese Spezies in Europa bei verschiedenen Prävalenzstudien mit Zecken lediglich in einer Zecke gefunden, während in den USA diese Spezies nur in Zecken und bislang aus keinem Patient nachgewiesen werden konnte.

Zu den Ringversuchsergebnissen

Borrelia afzelii in der positiven Probe # 1325354 ($\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL) wurden bei 91 (95%) der insgesamt 96 Teilnehmer von den jeweils eingesetzten Borrelien-spezifischen PCR/NAT Testsystemen erfasst und korrekterweise als positiv befundet, lediglich 5 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Probe # 1325353 mit ca. 10^4 *B. spielmanii*-Zielorganismen/mL wurde von 92 (97%) der Teilnehmer als richtig positiv erkannt und 4 Teilnehmer berichteten ein falsch negatives Ergebnis. Immerhin noch 87 (90%) der Teilnehmer identifizierten die Probe # 1325351 mit ca. 10^4 *Borrelia bissetii*-Zielorganismen/mL als richtig positiv, während 7 Teilnehmer diese Probe mit der nur sehr selten anzutreffenden Borrelien-Spezies als falsch negativ beurteilten und 2 weitere Teilnehmer diese als fraglich klassifizierten. Falsch-negative Ergebnisse insbesondere bei den beiden relativ stark positiven Proben mit *B. spielmanii* und *B. afzelii* sollte den entsprechenden Teilnehmern Anlass geben, ihre Testsysteme einschließlich der Aufarbeitung und DNA-Extraktion einer eingehenderen Prüfung zu unterziehen.

Wie bei den vorhergehenden Ringversuchsrunden haben auch diesmal wieder ungefähr 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 43 der 96 Teilnehmer eingesetzt. Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen (Sensitivität zwischen 95 und 100%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 93%) zu beobachten. Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden großteils mitgeführt und signifikante Inhibitionsereignisse der PCR-Reaktion wurden im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem der 96 Teilnehmer beobachtet.

RV 536: Legionella pneumophila

Aufgrund zahlreicher Anfragen hier eine wichtige Anmerkung vorab: 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 4-er-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 eine sehr stark positive Probe # 1325361, die mit einer Menge von ca. 10^6 CFU/mL an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 3 versetzt war, sowie eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1325362, ca. 10^4 CFU/mL) an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 3. Die Probe # 1325363 des aktuellen Sets enthielt ca. 10^6 IFU/mL an *Chlamydia pneumoniae*. Die „negative“ Probe # 1325364 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*. Letztere wurde erfreulicherweise von 83 der insgesamt 84 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Dies spricht wieder einmal für ein gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Die relativ stark positive Probe # 1325361 mit ca. 10^6 CFU/mL an *Legionella pneumophila* wurde diesmal von allen 84 Teilnehmern korrekterweise als positiv befundet. Die etwa 100-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 1325362 (ca. 10^4 CFU/mL) konnte immerhin noch von 78 Teilnehmern mit ihren jeweiligen speziesspezifischen PCR-Testsystemen erfolgreich nachgewiesen werden.

Unter den 6 Teilnehmern mit falsch-negativem Ergebnis fanden sich überwiegend eigenentwickelte *real-time* PCR-Protokolle mit 16S rDNA, dem *omp*- oder dem *mip*-Gen als spezifische Zielsequenz, sowie ein *nested* Block-Cycler PCR-Protokoll zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte. Letzteres Testkonzept sollte über das große Amplifikationsvolumen und den *nested*-PCR-Schritt eigentlich empfindlich genug sein, um auch etwas geringere Mengen an *L. pneumophila*-Zielorganismen im Probenmaterial zuverlässig nachweisen zu können.

Probe # 1325363 enthielt diesmal eine nennenswerte Menge an *Chlamydia pneumoniae* mit ca. 1×10^6 IFU/mL, deren DNA in den jeweiligen *L. pneumophila*-spezifischen PCR-Testsystemen aller 84 Teilnehmer keine Kreuzreaktionen und die damit verbundenen falsch-positiven Ergebnisse zeigte. Bei dem einzelnen falsch-positiven Ergebnis bei Probe # 1325364 (ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial) handelt es sich offenbar um ein sporadi-

ches laborinternes Kontaminationsereignis bzw. Kreuzkontamination während der Probenextraktion und Abarbeitung.

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe (siehe auch Tab. 1 in Anhang 1, S. 11): eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 1325371; *Salmonella enterica* ser. Typhi, ca. 10^6 CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1325374; *Salmonella enterica* ser. Typhi, ca. 10^5 CFU/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1325373; *Salmonella enterica* ser. Typhi, ca. 10^4 CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1325372), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Insgesamt betrachtet waren keine falsch-positiven Ergebnisse und lediglich zwei falsch-negative Ergebnisse bei den positiven Proben # 1325373 (ca. 10^4 CFU/mL) und # 1325374 (ca. 10^5 CFU/mL) zu beobachten. Im direkten Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden deutet dies auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin, denn unmittelbar nach der stark positiven Probe # 1325371 (ca. 10^6 CFU/mL) folgte diesmal eine negative Probe, die von keinem der 11 Teilnehmer positiv getestet wurde. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 11 Teilnehmern durchgehend korrekte Ergebnisse bei der negativen Probe # 1325372, sowie bei der positiven Probe # 1325371 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen mitgeteilt. Lediglich die etwas schwächer positive Probe # 1325373 (*Salmonella enterica* ser. Typhi, ca. 10^4 CFU/mL) wurden von je einem Teilnehmer falsch-negativ befundet. Die Richtigkeitsquoten lagen somit wieder erfreulich hoch.

