

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2014 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 Ehrenschröder¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Wolf Splettstößer⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Martin Kaase⁸

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

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

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

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

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

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

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Nach erfolgreicher Etablierung dieser neuen Ringversuchs-Serie wollen wir hier auch für Kolleginnen und Kollegen, die bisher noch nicht an diesen Ringversuchen teilgenommen haben, die Ergebnisse der aktuellen Ringversuche für den 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*, *Pneumocystis jirovecii* (vorm. *P. carinii*) sowie dem neu ins Programm aufgenommenen Ringversuch zur molekularen Resistenztestung für Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae darstellen und kurz diskutieren.

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

Wie bei allen anderen Ringversuchen erfolgt die Anmeldung zu ausgewählten Teilen der Reihe „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ über die Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in Medizinischen Laboratorien (INSTAND e.V.), Düsseldorf (<http://www.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 16 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „highlights“: so wurde beispielsweise im aktuellen RV 532 *Bordetella pertussis* eine Probe mit der zum Zielorganismus verwandten Spezies *Bordetella holmesii* versandt, die ebenfalls das populäre Zielgen IS481 enthält und daher von vielen unserer Ringversuchsteilnehmer als PCR-positiv getestet wurde. Als weiteres „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 539 MRSA/cMRSA ein spezielles *S. aureus*-Isolat versandt, das alle derzeit gebräuchlichen genotypischen Marker für MRSA aufweist, sich in der konventionellen Testung auf phänotypischer Ebene aber zweifelsfrei als MSSA-Isolat erweist. Erwartungsgemäß wurde dieses *S. aureus*-Isolat von allen Teilnehmern mit ihren PCR-gestützten Testsystemen als MRSA identifiziert. Auch wenn solche MSSA-Isolate derzeit noch sehr selten zu beobachten sind, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen von *S. aureus*-Isolaten mit solch untypischen genetischen Konstellationen geweckt werden.

Nach dem erfolgreichen Verlauf der Proberingversuchsrunde im Mai diesen Jahres wurde der neue RV 544 zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von Carbapenemase-Genen bei Enterobacteriaceae nun in das reguläre Ringversuchsprogramm „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. aufgenommen und zukünftig halbjährlich angeboten. Zumindest in der Anfangsphase dieses methodisch anspruchsvollen Ringversuchs zur molekularen Resistenztestung werden wir uns auf das Spektrum der derzeit häufigsten Carbapenemase Gene beschränken: KPC, VIM, OXA-48, GES Carbapenemase, NDM, IMP und GIM. Bei der Auswahl von „ringversuchswürdigen“ Isolaten ist unser geschätzter Kollege Dr. Martin Kaase vom Nationalen Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger, Abteilung für Medizinische Mikro-

biologie der Ruhr Universität in Bochum natürlich eng eingebunden.

An prominenter Stelle möchten wir uns diesmal besonders herzlich bei **Herrn Dr. Jan Marco Kern** und **Herrn Matthias Pöckl** (Universitätsinstitut für Medizinisch Chemische Labordiagnostik, Division Medizinische Mikrobiologie, Paracelsus Medizinische Privatuniversität an den Salzburger Landeskliniken) für die Bereitstellung von großen Mengen an *Chlamydia pneumoniae*-positivem Zellkulturmaterial bedanken. Ohne seine tatkräftige und kollegiale Unterstützung wäre die zeitnahe Herstellung der überraschend großen Probenzahlen für den Ringversuch RV 540 sicherlich nicht so reibungslos möglich gewesen...

Aktueller Hinweis auf neue Ringversuche in 2015: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmer- und Kollegenkreis werden ab Mai 2015 zwei zusätzliche Ringversuche eingeführt: **RV 545** zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von **Clostridium difficile (Toxingene)** sowie **RV 546** zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von **VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken)**. Für diese Zielorganismen sind bereits eine Reihe von kommerziellen und eigenentwickelten Verfahren zum PCR-gestützten Direktnachweis verfügbar und es wird interessant sein zu verfolgen wie gut sich diese in den kommenden Ringversuchsrunden bewähren. Bitte melden Sie sich rechtzeitig auf dem regulären Weg bei INSTAND e.V. an, falls sie an einer Teilnahme interessiert sind.

Alle Teilnehmer sind natürlich weiterhin dazu aufgerufen, attraktive Parameter für eine zukünftige Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen vorzuschlagen und deren mögliche Umsetzung mit dem Ringversuchsleiter zu diskutieren.

Untersuchungsergebnisse November 2014

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: *Borrelia burgdorferi* (Probe # 1425351), *Listeria* spp. (Probe # 1425382), *Coxiella burnetii* (Probe # 1425424), *Bacillus anthracis* (Probe # 1425424) sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1425604). Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u. a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, dass zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind, und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten „grenzwertig positiven“ Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von „durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten“ eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gegebenenfalls entsprechende *real-time* PCR-Protokolle mit 20 µl Reaktionsansatzvolumen; gut evaluierte Primersequenzen).

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

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

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Die Tabellen 1 (siehe Anhang 1) zeigen dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in den Tabellen 2 (siehe Anhang 1) nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen, und in den Tabellen 3 (siehe Anhang 1) nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse, sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt.

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

Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten, und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen, zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR-Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR-Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: <http://www.udo-reischl.de>; Unterpunkt „Auswertung der Ringver-

suche“ und natürlich auch über die Homepage von INSTAND e.V. (<http://www.instandev.de/>) als pdf-Files zum freien Download bereit.

An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion sowie deren tatkräftige Unterstützung bei der Konzeption und dem Aufbau neuer Ringversuche bedanken.

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

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Ringversuchen zum kombinierten NAT-gestützten *C. trachomatis* und Gonokokken-Nachweis. Trotz der relativ geringen Erregermenge in den vier unterschiedlich zusammengesetzten positiven Proben führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive, als auch für negative Befunde.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit *C. trachomatis* (# 1425304 mit $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL und # 1425303, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL), eine Probe (# 1425301) mit relativ geringen Mengen von ca. 1×10^3 CFU/mL an *N. gonorrhoeae*, eine Probe (# 1425302) mit ca. 1×10^4 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* und eine Probe mit relativ hoher Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen (# 1425303; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL).

Der Übersichtlichkeit halber werden wir bei diesem kombinierten Ringversuch (CT/NG) die Ergebniskonstellation zukünftig in **7 getrennten Tabellen** (siehe Anhang 1, S. 1-3) darstellen. Damit wird die diagnostische Performance der jeweiligen Testsysteme beim Nachweis von CT und NG aussagekräftiger (Tabelle 4: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei CT, Tabelle 6: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei NG; jeweils gefolgt von den Richtigkeitsquoten nach aufgeführten Testsystemen in den Tabellen 5 und 7; siehe Anhang 1, S. 2-3).

Auch wenn die positive Proben # 1425304 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 168 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 3 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 # 1425302 und # 1425303 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^4 bzw. 1×10^5 CFU/mL) diesmal nur von 2 der insgesamt 166 Teilnehmer falsch-negative bzw. als „fraglich“ klassifizierte Ergebnisse für Gonokok-

ken DNA mitgeteilt. Überraschenderweise fanden sich bei der schwach-positiven Probe # 1425301 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^3 CFU/mL) jedoch keine falsch-negativen Ergebnisse.

Bei der GO-negativen Probe # 1425304 wurden von 4 Teilnehmern je ein falsch-positives Ergebnis mitgeteilt. Dabei könnte es sich eventuell um ein sporadisches laborinternes Kontaminationsereignis bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion oder Testabarbeitung handeln. Angesichts der in einigen anamnестischen Konstellationen doch gravierenden Konsequenzen eines „überraschenden“ Gonokokken-Nachweises sollten falsch-positive Ergebnisse bei den betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen NAT-gestützten Testsysteme geben.

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 bestimmten kommerziellen und komplett vorkonfektionierten Testsystemen die vorgegebenen Zielwerte nicht erreicht. Ohne denjenigen Teilnehmern, die mit bestimmten kommerziellen Testsystemen die Zielwerte nicht erreichen, zu nahe treten zu wollen, deutet dieser Umstand in diesen Fällen dann wohl eher auf individuelle Abweichungen vom Protokoll oder bestimmte Fehler bei der Probenabarbeitung, als auf intrinsische Unzulänglichkeiten, der in der Regel gut evaluierten Testsysteme hin.

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

Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o. ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen, wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden, von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden die *C. trachomatis*-Zielorganismen von 5 und die *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen von allen

7 Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe Testsystemen erfolgreich nachgewiesen.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 169 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Mit nahezu allen kombinierten kommerziellen Testsystemen (wie Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT oder LightMix CT/NG) wurden insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beim spezifischen Nachweis von Chlamydien und Gonokokken 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 (siehe Anhang 1, S. 2-3) angefertigt. In den Tabellen 4 und 5 (siehe Anhang 1, S. 2) sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in den Tabellen 6 und 7 (siehe Anhang 1, S. 3) nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet.

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

RV 531: Chlamydia trachomatis

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal eine Probe mit ca. 1×10^5 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1425312), eine Probe mit ca. 1×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1425314), eine Probe mit ca. 5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1425311), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1425313), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den insgesamt 103 Teilnehmern bei den drei positiven Proben überwiegend korrekte Ergebnisse mitgeteilt.

Von einem Teilnehmer wurden die Ergebnisse bei der negativen Probe # 1425313 als „fraglich“ klassifiziert. Bei den drei positiven Proben # 1425311, # 1425312 und # 1425314 sollten die falsch-negativen 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.

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 ca. 5×10^3 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.

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 eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 1425324; *B. pertussis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella holmesii* (# 1425321 mit 1×10^5 CFU/mL), und eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella parapertussis* (# 1425323 mit 1×10^5 CFU/mL) als verwandten Spezies. Die Probe # 1425322 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

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

Wie schon im letzten Ringversuch bereitete der spezifische Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in der Probe # 1425324 den insgesamt 137 Teilnehmern keine allzu großen Schwierigkeiten. In der Probe # 1425324 mit einer Erregermenge von $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL durchwegs richtig-positive und keine falsch-negativen Ergebnisse berichtet. Im RV 532 befand sich diesmal wieder ein IS481-positives *Bordetella holmesii*-Isolat, das (Methoden- bzw. Zielsequenz-bedingt) mit einigen *B. pertussis*-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagierte. Die Aktualität dieser Problematik spiegelt sich beispielsweise in einer Veröffentlichung von Njamkepo et al. wider [2].

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

Spezies muss jedoch aus diagnostischer Sicht stets gewährleistet sein (siehe Ringversuchsdiskussion April 2011).

Angesichts der sehr hohen Richtigkeitsquote für die *B. pertussis*-positive Probe # 1425324 und der technisch bzw. methodisch bei der Verwendung der IS481-Zielsequenz zu erwartenden Kreuzreaktion mit *B. holmesii* in Probe # 1425321 hat sich der Ringversuchsleiter in Abstimmung mit dem Sollwertlabor dazu entschlossen, bei der Erteilung der Zertifikate die falsch-positiven Ergebnisse bei *B. holmesii* nicht als falsch-negativ zu bewerten. Die 4 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der *B. paraptussis*-positiven Probe # 1425323 sollten jedoch intensiv daran arbeiten, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen Testsysteme zu verbessern.