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

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. Im aktuellen Ringversuch wurde hingegen eine Art Verdünnungsreihe von *Listeria monocytogenes* angefertigt, um primär die untere Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten Testsysteme abzuprüfen. Probe # 1325381 enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 10^5 CFU/mL), die auch von 23 der insgesamt 25 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1325382 enthielt mit ca. 10^4 CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Lediglich 2 der 25 Teilnehmer berichteten hier ein negatives Ergebnis – vermutlich wurde in diesen Fällen ein Testsystem mit unzureichender analytischer Sensitivität verwendet.

Falsch-negative Ergebnisse bei den beiden relativ stark positiven Proben # 1325381 und # 1325382 sollten den entsprechenden Teilnehmern definitiv Anlass geben, ihre PCR/NAT-gestützten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme einschließlich der Probenaufarbeitung und DNA-Extraktion einer eingehenderen Prüfung zu unterziehen.

Mit ca. 10^3 CFU/mL *L. monocytogenes*/mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1325383 diesmal eine sehr geringe Menge der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise konnte selbst diese schwach-positive Probe noch von 23 der insgesamt 25 Teilnehmer als „positiv“ klassifiziert. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen wurden die mitgeteilten Ergebnisse bei der letztgenannten Probe diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 12) gekennzeichnet.

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

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit dem aktuellen Ringversuch auch wieder standardisierte Rückstellproben mit geringerer Menge an Zielorganismen zur Verfügung, die als untere Messlatte bezüglich der analytischen Sensitivität dienen können und direkt über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind.

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 4-er-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 erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von MRSA etabliert haben bzw. im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Nach den zugegebenermaßen etwas umfangreichen und ausführlichen Diskussionen der Ergebniskonstellationen vorhergegangener MRSA Ringversuche kann die Auswertung des aktuellen Ringversuchs erfreulich kurz gehalten werden. 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 241 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 (siehe Anhang 1, S. 13) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1325391 diesmal ein Gemisch aus einem *S. aureus*-Isolat (MSSA, PVL-negativ, $\sim 10^4$ CFU/mL) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; mecA-positiv, $\sim 10^4$ CFU/mL), die Probe # 1325392 ein typisches MRSA-Patientenisolat (MRSA; PVL-negativ, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) und Probe # 1325393 eine relativ hohe Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (cMRSA; PVL-positiv; spa: t310; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Die letzte der 4 Proben, # 1325394, enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der relativ stark positiven cMRSA Probe # 1325393 von allen 241 Teilnehmern durchweg korrekt positive

PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Auch wenn sich in der zweiten MRSA-positiven Probe # 1325392 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 237 der insgesamt 241 Teilnehmer korrekt positive Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 4 falsch-negativen Ergebnisse bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden von diesen 4 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 1×10^3 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1325392 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 # 1325391 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 214 der insgesamt 241 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere 11 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von 6 dieser 11 Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruht. Da mit dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA*-Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall „fraglich“ auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis.

Die restlichen Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Diesen 16 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 1325391 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 # 1325391 in Tab. 3 (siehe Anhang 1, S. 14) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird schnell ersichtlich dass alle der derzeit etablierten SCC*mec*-basierten Testsysteme bei diesem Gemisch korrekterweise MRSA-negative Befunde liefern (da das *S. aureus*-Genom der MSSA-Komponente ja *de facto* keine integrierte SCC*mec*-Kassette aufweist).

Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1325394), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von einem der 241 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 200 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. laborspezifischen 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 57 der insgesamt 241 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 [3] oder [4]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR-Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in [5]. 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).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit einer relativ hohen Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1325404; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL) und eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1325401; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL), eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL an *Mycoplasma pneumoniae* (# 1325402), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1325403), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Wie bereits in den vorhergegangenen Ringversuchen zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die hervorragende analytische Sensitivität und Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 15) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch alle Teilnehmer die Zielorganismen in der positiven Probe # 1325401 (ca. 10^4 IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Mit ca. 10^5 IFU/mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1325404 diesmal eine relativ hohe Menge an *C. pneumoniae*-Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe ebenfalls von 93 der insgesamt 94 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet.

Erfreulicherweise wurden für die beiden Proben ohne Zielorganismen # 1325402 (*Mycoplasma pneumoniae*) und # 1325403 (humanes Zellmaterial und nennenswerte Menge an *E. coli*) ebenfalls von 93 der insgesamt 94 Teilnehmer richtig negative Ergebnisse berichtet. Dies unterstreicht wieder einmal aufs Neue die hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA. Bei den beiden isoliert falsch-positiven Ergebnissen könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsergebnisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von Mykoplasmen oder *E. coli* erscheinen eher als unwahrscheinlich.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, 16) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1325412 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) und Probe # 1325413 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL). Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielten Probe # 1325411 (*Mycoplasma genitalium*; $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL) und Probe # 1325414 (*Mycoplasma genitalium*; $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) diesmal nennenswerte Mengen an einer zu dem Zielorganismus verwandter Mykoplasmen-Spezies.

Insgesamt betrachtet wurden von den Teilnehmern im Rahmen der aktuellen Ringversuchsrunde zumindest für 3 der insgesamt 4 Proben wieder erfreulich hohe Richtigkeitsquoten erzielt. Mit Ausnahme eines Teilnehmers konnten diesmal alle der insgesamt 104 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1325412 problemlos und zuverlässig nachweisen. Der zuverlässige Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA in der etwas schwächer positiven Probe # 1325413 gelang immerhin noch 94 von allen 104 Teilnehmern. Zum Vergleich sei hier kurz auf den vorhergehenden Ringversuch Mai 2013 verwiesen: hier konnten ebenfalls 109 von 119 Teilnehmern die *M. pneumoniae*-DNA in einer vergleichbar konzentrierten positiven Probe mit ca. 10^4 Genomkopien/mL nachweisen.

Erfreulicherweise wurden für die beiden „negativen“ Proben des aktuellen Probensets, die diesmal jedoch mit nennenswerten Mengen einer mit dem Zielorganismus verwandten Bakterienspezies versetzt waren, ebenfalls sehr hohe Richtigkeitsquoten beobachtet. Wie in Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 16) dargestellt, berichteten lediglich je 4 der insgesamt 104 Teilnehmer bei den Proben # 1325411 (*Mycoplasma genitalium*; ca. 10^4 Genomkopien/mL) und # 1325414 (*M. genitalium*; ca. 10^5 Genomkopien/mL) falsch-positive Ergebnisse. Diese Ergebniskonstellation in einem breiten Teilnehmerfeld mit unterschiedlichsten Testsystemen und PCR-Protokollen belegt eine relativ hohe analytische Spezifität der eingesetzten

PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA.

Bei den jeweils 4 isoliert falsch-positiven Ergebnissen könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Eventuelle Kreuzreaktivitäten der *M. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von anderen Mykoplasmen-Spezies sollten von den betroffenen Teilnehmern abgeprüft und die entsprechenden Testkonzepte ggf. nachgebessert werden.

Insgesamt deutet diese Ergebnislage auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin.

Die diagnostische Performance eines etablierten *in-house*-Protokolls und ausgewählter kommerzieller NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA wurde im Sollwertlabor für RV 541 (Prof. Jacobs und Dr. Dumke, Dresden) im Rahmen einer systematischen Studie untersucht. Auch hier erwiesen sich diese Testsysteme als spezifisch, sensitiv und auch zuverlässig bezüglich der Erfassung aller relevanten *M. pneumoniae*-Subtypen und Varianten [6].

RV 542: *Coxiella burnetii* & *B. anthracis*

Dieser seit kurzem in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene 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 4-er-Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Coxiella burnetii* ($\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1325422 und $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1325424), zwei Proben mit 10-fach unterschiedlicher Menge an *Bacillus anthracis*-DNA ($\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1325423 und $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1325422), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1325421), 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 (siehe Anhang 1, S. 17) sowie für *Bacillus anthracis* in den Tabellen 4 und 5 (siehe Anhang 1, S. 18).

Coxiella burnetii

Erfreulicherweise kann die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs sehr einfach dargestellt werden. Sowohl die etwas stärker positive Probe # 1325424 mit ca. 10^4 Genomkopien *C. burnetii*/mL als auch die zweite positive Probe # 1325422 des Probesets mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an *C. burnetii* (ca. 10^3 Genomkopien/mL) wurde diesmal von allen der insgesamt 20 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Diese Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus den vorherigen Ringversuchen – Schwierigkeiten beim zuverlässigen bzw. reproduzierbaren Nachweis von *C. burnetii*-DNA traten damals erst bei Proben mit weniger als ca. 10^3 Genomkopien/mL auf. Diese untere Nachweisgrenze bestätigt sich offenbar auch im aktuellen Ringversuch.

Bei den Proben ohne entsprechende Zielorganismen # 1325421 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie # 1325423 (ca. 1×10^4 Genomkopien/mL *Bacillus anthracis*-DNA und eine Suspension aus humanen Zellen) wurden von allen 20 Teilnehmern ebenfalls korrekt negative Ergebnisse berichtet. Siebzehn der insgesamt 20 Teilnehmer gaben die Verwendung eines eigenentwickelten (*in-house*) PCR-Testkonzepts an; bei drei dieser Teilnehmer war explizit das „Transposase Gen (IS1111)“ als Zielsequenz vermerkt.

Bacillus anthracis

Die Ergebnislage des im Rahmen der aktuellen Ringversuchsrunde neu eingeführten Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt und diskutiert.

Alle der 14 Teilnehmer konnten mit ihren jeweils vor Ort etablierten *Bacillus anthracis*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die beiden positiven Proben mit ca. 5×10^4 Genomkopien/mL (# 1325422) und mit ca. 1×10^4 Genomkopien/mL (# 1325423) an *Bacillus anthracis*-DNA erfolgreich nachweisen.

Ebenfalls von allen der 14 Teilnehmer wurden korrekt negative Ergebnisse für die Proben ohne entsprechende Zielorganismen # 1325421 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie # 1325424 (nur *Coxiella burnetii* mit ca. 10^4 Genomkopien/mL und eine Suspension aus humanen Zellen) beobachtet. Insgesamt doch wohl eine sehr erfreuliche Gesamtsituation.

Zudem 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*

Dieser ebenfalls seit kurzem neu ins Ringversuchsprogramm aufgenommene 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 4-er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 19) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1325431 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL), Probe # 1325433 mit ca. zehnfach geringerer Menge (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1325434 mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *F. tularensis* spp. *novicida*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (#1325432), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Ähnlich wie bei den beiden zuvor diskutierten Ringversuchen haben auch hier alle der 15 Teilnehmer die relativ stark positive *F. tularensis* spp. *holarctica*-Probe # 1325431 sowie die etwa 10-fach geringer konzentrierte Probe # 1325433 mit ihren NAT-gestützten Testsystemen korrekt identifiziert. Lediglich von einem der 15 Teilnehmer wurde bei der Probe # 1325434 (*F. tularensis* spp. *novicida*; ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) ein negatives Ergebnis berichtet. Dieses Ergebnis ist aber nicht zwangsläufig als falsch negativ zu bewerten. In diesem Ringversuch wurde erstmalig auch DNA der „4.“ **Subspezies, von *F. tularensis* (spp. *novicida*)** eingesetzt. Stämme dieser Subspezies treten sehr selten als Ursache einer Infektion beim Menschen auf. Es gibt aber Beschreibungen von z.T. tödlich verlaufenden Einzelerkrankungen bei Patienten mit eingeschränkter Immunfunktion. Dieser Erregertyp verursacht allerdings keine „typische“ Tularämie bei immunkompetenten Menschen. Infizierte Personen weisen in herkömmlichen serologischen Assays auch keine Antikörper gegen das LPS von *F. tularensis* (spp. *holarctica*, *tularensis* oder *mediasiatica*) auf. Unter diesem Gesichtspunkt könnte man eine positive NAT-Reaktion in dieser Probe auch als falsch positives Ergebnis werten (fehlende Spezifität).