Im Rahmen der genaueren Auswertung der mitgeteilten Ergebnisse sollte der Vollständigkeit halber noch angemerkt werden, dass der RIDAGENE Borrelia PCR Testkit (r-biopharm) neben dem qualitativen Nachweis offenbar auch eine spezifische Differenzierung von *B. pertussis*, *B. paraptussis* und *B. holmesii* leisten kann. Von den entsprechenden Teilnehmern wurde hier zumindest durchwegs die korrekte Speziesinformation mitgeteilt.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete ungefähr die Hälfte der Teilnehmer (n=62) selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifizierte kommerzielle Testkits (n=34) mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 46 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 5 Teilnehmern die Verwendung des Pertussis-Toxin-Gens und von 2 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit einer sehr hohen Menge an Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1425331; $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL), eine mit ca. fünffach geringerer Menge (# 1425332; $\sim 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit ca. fünfzigfach geringerer Menge (# 1425334, $\sim 10^4$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1425333), die nur humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden alle drei *H. pylori*-haltigen Proben (# 1425331, # 1425332 und # 1425334) von allen Teilnehmern ausnahmslos als richtig-positiv bewertet und somit konnte diesmal eine globale Richtigkeitsquote von 100% erzielt werden. Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Auch bei Probe # 1425333, die diesmal keine *Helicobacter pylori*-DNA enthielt sondern lediglich mit *Escherichia coli* K12 versetzt war, wurden keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet. Inhibitionskontrollen wurden von 46 der insgesamt 48 Teilnehmer

durchgeführt, Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet. Sowohl die kommerziellen, als auch die eigenentwickelten Testsysteme schnitten im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab. So erreichten die *in-house*-Testsysteme wie auch die kommerziellen Assays eine Richtigkeitsquote von 100%, was die richtig-positiven Ergebnisse betrifft. Auch bei den richtig-negativen Ergebnissen waren keine signifikanten Unterschiede in den Richtigkeitsquoten von *in-house* Testsystemen und kommerziellen Assays auszumachen. 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 32 der insgesamt 38 Teilnehmer mitgeteilt, und die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung waren 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 diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge eines EHEC:O157 Isolats (# 1425343; ca. 1×10^5 CFU/mL; *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, und *hlyA*-positiv), eine Probe mit etwas geringerer Menge dieses EHEC-Isolats (# 1425344, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und eine Probe mit 1×10^4 CFU/mL eines EPEC-Isolats (# 1425341; *eae*-positiv!). Probe # 1425342 enthielt einen *E. coli* K12 Stamm (*eae*- und *hlyA*-negativ).

Abgesehen von der etwas schwächer positiven EHEC-Probe # 1425344 (mit ca. 10^4 CFU/mL) führte die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten – sowohl für positive als auch für negative Befunde. Zudem waren in der aktuellen Runde des EHEC PCR-Ringversuchs auch keine Isolate mit „exotischen“ Varianten der Shiga-Toxin-Gene vertreten. Die beiden EHEC-positiven Proben # 1425343 und # 1425344 wurden problemlos von nahezu allen der insgesamt 116 Teilnehmer auch als solche erkannt und im Ergebnisformular als richtig-positiv berichtet. Die 5 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für die etwas schwächer positive EHEC-Probe # 1425344 verwenden vermutlich Testsysteme mit geringerer analytischer Sen-

sitivität oder verlieren etwas Sensitivität beim Aufschluss des Probenmaterials. Insgesamt gesehen sollte das aber nicht weiter schlimm sein, da in den meisten der teilnehmenden Laboratorien ein NAT-gestützter Nachweis von Shiga-Toxin-Genen im Umfeld der EHEC-Diagnostik primär als Kulturbestätigungstest eingesetzt wird. Bei zukünftigen Ringversuchen werden wir uns bemühen dass die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten und der Schwerpunkt somit auf einer Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme liegt und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze.

Die Probe # 1425342 (*E. coli* K12 Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde erfreulicherweise von allen Teilnehmern korrekt als negativ für EHEC/STEC berichtet.

Das EPEC-Isolat in Probe # 1425341 (*E. coli* K12 Stamm, *eae*-positiv, *hlyA*-negativ) wurde von 96 der insgesamt 116 Teilnehmer korrekterweise als negativ befundet. Von 18 der restlichen 19 Teilnehmer wurde hier jedoch ein positives PCR-Ergebnis für EHEC berichtet. Bei genauerer (visueller) Prüfung der jeweiligen Ergebnisbögen, der handschriftlichen Kommentare sowie der angegebenen Code-Nummern war aber rasch klar, dass es sich hier offenbar durchwegs um einen positiven PCR-Nachweis des *eae*-Gens (bei negativem PCR-Nachweis der *stx*-Gene) handelte.

Daher haben wir die Ergebnisse der 19 Teilnehmer methodisch und fachlich korrekt als „EPEC-positiv“ aber „EHEC-negativ“ umklassifiziert und es finden sich auch in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 7) bei dieser Probennummer keine falsch-positiven Ergebnisse mehr. Das eine als „fraglich“ klassifizierte Ergebnis bei Probe # 1425341 konnten wir auch nach Durchsicht des Ergebnisbogens nicht genauer auflösen.

Neben *in-house* Testsystemen werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle Assays eingesetzt. In den Richtigkeitsquoten zeigte sich keine Über- bzw. Unterlegenheit eines Systems, was für die breite Etablierung PCR-/NAT-gestützter Testsysteme spricht. Zudem wurden von 101 Teilnehmern die differenzierten Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin(*eae*)- und/oder Enterohämolysin(*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt. Lediglich zwei Teilnehmer berichteten hier unkorrekte Ergebnisse.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Nachdem die Probenauswahl des letzten Ringversuchs mehr auf die analytische Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzielte, wollten wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Prüfung der analytischen Sensitivität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchproben enthielt somit eine Probe mit einer hohen Menge an *Borrelia spielmanii* (# 1425354, $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 1425353, $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL), eine Probe mit

relativ geringer Menge (# 1425351, $\sim 1 \times 10^3$ Organismen/mL) sowie eine Probe die eine relativ hohe Menge der Rückfallfieber (RF) Borrelie *Borrelia turicatae* enthielt (# 1425352, $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL).

Nochmals eine **kurze Rekapitulation zu *B. burgdorferi* sensu lato**: Mittlerweile sind 21 verschiedene dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörige, genetisch eindeutig unterscheidbare Spezies beschrieben. Unterschiede in den zur Diagnostik herangezogenen Zielgenen können bei z.T. erheblicher Inter- aber auch Intraspezies Heterogenität ein Problem für den PCR-/NAT-gestützten Nachweis darstellen. Gesichert humanpathogen und weit in Europa verbreitet sind *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* sowie die als neue Spezies akzeptierte *B. bavariensis*. Ebenfalls gesichert humanpathogen ist *B. spielmanii*, allerdings wurde diese Spezies bislang nur selten bei Erkrankungen (insbesondere Haut) oder in Zecken nachgewiesen. Als möglicherweise humanpathogen werden *B. bissettii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* eingestuft, alle in Europa nachgewiesen. Zu betonen ist auch die erhebliche genetische Heterogenität von *B. garinii* die allein für das OspA zumindest fünf serologisch und genetisch differenzierbare Typen in Europa zeigt.

B. turicatae dagegen ist den RF-Borrelien zuzurechnen und wird von einer Lederzecke – *Ornithodoros turicata* – übertragen. Die Relevanz dieser Spezifitätskontrolle ist in der auch in Deutschland regelhaft nachweisbaren RF-Borrelie *B. miyamotoi* begründet. Es darf betont werden, dass diese Borrelie durch die Schildzecke *Ixodes ricinus* übertragen wird – Hauptvektor für *B. burgdorferi* s.l. Teilnehmer, welche die nicht empfehlenswerte Untersuchung von vom Menschen entfernten Zecken auf *B. burgdorferi* s.l. anbieten und falsch-positive Ergebnisse mit *B. turicatae* erzielten, sollten sich zumindest um eine entsprechende Spezifizierung ihrer Methode bemühen. Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen: Die Detektion von *Borrelia spielmanii* in den Proben mit relativ hoher Erregerlast (# 1425353 mit $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL bzw. # 1425354 mit $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL) bereitete insgesamt wenig Probleme: die Quote richtig-positiver Ergebnisse war zwischen 99% und 97%. Bei abnehmender Erregerlast ($\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL) wurde von zehn Teilnehmern ein falsch-negatives, von einem Teilnehmer ein fragliches Ergebnis berichtet. Dagegen war die Anzahl der Teilnehmer mit falsch-positivem ($n=11$) oder grenzwertigem ($n=3$) Ergebnis, entsprechend knapp 87% richtig negativ, mit ihren Borrelien-spezifischen PCR/NAT Testsystemen bei der negativen Probe # 1425352 doch insgesamt hoch.

Da diese Probe die mit *B. burgdorferi* s.l. eng verwandte RF-Borrelie *Borrelia turicatae* enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr wahrscheinlich. Dabei darf noch einmal betont werden, dass mit *B. miyamotoi* auch RF-Borrelien zumindest in *I. ricinus* in Deutschland vorkommen, diese Spezifitätskontrolle somit einen durchaus realistischen Hintergrund hat. Laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen

während der Probenextraktion und -abarbeitung sind natürlich ebenfalls möglich und sollten ggf. kontrolliert und korrigiert werden.

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von 104 der 105 Teilnehmer mitgeführt und potentielle Inhibitionseignisse wurden lediglich von zwei Teilnehmern bei einer Einzelprobe (?) des gesamten 4-er Sets mitgeteilt. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. 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 51 der 105 Teilnehmer eingesetzt. Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den kommerziellen (Sensitivität durchschnittlich 98%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 94%) zu beobachten. 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 bestimmten kommerziellen und komplett vorkonfektionierten Testsystemen die vorgegebenen Zielwerte nicht erreicht. Ohne denjenigen Teilnehmern, die mit bestimmten kommerziellen Testsystemen die Zielwerte nicht erreichen (in der aktuellen Aussendung war dies bei 1 der 6 Demeditec GenFlow Assay Anwendern der Fall), 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.

RV 536: *Legionella pneumophila*

Wie schon beim letzten Mal hier vorab nochmals der Hinweis: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Legionella pneumophila* aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine sehr stark positive Probe # 1425364, die mit einer Menge von ca. 10^6 CFU/mL an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 5 versetzt war, sowie eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1425361, ca. 10^5 CFU/mL) an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 5. Die Probe # 1425362 des aktuellen Sets enthielt ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella dumoffii*. Die zweite „negative“ Probe # 1425363 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*.

Die beiden hoch positiven Proben des aktuellen Sets wurden erfreulicherweise von allen 97 Teilnehmer als

negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Zwei Teilnehmer berichteten ein falsch-positives Ergebnis und ein weiterer Teilnehmer ein fragliches Ergebnis. Da diese Probe lediglich *E. coli*-Zellen enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich. Vermutlich ist das falsch-positive Ergebnis hier durch laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung bedingt.