Die **Taxonomie der Gattung *Francisella*** ist aktuell relevanten Änderungen unterworfen. Zusätzlich umfasst die Gattung mindestens zwei weitere Spezies (*F. philomiragia*, *F. hispaniensis*), die ebenfalls als humanpathogen gelten. Im Bereich der Veterinärmedizin kommen zwei weitere pathogene Spezies hinzu. Mindestens einer der von den Ringversuchsteilnehmern verwendeten Assays detektiert alle diese Spezies. Je nach klinischer Fragestellung kann sich dies positiv oder negativ auf die Befundbeurteilung auswirken. Wir haben diese Subspezies im gegenwärtigen Ringversuch eingeschlossen, um alle Teilnehmer auf diese Problematik hinzuweisen. Seit kurzem stehen die

kompletten Genomdaten aller Spezies und Subspezies in den gängigen Datenbanken (e.g. NCBI) zur Verfügung, so dass anhand dieser Daten die Spezifität der eingesetzten Primer und Sonden auch für jeden *in-house*-Test überprüft werden kann.

Da auch der Nachweis der Subspezies *F. tularensis* spp. *tularensis* (Typ A nach Jellison) eine besondere klinische und arbeitsmedizinische Bedeutung hat, ist angedacht, in zukünftigen Ringversuchen auch DNA dieser Subspezies einzusetzen, um den Teilnehmern zu ermöglichen, die Sensitivität und Spezifität ihrer Assays in Bezug auf eine Subspeziesbestimmung zu überprüfen. Für den klinischen Alltag gilt bis dahin, dass jede positive NAT-Reaktion in einer klinischen Probe kritisch hinterfragt und ggf. einer weiteren Untersuchung (Sub-Typisierung) zugeführt werden sollte.

Auch wenn die Anzahl der teilnehmenden Laboratorien bei der aktuellen Ringversuchsrunde noch nicht sehr hoch ist, so kann in der Zusammenschau der bisher durchgeführten Ringversuche festgestellt werden, dass die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *F. tularensis*-DNA unterhalb einer Menge von ca. 10^4 Organismen/mL Probenmaterial liegen dürfte.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Die ersten Ringversuche RV 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ sind bewusst so konzipiert, dass sie der RV-Leitung einen Überblick über die aktuell verfügbaren NAT-gestützten Methoden und Protokolle **zum Direktnachweis von *Pneumocystis jirovecii*-DNA** in geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien verschaffen. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben erneut zwei positive Proben (siehe auch Tab. 1 in Anhang 1, S. 20): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1325601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 3×10^5 Genomkopien/mL), eine mit etwas geringerer Menge (# 1325603; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 9×10^4 Genomkopien/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1325602 und # 1325604), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielten.

Erfreulicherweise hat sich auch in der aktuellen Ringversuchsrunde die überaus gute Ergebnislage des im Mai 2013 erstmals regulär durchgeführten Ringversuchs RV 560 bestätigt.

Sowohl die etwas stärker positive Probe # 1325601 mit ca. 3×10^5 Genomkopien/mL sowie die etwas schwächer positive Probe # 1325603 mit ca. 9×10^4 Genomkopien/mL wurde von nahezu allen der insgesamt 59 Teilnehmer als positiv befundet.

Lediglich von einem der 59 Teilnehmer wurde bei der etwas stärker positiven Probe # 1325601 ein falsch-negatives Ergebnis beobachtet – wobei dieser Teilnehmer die etwas schwächer positive Probe # 1325603 wieder

korrekterweise als *Pneumocystis jirovecii*-positiv berichtete (?). Angesichts der mit mehr als 10^5 Genomkopien/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollte das isoliert beobachtete falsch-negative Ergebnis dem betroffenen Ringversuchsteilnehmer Anlass zur Überprüfung und Optimierung seines entsprechenden NAT-gestützten Testsystems geben.

Bei den beiden Proben ohne Zielorganismen (# 1325602 und # 1325604), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Nicht zuletzt aufgrund dieser erfreulichen Ergebnislage werden sich in den zukünftig ausgesandten 4-er-Sets auch immer positive Proben befinden, die relativ geringe Genommengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000011.shtml>

1. Anhang1_lab000011.pdf (282 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ November 2013

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. Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschäpe H. Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol*. 2009 Jun;299(5):343-53. DOI: 10.1016/j.ijmm.2008.10.008
3. 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
4. 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 Jan;24(1):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
5. 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
6. Dumke R, Jacobs E. Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2009 Feb;47: 441-4. DOI: 10.1128/JCM.01989-08

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Udo Reischl
Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene,
Universitätsklinikum Regensburg (UKR),
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg,
Deutschland, Tel.: +49-(0)941-944-6450
udo.reischl@ukr.de

Bitte zitieren als

Reischl U, Schneider W, Holzmann T, Ehrenschwender M, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, Splettstösser W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2013 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2014;5:Doc01.
DOI: 10.3205/lab000011, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000116

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000011.shtml>

Veröffentlicht: 08.01.2014

Copyright

©2014 Reischl et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.

Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: discussion of the November 2013 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 "Directive of the German Medical Association for quality assurance of medical laboratory examinations" (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 quality control (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.instandev.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
Thomas Holzmann¹
Martin Ehrenschwender¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Wolf Spletstösser⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷

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

7 Institute for Medical Microbiology, Immunology and Parasitology (IMMIP),

Brief discussion of the current results

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

Examination results November 2013

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

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

The current set of QC samples contained two samples with similar amounts of *C. trachomatis* ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL and $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL; sample # 1325304 and sample # 1325303), two samples with equal amounts of *N. gonorrhoeae* (sample # 1325302 and sample # 1325304; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) and sample # 1325301 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *N. gonorrhoeae*.

Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target cells in the positive samples #1325303 and # 1325304, only 4 false-negative results were observed among the *Chlamydia trachomatis*-specific results reported by the 147 participants. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 19 of the 144 participants for samples #1325302 and # 1325304, which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of 1×10^3 CFU/mL. For the GO-positive sample # 1325301, which contained with 1×10^4 CFU/mL a ten-fold higher amount of *N. gonorrhoeae* target organisms, no false negative result for the detection of *N. gonorrhoeae* DNA was reported.

The detection of gonococcal DNA in samples which also contained *C. trachomatis* organisms, (or the test systems used by these participants) caused some difficulties for some participants: 12 false negative results were observed for sample # 1325304 compared to 7 false negative results for sample # 1325302. The reason for this finding, which was similarly observed in the November distribution, remains unclear. Competition of certain of primer sequences present in the complex reaction mixture could be a possible explanation. But one could assume that for chlamydial and gonococcal (duplex) NAT systems,

specific amplification of specific genomic regions of these two different target organisms is realized via two different primer sets and the use of consensus primers is avoided. Since the amount of target organisms in sample # 1315302 and 1325304 (1×10^3 CFU/mL) could not be considered as "extremely low", false negative results should encourage the participants to review and optimize their respective gonococcal specific NAT-based test system.

Despite this infrequently observed issue regarding sensitivity, an overall very good diagnostic performance was observed. Inhibition controls were conducted by all 148 participants, and inhibition events were not reported this time.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three positive samples: # 1325311 and # 1325313 with $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms and sample # 1325314 with $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Sample # 1325312 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in Tab. 2 (see Attachment 1, p. 5), the results were broadly correct for all three positive samples. For the sample #1325314 containing higher amounts of *C. trachomatis* DNA, 2 false-negative results were reported and for the weakly positive samples #1325311 and #1325313, 2 and 6 false-negative results were reported, respectively.

For the *C. trachomatis*-negative sample # 1325312, containing only non-infectious human cells and *E. coli*, 3 false-positive results were observed of the 102 participants. For samples # 1325312 and # 1325313 results were classified as "questionable" for one participant each. For questionable results, certificates are only issued when correct results are reported by the participant in the remaining 3 samples of RV 531.

This striking match of the current results with observations and accuracy rates in previous inter-laboratory tests can be considered as evidence of a high reliability and consistency of the used test systems and the sample processing.

Run controls were performed by all of the 102 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 102 participants of the current distribution.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1325322; 1×10^4 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella parapertussis* (# 1325324 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), as well as two samples containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1325321 and # 1325323).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only one of the 116 participants reported a false negative result for the sample # 1325322 (*B. pertussis*, 1×10^4 CFU/mL).

For sample # 1325324 (10^4 CFU/mL of *B. parapertussis*) 3 false-positive results were observed, which may have probably been caused by an insufficient analytical specificity of the used in-house test systems or due to a contamination during the sample preparation, amplification or detection.

Of the 116 participants, 115 included inhibition controls and inhibition events didn't occur this time.

The amount of 104 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.

For the detection of *B. pertussis*, most participants used *in-house* test concepts with inhibition and/or positive controls. In the current distribution, 54 participating laboratories indicated the use of the IS481 insertion sequence, 10 the *B. pertussis* toxin coding gene and 3 the use of *B. pertussis*-specific ribosomal gene segments.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained three samples with a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain in a kind of dilution series. Sample # 1325332 contained approximately 1×10^6 CFU/mL, sample # 1325333 approximately 1×10^5 CFU/mL and sample # 1325334 approximately 1×10^4 CFU/mL of the respective target organisms.

The availability of well evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in two of three positive samples (# 1325332: $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL and # 1325333: $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) led to positive predictive values of 100%.

As noted in the test 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 were communicated by 29 of the 35 participants and the results for molecular susceptibility testing were also correct, apart from one occasion.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed before, the main challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but rather the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenicity (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of QC samples contained three samples positive for EHEC: # 1325341 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-, *eae*-, *hlyA*- and O157-positive), # 1325342 (*E. coli*, 1×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- and O157-positive), and # 1325343 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*_{2f}-positive and *eae*-positive). The other EHEC-negative sample contained an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1325344). With the exception of sample #1325343 (*stx*_{2f}-positive EHEC isolate) the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in consistently high accuracy rates for the three remaining samples – both for positive and negative results. Consistently correct results were reported by 98 of 104 participants.

The cause for the 3 false-negative results for *stx*-1 positive EHEC isolate (# 1325341) and the 6 false-negative results for *stx*-1- and *stx*-2-positive EHEC isolate (#1325342) remains unclear. Maybe the common spectrum of *stx*-1 and *stx*-2 genes is not fully covered by the applied test systems. A false negative result in some PCR test systems could have been expected for *stx*-2f, because of the known little homology to other shiga toxin gene sequences, which was demonstrated impressively by the inclusion of the *stx*-2f-positive sample #1325343. Only 25 of the 104 participants reported positive results for the presence of genes coding for shiga toxins.

Even if the relevance of *stx*_{2f}-positive EHEC isolates for human pathogenicity is still controversial, this should serve once again as an example for surprising genetic diversity of bacterial isolates from the microbiological PCR routine diagnostics.

For sample # 1325344 containing an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain, fortunately only 2 of the 104 participants reported false positive results.