Die diesmal sehr stark positive Probe # 1425364 mit ca. 10^6 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG5 wurde mit einer Ausnahme von allen 97 Teilnehmern korrekterweise als positiv berichtet. Die etwa 10-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 1425361 (ca. 10^5 CFU/mL) konnte ebenfalls problemlos von fast allen Teilnehmern korrekt als positiv identifiziert werden. Ein Teilnehmer des aktuellen *Legionella pneumophila* PCR/NAT Ringversuchs berichtete bei drei der insgesamt 4 ausgesandten Proben ein als „fraglich“ klassifiziertes Ergebnis. Bei genauerer (visueller) Prüfung des entsprechenden Ergebnisformulars, der handschriftlichen Kommentare sowie der angegebenen Code-Nummern wurde aber deutlich dass dieser Teilnehmer lediglich ein *Legionella* spp. (genus-)spezifisches Nachweisverfahren verwendet hatte. Da die von ihm berichteten Ergebnisse hinsichtlich der Anwesenheit von *Legionella* spp. prinzipiell korrekt waren, wurde ein auf den „Nachweis von *Legionella* spp. auf Genusebene“ eingeschränktes Zertifikat erteilt.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für die gute Sensitivität der verwendeten Testsysteme, die allenfalls vereinzelt berichteten falsch-negativen Ergebnisse beruhen vermutlich eher auf anwendungstechnischen Problemen als auf unzureichender analytischer Sensitivität.

Die mit *Legionella dumoffii* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) versetzte Probe wurde von 88 Teilnehmern mit *L. pneumophila*-spezifischen PCR-/NAT-Testsystemen korrekterweise als negativ befundet. Acht Teilnehmer berichteten ein falsch-positives Ergebnis, was auf eine Kreuzreaktion bzw. mangelnde Speziespezifität der Zielsequenz zurückzuführen sein dürfte.

Vor allem *in-house* real-time PCR Protokolle mit ribosomalen Zielsequenzen zeigten in der Vergangenheit immer wieder Probleme bei der Speziespezifität. Bei Verwendung von nested Block-Cycler PCR-Protokollen zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung sollte jedoch der Fehler eher auf Anwenderseite gesucht werden (beispielsweise Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung), da dieses Testkonzept in jedem Fall die Unterscheidung der Spezies erlauben sollte.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 47 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Signifikante Unterschiede bezüglich der analytischen Sensitivität zwischen kommerziellen und selbstentwickelten Testsystemen (von 50 Teilnehmern verwendet) fanden sich nicht. Inhibitionskontrollen

wurden offenbar von 96 der 97 Teilnehmer durchgeführt, wobei von keinem der Teilnehmer ein signifikantes Inhibitionseignis in den Einzelproben des aktuellen Proben-satzes beobachtet wurde.

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit relativ hoher Menge an *Salmonella enterica* ser. Typhi (# 1425371; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit dem gleichen Isolat in einer etwa zehnfach geringeren Menge (# 1425373; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe mit *Salmonella enterica* ser. Grumpensis (# 1425372; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1425374), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysensystemen führte diesmal bei 3 der 4 ausgesandten Proben des Ringversuchssets zu tadellosen Richtigkeitsquoten von 100%. Auch die schwächer positive Probe # 1425373 wurde von 14 der insgesamt 15 Teilnehmer korrekt als positiv befundet. In vorausgegangenen Ringversuchen war bei solch relativ niedrigen Erregerlasten immer wieder das eine oder andere falsch-negative Ergebnis berichtet worden.

Die Ergebnislage der aktuellen Aussendung unterstützt somit auch die analytische Sensitivität der eingesetzten Testsysteme.

Da in der aktuellen Ringversuchsrunde keine falsch-positiven Befunde mitgeteilt wurden, deutet dies, im Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden, auch auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationseignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin, denn die negative Probe # 1425374 folgte diesmal unmittelbar nach den drei positiven Proben und wurde von keinem der 15 Teilnehmer als falsch-positiv getestet. Jeweils ca. die Hälfte der Teilnehmer verwendete kommerzielle bzw. selbstentwickelte Testsysteme.

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. Im aktuellen Ringversuch wurde jedoch eine Art Verdünnungsreihe von *Listeria monocytogenes* angefertigt, um primär die untere Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten Testsys-

teme abzu prüfen. Probe # 1425381 enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 10^5 CFU/mL), die auch von allen der insgesamt 31 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1425384 enthielt mit ca. 10^4 CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Mit ca. 10^3 CFU/mL *L. monocytogenes*/mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1425382 diesmal eine sehr geringe Menge der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise konnte selbst diese schwach-positive Probe noch von 26 der insgesamt 31 Teilnehmer als „positiv“ klassifiziert werden. Lediglich 5 Teilnehmer berichteten hier ein negatives Ergebnis – vermutlich wurde in diesen Fällen ein Testsystem mit unzureichender analytischer Sensitivität verwendet.

Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1425383), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs von keinem der 31 Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis beobachtet. Im Vergleich zu den vorhergegangenen Ringversuchen deutet dies auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationseignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

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. Bei diesem Ringversuch besteht explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung. Hält ein Teilnehmer lediglich ein **L. monocytogenes-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

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

Nach den zugegebenermaßen etwas umfangreichen und ausführlichen Diskussionen der Ergebniskonstellationen vorhergegangener MRSA-Ringversuche kann die Auswertung des aktuellen Ringversuchs wieder einmal erfreulich kurz gehalten werden. Da wir diesmal, vielleicht abgesehen von einem aus vielerlei Hinsicht interessanten und vermutlich auch ziemlich einzigartigen MSSA-Isolat, keine besonders „schwierigen“ oder komplexen Probenkonstellationen versandt haben, wurden von den insgesamt 279 Teilnehmern mit ihren unterschiedlichsten NAT-gestützten Testsystemen nahezu durchweg korrekte PCR Ergebnisse für die insgesamt 4 Proben des aktuellen Panels berichtet.