Since 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 implemented by 95 of the 104 participating laboratories and the reported results were correct when performed.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Due to numerous requests, here is 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 (EQAS) scheme also **other *B. burgdorferi* genotypes or genospecies will be present** in individual samples.

Short recapitulation: So far 18 different species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato complex were described, that naturally present genetic differences regarding popular target genes. Of special interest – since of assured human pathogenicity and widely distributed in Europe – are *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. bavariensis*. *B. spielmanii*, a further species with assured human-pathogenicity, seems to be rare and was so far only described from skin manifestations of Lyme borreliosis. *B. bissetii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* are regarded as possibly human pathogen. Regarding OspA especially *B. garinii* showed a striking heterogeneity with 5 genetic distinguishable “genotypes”. The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia bissetii* (# 1325351; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL), one sample with *Borrelia spielmanii* (sample # 1325353; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL), and one sample with *Borrelia afzelii* (sample # 1325354; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL) Sample # 1325352 contained no *Borrelia* organisms but only human cells and *E. coli* cells.

With the exception of 7 false-negative results for sample # 1325351, 4 false-negative results for sample # 1325353, 5 false-negative results for sample # 1325354, and one 7 false-positive results for sample # 1325352, correct results were reported by the 96 participating laboratories.

The participants who reported false-negative results especially for the two positive samples containing *Borrelia spielmanii* and *Borrelia afzelii* target organisms should check their NAT assay concepts including sample processing/DNA-extraction.

About half of the participating laboratories used self-developed (in-house) tests with inhibition and/or positive controls. No inhibition and also no obviously significant differences to commercially available kits regarding sensitivity were observed in the current round of our external quality assessment scheme for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

Next to the three commercial assays provided with a designated code number (Qiagen artus *Borrelia* LC Kit (Code [20]), Demeditec GenFlow (Code [21]) and LightMix *Borrelia* from TIB Molbiol (Code [22]), participants indicated the use of the following commercial assays or kits on their report form: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (7x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (2x), EliGene *Borrelia* LC from Elisabeth Pharmacon (1x), TIB Molbiol LightMix *Borrelia* (1x), BactoReal *B. burgdorferi* from Ingenetix (1x) and Attomol *Borrelia burgdorferi* Realtime (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

Due to numerous requests: this ring 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-based method for the direct detection of *L. pneumophila* DNA or who want to evaluate this method in the course of an external quality control.

The current set of QC samples contained two positive samples with *Legionella pneumophila* serogroup 3 (# 1325361; $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL and # 1325362; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), as well as one sample containing *Chlamydia pneumoniae* (# 1325363; $\sim 1 \times 10^6$ IFU/mL). Sample # 1325364 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) sample # 1325361 was correctly tested positive by all of the 84 participating laboratories. Sample # 1325362, which contained a hundred-fold lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) of *L. pneumophila* reported correctly by 78 of 84 participants.

The 6 participants with false-negative results were using mainly self-developed in-house real-time PCR protocols targeting the *omp*-, *mip*-gene or 16S rDNA sequence or a nested block-cycler PCR protocol with subsequent nucleotide sequencing of the amplified 16S rDNA region. The latter concept should be sensitive enough to allow the detection of low amounts of *L. pneumophila* because of the nested PCR step and the large amplification volume.

Sample # 1325363 contained a significant amount of *Chlamydia pneumoniae* with approx. 1×10^6 IFU/mL. No cross-reactivity and false positive results of all 84 participants was observed in the respective *L. pneumophila*-specific PCR assay.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Salmonella enterica* serovar Typhi: sample # 1325371 contained $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL, sample # 1325374 contained $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL and sample # 1325373 contained $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL. Sample # 1325372 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

Only 2 false-negative results were reported for the positive samples # 1325373 and # 1325374 and no false-positive result was reported for the negative sample # 1325372.

In summary, 11 correct results for the negative sample # 1325372 as well as the positive sample # 1325371 with relatively high amount of target organisms were reported correctly for the NAT-based detection of *Salmonella*

by the 11 participants. Only the slightly weaker positive sample (# 1325373; *Salmonella enterica* serovar Typhi, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was reported false negative by 1 participant. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays and an improved procedure with regard to the prevention of contamination events during the individual sample preparation and PCR/NAT analytics in the participating diagnostic laboratories, as the strongly positive sample # 1325371 was preceding the negative sample and no false-positive result was reported from the 11 participants.

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1325384; only *E. coli* cells), and three samples positive for *L. monocytogenes*. In order to assess the analytical sensitivity of the NAT assays currently used at the participating laboratories, we decided to include also some weak positive samples in the current distribution. Relatively low numbers of *L. monocytogenes* cells ($\sim 10^4$ CFU/mL and $\sim 10^5$ CFU/mL) were present in samples # 1325382 and # 1325381, respectively. Both were tested positive by the PCR assays applied by 23 of the 25 participants. Although the third "positive" sample contained a remarkably low amount of target organisms (# 1325383; $\sim 10^3$ CFU/mL of *L. monocytogenes*), it was nice to see that still 23 of the 25 participating laboratories were still able to detect the corresponding DNA by their *Listeria*-specific PCR assays.

As mentioned in the Report form, participants who are performing molecular tests covering only *L. monocytogenes* may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. When the use of *L. monocytogenes*-specific PCR assays is indicated, we do not score (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species (which may be present in future distributions) in the course of issuing the corresponding QC certificates. It is nice to see that correct results were reported by the majority of participating laboratories in the course of this external PCR assay validation – and, again, this indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

False-positive results were observed in one case for sample # 1325384 containing only human and *E. coli* cells, so it seems that the majority of participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

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 and/or community acquired (CA)-MRSA DNA in typical 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 natural background of human cells and other components. Here it is important to note that NAT assays designed for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set. Despite of one sample containing an MSSA isolate together with a methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus* species, no "difficult" or "interesting" sample was included into the current panel.

Sample # 1325391 of the current set contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and a CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-positive, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). One sample of the current set (# 1325394) contained no target organisms but only *E. coli* cells. Sample # 1325393 contained a relatively high number of CA-MRSA organisms (*S. aureus*, *mecA*-positive, PVL-positive, spa:t 310; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and sample # 1325392 contained a relatively low number of typical MRSA organisms (*S. aureus*, *mecA*-positive, PVL-negative; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL).

The MRSA negative sample # 1325394 was tested by 240 of 241 participants with their PCR-based MRSA-specific test systems as "negative", so only one participant observed a false positive result for sample # 1325394, which may have probably been caused by contamination with MRSA DNA during the sample preparation, amplification or detection. Fortunately, for the positive cMRSA sample # 1325393, positive results were reported by all 241 participants. Even if sample # 1325392 contained with 1×10^3 CFU/mL a lower amount of target organisms, with 237 positive reported results of 241 participants, positive predictive values of 99% were observed. The 4 false negative results are probably due to an insufficient analytical specificity of the used in-house test systems.

For the sample # 1325391, which contained a MSSA isolate together with a Methicillin resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species, 214 of 241 participants reported their results correctly as "MRSA-negative" and 11 participants classified the results as "questionable". 6 of these 11 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 this case. The remainder 16 participants reported false-positive results for MRSA for sample # 1325391, containing a mixture of a MSSA isolate and a methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococcus* species. These participants are encouraged to analyse the suitability of their test systems, as the described constellation is a relatively common scenario for microbiological routine diagnostic of MRSA. On the other hand, all participants, who used SCC*mec* based test systems,

reported correct MRSA-negative results for sample #1325391.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported a correct result and the predominantly correct positive findings for one positive sample and correct negative findings for the 2 MRSA negative samples. 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 57 of the total 241 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 [3] or [4]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at [5].

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

RV 540: Chlamydia pneumoniae

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. pneumoniae* in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we intended to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory materials. 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 # 1325404 was spiked with $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL of *C. pneumoniae* whereas sample # 1325401 contained an approximately tenfold lower number of *C. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL). Sample # 1325402 contained significant numbers ($\sim 10^5$ genome copies/mL) of *Mycoplasma pneumoniae* organisms to assess analytical specificity. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1325403.

As depicted in Tab. 2 (see Attachment 1, p. 15), all participants reported correct results for the positive sample # 1325401. 93 of the 94 participants reported correctly positive results for the positive sample # 1325404, which contained a relatively high concentration of target organisms (10^5 IFU/mL). Affected participants are encouraged to analyse and optimize their NAT-based assays.

Only one participant reported false-positive results for negative sample # 1325402 (*Mycoplasma pneumoniae*) and also for the "negative" sample # 1325403, which

could be due to cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps as cross reactivity with *E. coli* or *Mycoplasma pneumoniae* DNA is unlikely. Overall there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 541: Mycoplasma pneumoniae

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *M. pneumoniae* in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory materials. 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. 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 two positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1325412 and an approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) was present in sample # 1325413. Samples # 1325411 and # 1325414 were designed to monitor assay specificity: they contained a considerable amount of *M. genitalium* ($\sim 10^4$ and $\sim 10^5$ genome copies/mL, respectively) as a related species to the target organism.

Similar to the result constellations observed with past distributions of our external quality assessment schemes for *Mycoplasma pneumoniae* PCR/NAT detection, the availability of well-established commercial or *in-house* PCR/NAT-assays has led to a surprisingly high percentage of correct results, at least for 3 of the 4 samples of the current set.

With the exception of one laboratory, all 104 participants reported correct *M. pneumoniae*-positive results for sample # 1325412 containing a relatively high amount of target organisms.

The sample # 1325413 ($\sim 10^4$ genome copies/mL) containing an approximately ten-fold lower amount of *M. pneumoniae* was tested correctly positive by 94 of the 104 laboratories.

Four participants reported false-positive results for the negative samples # 1325411 and #1325414, which contained considerable amounts of *M. genitalium*. The false-positive results could be caused by cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. Cross reactivity of the used NAT-based *M. pneumoniae* assay with other *Mycoplasma* species should be analysed by the affected laboratories.

Overall, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

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 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 samples with different amounts of *Coxiella burnetii* organisms ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL in sample # 1325422 and $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1325424), two samples with tenfold different amounts of *Bacillus anthracis* (sample # 1325423 with $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL and sample # 1325422 with $\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL) Sample # 1325421 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

For the ease of data presentation and analysis, we decided to depict the PCR/NAT results for the two different target organisms within this combined EQAS scheme in two separate tables: please see Tab. 2 and 3 (Attachment 1, p. 17) for the *Coxiella burnetii*-specific results and tables 4 and 5 (Attachment 1, p. 18) for the *Bacillus anthracis*-specific results.

Coxiella burnetii

A relatively high amount ($\sim 10^4$ genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms were present in sample # 1325424, which consequently tested positive by all of the 20 participating laboratories. Sample # 1325422, which contained an approximately tenfold lower number of *C. burnetii* target organisms/mL (next to significant amounts of *Bacillus anthracis* DNA), was also tested positive for *C. burnetii* DNA by all of the 20 participants. Similar to the result observed in past distributions of our external quality assessment schemes, difficulties for the reliable detection of *C. burnetii* DNA may occur sporadically for samples at or below 10^3 genome copies/mL. As the two *C. burnetii*-positive samples of the current EQAS scheme carried target numbers above $\sim 10^4$ genome copies/mL, false-negative results are not observed this time.