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1425392 diesmal eine relativ hohe Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (cMRSA; PVL-positiv; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), die Probe # 1425391 eine relativ hohe Menge eines sich **genotypisch als MRSA, aber phänotypisch nach mehrfacher Austestung und umfangreicher Charakterisierung als MSSA darstellendes *S. aureus*-Patientenisolat** (*S. aureus*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL; *mecA*-positiv, PVL-negativ; spa:t1613), die Probe # 1425393 ein Methicillin-resistentes *Staphylococcus epidermidis*-Isolat ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) und die Probe # 1425394 ein Methicillin-sensibles *Staphylococcus epidermidis*-Isolat ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL).

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der positiven MRSA Probe # 1425392 von nahezu allen der 279 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 2 falsch-negativen Ergebnisse bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden von diesen zwei Teilnehmern mit kommerziellen Testkits die entsprechenden Protokolle nicht präzise und vorgabengemäß abgearbeitet (was offenbar zu einer unzureichenden analytischen Sensitivität der PCR-Nachweisreaktionen führte) 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 streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen bleibt es für den Ringversuchsleiter jedes Mal aufs Neue verwunderlich, dass ein hoher Anteil der teilnehmenden Laboratorien mit bestimmten kommerziellen und komplett vorkonfektionierten Testsystemen erfolgreich die vorgegebenen Zielwerte erreicht, wogegen ein meist wesentlich geringerer Anteil dennoch daneben liegt. Ohne denjenigen Teilnehmern, die mit bestimmten kommerziellen Testsystemen diese 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.

Bei der mit 1×10^5 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1425392 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Auch die beiden MRSA-negativen Proben # 1425393 und # 1425394 wurden von jeweils 276 bzw. 277 Teilnehmern mit ihren PCR-gestützten MRSA-spezifischen Testsystemen als „negativ“ getestet. Für die drei falsch-positiven Ergebnisse bei Probe # 1425393 (*S. epidermidis*-Patientenisolat, *mecA* positiv, ca. 5×10^5 CFU/mL) bzw. das als „fraglich“ klassifizierte sowie das eine falsch-positive Ergebnis bei Probe # 1425394 (*S. epidermidis*-Patientenisolat, *mecA* negativ, ca. 1×10^5 CFU/mL) hat der Ringversuchsleiter keine naheliegende Erklärung. Aufgrund der Probenreihenfolge im aktuellen Set (zweimal MRSA hoch positiv gefolgt von zwei MRSA-negativen Proben) könnte es sich hier durchaus um isoliert aufgetretene Kontaminationsereignisse mit MRSA DNA während der Probenaufarbeitung oder Amplifikation bzw. Detektion handeln. Aber 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-negativen Befunden bei den MRSA-negativen Proben erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht.

Erwartungsgemäß wurden auch bei der „**PCR- bzw. genotypisch MRSA-positiven**“ Probe # 1425391 von nahezu allen der 279 Teilnehmer durchweg „korrekt“ positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Hierbei handelt es sich um ein hochinteressantes *S. aureus*-Patientenisolat, das wir kollegialerweise für Ringversuchszwecke zur Verfügung gestellt bekommen haben. Hier ein kurzer Steckbrief: nach wiederholter Anzucht und multipler Subkultur einzelner *S. aureus*-Kolonien zum Ausschluss des Vorliegens einer möglichen Mischpopulation erwies sich dieses Isolat **in der konventionellen Testung als Methicillin-**

sensibel. In der konventionellen Agglutination sowie mit einem qualitativen, immunochromatographischen Schnelltest ließ sich in dem *S. aureus*-Kulturisolat jedoch das Penicillin-bindende Protein 2a (PBP2a) zweifelsfrei nachweisen. Auf molekulargenetischer Ebene erwies sich dieses besondere *S. aureus*-Isolat als positiv für das *mecA*-Gen (dieser Befund deckt sich mit dem Nachweis des *mecA*-Genprodukts PBP2a auf Proteinebene) sowie für die MRSA-typische SCCmec Kasette. Obwohl es sich hier aus kultureller Sicht lediglich um ein MSSA-Isolat handelt, sind auf Genomebene alle populären und in der Regel auch sehr zuverlässigen Markergene für MRSA vorhanden. Daher wurde der Zielwert im Rahmen des aktuellen PCR/NAT-Ringversuchs auf „genotypisch MRSA positiv“ gesetzt (Tabellen 2 und 3; siehe Anhang 1, S. 12).

Mit kollegialer Unterstützung der microBIOMix GmbH sind wir natürlich gerade dabei die Gesamtgenomsequenz dieses Isolats mittels *next generation sequencing* (NGS)-Technologien zu ermitteln und dann im direkten Vergleich zu anderen MRSA bzw. MSSA Gesamtgenomen auf Unterschiede oder zusätzliche Genelemente hin zu untersuchen.

Hier zeigt sich auf sehr eindrucksvolle Weise, dass selbst in dem bunten Spektrum der medizinischen Mikrobiologie – und hier speziell innerhalb des illustren Feldes der Bakterien – wieder einmal das gute alte bayerische Sprichwort gilt: „s gibt nix wo's ned gibt!“...