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

Bacillus anthracis

The results for this newly introduced EQAS scheme are easily discussed. All of the 14 participants correctly reported positive results for both positive samples # 1325422 ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL) and # 1325423 ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) and also all participants correctly reported negative results for both negative samples # 1325421 (containing *E. coli* and human cells) and # 1325424 (containing $\sim 10^4$ genome copies of *Coxiella burnetii* in a suspension of human cells).

After this very successful round of external quality assessment, "standardized samples" are now 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 (Prof. Reischl).

RV 543: *Francisella tularensis*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *F. tularensis* DNA 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 only three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis holarctica* ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) was present in sample # 1325431, and an approximately tenfold lower amount ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1325433. Sample # 1325434 contained approximately 1×10^5 CFU/mL of a *Francisella tularensis* spp. *novicida* strain.

Similar to QC samples from past ring trials, the positive sample # 1325431 ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL of *Francisella tularensis holarctica*) was correctly tested positive by all of the 15 participating laboratories. As no false-positive result was observed for the "negative" sample # 1325432 (which was positioned in direct sequence after the relatively strong positive sample # 1325431 within the set of 4), it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

Also the 10-fold weaker positive sample # 1325433 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Francisella tularensis holarctica*) was reliably detected by all participants with their specific PCR test systems.

As the third positive sample within the current EQAS distribution, sample # 1325434 contained about 10^5 CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *novicida*. These target organisms were reliably detected by 14 of the 15 participants, whereas a negative result for this particular *F. tularensis* subspecies was only observed by one

participant indicating the use of an *in-house* PCR assay concept.

This result should not necessarily be considered as false-negative. In the current trial, we used, for the first time, DNA from the closely related “fourth” subspecies *F. tularensis novicida*. Strains of this subspecies have been rarely described to cause symptomatic infection in humans, but even lethal disease in immune-compromised patients has been documented. But this pathogen does not cause the typical clinical picture of tularemia in immune-competent individuals. Humans infected with *F. tularensis* spp. *novicida* do not raise anti-*F. tularensis* LPS (*holartica*, *tularensis*, *mediasiatica*) antibodies and thus commercially available serological assays show negative results.

The taxonomy of the genus *Francisella* changed significantly over the last three years, the genus also comprises the pathogenic species *F. philomiragia* and *F. hispaniensis*. In the field of veterinary medicine there are two additional relevant species belonging to the genus *Francisella*. At least one of the assays used by several participants will detect all of these species and subspecies. Depending on the clinical question, this property might be beneficial or adverse when interpreting the test result. We included this subspecies in the current trial in order to highlight this special difficulty in tularemia diagnostics. As of late, complete genome sequences of all relevant *Francisella* species and subspecies are accessible in public data bases (e.g. NCBI), allowing to check the sensitivity and specificity of all primers and probes used in *in-house* assays.

Due to the fact that a specific detection of *F. tularensis* spp. *tularensis* (Jellison type A) is of special concern for clinical and public health issues, we plan to include DNA from this subspecies in the near future. This would allow the participants to test their assays in terms of sensitivity or specificity detecting different *F. tularensis* subspecies. Till then, any positive NAT result should be critically revisited and subtyping of the positive sample should be considered.

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 560: Pneumocystis jirovecii

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 *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 current set of QC samples contained two positive samples. A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 3 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1325601 and an approximately tenfold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 9 \times 10^4$ genome copies/mL) was present in sample # 1325603. The set was completed by sample # 1325602 and sample # 1325604, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Fortunately, the promising results observed in the two previous rounds of our external quality assessment scheme *Pneumocystis jirovecii* DNA could be confirmed in the current distribution. Samples # 1325601, which contained a relatively high amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 3 \times 10^5$ genome copies/mL) and # 1325603 which contained a slightly lower amount of *P. jirovecii*, were reported “positive” by all but one of the 59 participating laboratories.

One laboratory reported a false-negative result for sample # 1325601 but concurrently observed a correct positive result with the second positive sample # 1325603. Although this could be due to a sporadic loss of template DNA during some pre-analytical sample preparation procedures or other “simple” reasons, observation of false-negative results should give reason to check the diagnostic workflow, consider improving the sensitivity and/or checking the species coverage of the individual assay concept.

No false-positive results were observed for samples # 1325602 and # 1325604, which contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. To sum up, the results of the present *P. jirovecii* distribution indicate an excellent performance of the currently employed PCR/NAT-based assay concepts as well as laboratory-specific precautions for the prevention of contamination events.

However, the limited number of results (RV 542, RV 543, RV 560), together with an insufficient reporting of the kit manufacturers applied still not allow a serious comparison of commercial tests and the very heterogeneous group of *in-house* PCR/NAT assay concepts with regard to analytical sensitivity, analytical specificity, susceptibility to contamination, or simply the “overall performance”.

Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000011.shtml>

1. Anhang1_lab000011.pdf (282 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)”
November 2013

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. Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschäpe H. *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol*. 2009 Jun;299(5):343-53. DOI: 10.1016/j.ijmm.2008.10.008
3. 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
4. Witte W, Bräulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;24(1):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
5. 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
6. Dumke R, Jacobs E. Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2009 Feb;47: 441-4. DOI: 10.1128/JCM.01989-08

Corresponding author:

Prof. Dr. Udo Reischl
 Institute for Clinical Microbiology and Hygiene, University Hospital Regensburg (UKR), Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany, phone: +49-(0)941-944-6450
 udo.reischl@ukr.de

Please cite as

Reischl U, Schneider W, Holzmann T, Ehrenschwender M, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, Spletstösser W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2013 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2014;5:Doc01.
 DOI: 10.3205/lab000011, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000116

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000011.shtml>

Published: 2014-01-08

Copyright

©2014 Reischl et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.en>). You are free: to Share – to copy, distribute and transmit the work, provided the original author and source are credited.