Der technische oder methodische Hintergrund der 2 falsch-negativen und dem einen als „fraglich“ klassifizierten Ergebnis bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Angesichts der mit 1×10^5 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1425392, wie bereits zuvor bei Probe # 1425391 diskutiert, den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der erfreulich große Anteil von richtig-positiven Ergebnissen, bei den beiden PCR-positiven Proben und die überwiegend richtig-negativen Befunde bei den beiden MRSA-negativen Proben, erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine-Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende (PVL-negative) Ergebnisse der molekulargenetischen PVL-Testung wurden von 61 der insgesamt 279 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und alle Ergebnis-

se waren diesmal durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise in Linde und Lehn [4] oder Witte et al. [5]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in Reischl et al. [6]. 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 wie immer vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Chlamydia pneumoniae*-DNA aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 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 erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *C. pneumoniae*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 13) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit einer relativ hohen Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1425401; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL) und eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1425403; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL), eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL an *Chlamydia trachomatis* (# 1425404), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1425402), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Analog zu vorhergegangenen Ringversuchen 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 Analysesysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 13) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch alle Teilnehmer die Zielorganismen in der positiven Probe # 1425401 (ca. 10^5 IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Auch die zehnfach geringere Menge an Zielorganismen der Probe # 1425403 konnte von 112 der 113 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die beiden Proben ohne Zielorganismus (Probe # 1425404: *C. trachomatis*, ca. 10^5 IFU/mL und # 1425402: *Escherichia coli*) wurden von der überwiegenden Mehrzahl der Teilnehmer korrekt als negativ befundet. Lediglich ein falsch-positives Ergebnis für die *E. coli*-haltige Probe sowie zwei falsch-positive Ergebnisse

für die *C. trachomatis*-haltige Probe unterstreichen auf Neu die hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA. Bei den falsch-positiven Ergebnissen könnte es sich am ehesten um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von *E. coli* oder *C. trachomatis* erscheinen eher als unwahrscheinlich. Selbstentwickelte *in-house* NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 47 Labors eingesetzt, kommerzielle Assays wurden von 64 Teilnehmern verwendet. Aufgrund des leider noch relativ geringen Anteils und der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1425412 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL) und Probe # 1425411 und # 1425413 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL). Probe # 1425414 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Bis auf jeweils einen Ausreißer konnten die 128 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in den Proben # 14125411, # 1425412 und # 1425413 problemlos und zuverlässig nachweisen. Für die mit *E. coli* versetzte „negative“ Probe # 1425414 wurde erfreulicherweise nur ein falsch-positives Ergebnis berichtet. Zugrundeliegen dürften diesem am ehesten eine laborinterne Kontamination bei der Probenextraktion und -abarbeitung. Insgesamt zeigt die Ergebniskonstellation in einem breiten Teilnehmerfeld mit unterschiedlichsten Testsystemen und PCR-Protokollen eine relativ hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA.

Selbstentwickelte PCR-/NAT-Testsysteme kamen bei 54 Teilnehmern zum Einsatz, während die übrigen Teilnehmer kommerzielle Testsysteme verwendeten. Die Richtigkeitsquoten lagen bei *in-house* und vorkonfektionierten Assays jedoch auf vergleichbarem Niveau.

An dieser Stelle sei auch noch auf eine **aktuelle Publikation** der geschätzten Kollegen aus dem Konsiliarlabor für Mykoplasmen hingewiesen: Dumke und Jacobs [7].

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

Auch hier wieder eine Anmerkung vorweg: Der kombinierte Ringversuch Bakteriengenomnachweis „PCR/NAT *Coxiella burnetii* & *Bacillus anthracis*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum **Direktnachweis geringer Mengen an *Coxiella burnetii*- und *Bacillus anthracis*-DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 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 # 1425424 und $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1425423), zwei Proben mit hundert-fach unterschiedlicher Menge an *Bacillus anthracis*-DNA ($\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1425424 und $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1425421), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1425422), die nur *E. coli* in einer 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. 15) sowie für *Bacillus anthracis* in den Tabellen 4 und 5 (siehe Anhang 1, S. 16).

***Coxiella burnetii*:** Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich einfach. Die Proben ohne den Zielorganismus (# 1425421 und # 1425422) wurden ausnahmslos korrekt als negativ bewertet. Die etwas stärker positive Probe # 1425423 mit ca. 10^4 Genomkopien *C. burnetii*/mL wurde ebenfalls von allen Teilnehmern richtig klassifiziert, lediglich ein Teilnehmer scheiterte an der zweiten positiven Probe # 1425424 des Probesets mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an *C. burnetii* (ca. 10^3 Genomkopien/mL) und berichtete ein negatives Ergebnis. Auch wenn es sich möglicherweise nur um ein sporadisches Ereignis handelt, sollte ein falsch-negatives Ergebnis beim Nachweis eines L3-Erregers Anlass sein, das verwendete Testsystem sowie die Arbeitsabläufe sorgfältig zu prüfen, da die molekulare Diagnostik hier entscheidenden Einfluss auf das klinische Management eines Patienten nimmt.

Mit 19 diagnostischen Labors, welche *in-house* Testsysteme zum spezifischen Nachweis von *C. burnetii* verwendeten, waren die selbstentwickelten Assays den vorkonfektionierten kommerziellen Testkits zahlenmäßig überlegen.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA enthielten durchwegs eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Bacillus anthracis: Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt: alle 17 Teilnehmer konnten mit ihren jeweils vor Ort etablierten *Bacillus anthracis*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die beiden positiven Proben mit ca. 1×10^5 Genomkopien/mL (# 1425421) und mit ca. 1×10^3 Genomkopien/mL (# 1425424) an *Bacillus anthracis*-DNA erfolgreich nachweisen. Ebenfalls wurden von allen Teilnehmern korrekt negative Ergebnisse für die Proben ohne entsprechende Zielorganismen # 1425422 (nur *E. coli* in einer Suspension aus humanen Zellen) sowie # 1425423 (nur *Coxiella burnetii* mit ca. 10^4 Genomkopien/mL in einer Suspension aus humanen Zellen) beobachtet. Wie im vorausgehenden Ringversuch wiederum 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

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 17) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1425433 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL), Probe # 1425431 mit ca. zehnfach geringerer Menge (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1425432 mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *F. tularensis* spp. *novicida*. Im Ringversuchssprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (#1425434), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Alle Teilnehmer berichteten korrekte positive Ergebnisse für die Probe # 1425433, welche ca. 1×10^6 CFU/mL des Zielorganismus enthielt. Die Proben mit etwa zehnfach geringerer Erregerlast (#1425431: 1×10^5 CFU/mL *F. tularensis* spp. *holarctica* und # 1425432: 1×10^5 CFU/mL *F. tularensis* spp. *novicida*) wurden von 18 der 19 Teilnehmer als positiv für den Zielorganismus berichtet. Die

falsch-negative Bewertung sollte Anlass geben, die laborinternen Abläufe und das verwendete Testsystem bzgl. Sensitivität zu evaluieren und ggfs. zu optimieren. Technisch sollte die Detektion einer Erregerlast von 1×10^5 CFU/mL sicherlich keine Probleme bereiten. Die Probe # 1425434, welche lediglich *E. coli* und humane Zellen enthielt, wurde von allen Teilnehmern korrekt als negativ gewertet. Insgesamt deckt sich die Ergebnislage weitgehend mit den Beobachtungen aus vorherigen Ringversuchen und spricht erneut für ein gutes Funktionieren sowohl der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme, als auch der implementierten laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

RV 544: Carbapenemase-Gene

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Carbapenemase-Gene“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zur molekularen Resistenztestung bzw. dem Direktnachweis von charakteristischen Carbapenemase-Genen aus DNA-Präparationen von Reinkulturen an Enterobacteriaceae** konzipiert. Zum orientierenden Herantasten an die technische Eignung und die „Praktikabilität“ der versandten Probenmaterialien werden wir uns in den ersten Runden dieses methodisch anspruchsvollen Ringversuchs zur molekularen Resistenztestung auf die Abprüfung eines kleinen Spektrums der derzeit häufigsten Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae beschränken: KPC, VIM, OXA-48 ähnliche Gene, GES-Carbapenemasen NDM, IMP und GIM.

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 18) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten Enterobacteriaceae: Probe # 1425441 enthielt *Klebsiella pneumoniae* Zielorganismen mit KPC-2 und VIM-26 Genen (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL), Probe # 1425443 enthielt *Morganella morganii*-Zielorganismen mit NDM-1 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL) und Probe # 1425444 enthielt ein *Klebsiella pneumoniae*-Isolat mit OXA-48 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 1425442 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

Wie im vorausgehenden Ringversuch Frühjahr 2014 waren auch die Ergebnisse der aktuellen Runde sehr erfreulich. Alle 22 Teilnehmer erkannten sowohl die Proben # 1425441, # 1425443 und # 1425444 als positiv und wiesen so in ihren Testsystemen korrekterweise das Vorliegen einer Carbapenemase nach. Auch die Probe # 1425542, welche lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene enthielt, wurde von allen teilnehmenden diagnostischen Laboratorien als negativ bewertet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen. Gerade bei der molekularen Diagnostik von Carbapenemase-verdächtigen Enterobacteriaceae ist dies unbedingt erforderlich, da diese Befunde sowohl therapeutisch als auch aus Sicht der

Krankenhaushygiene weittragende Konsequenzen zur Folge haben können.

Aufgrund der leider noch nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Bezogen auf die individuell ermittelten Richtigkeitsquoten in Tab. 3 (siehe Anhang 1, S. 18) war die gesamte Ergebnislage bei diesem Ringversuch jedoch sehr gut.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Dieser im Jahr 2013 neu in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch Nr. 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis von *Pneumocystis jirovecii*-DNA** in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set zwei positive Proben (Tab. 1; siehe Anhang 1, S. 19): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1425601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^4 Genomkopien/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 1425604; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^3 Genomkopien/mL) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1425602 und # 1425603), aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Der Nachweis des Zielorganismus aus der stärker positiven Probe (# 1425601, ca. 1×10^4 Genomkopien/mL) gelang 80 der 81 Teilnehmer. Das falsch-negative Ergebnis sollte bei dieser Erregermenge dem TN Anlass bieten, sein verwendetes Testsystem bezüglich der Sensitivität zu evaluieren und ggf. zu optimieren. Probe # 1425604 mit einer zehnfach geringeren Erregermenge wurde noch von 78 der 81 Teilnehmer korrekt als „positiv“ identifiziert. Bereits im vorausgehenden Ringversuch im Frühjahr 2014 war eine Probe mit vergleichbarer Erregermenge versendet worden, welche 75 der damals 84 Teilnehmer korrekt befundet haben. Einige der Teilnehmer scheinen somit unserem Aufruf, im Falle falsch-negativer Befunde die eingesetzten Testsysteme in ihrer Sensitivität zu evaluieren und zu optimieren, erfreulicherweise gefolgt zu sein. Für die Teilnehmer mit falsch-negativen Befunden in dieser Ringversuchsrunde bleibt unser Appell weiterhin bestehen, zumal eine Erregermenge von 1×10^3 nicht als „äußerst gering“ einzuschätzen ist.

Bei den Proben ohne Zielorganismen (# 1425602 und # 1425603), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs von 2 (# 1425602) bzw. 3 (# 1425603) Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse berichtet (Tab. 2; siehe Anhang 1, S. 19). Dies legt ein laborinternes Kontaminationsereignis

oder eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe und sollte eine sorgfältige Aufarbeitung nach sich ziehen. Andererseits sprechen die mehrheitlich richtig-negativen Ergebnisse für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen im Teilnehmerkreis. Alle eingesetzten Testsysteme wiesen Inhibitionskontrollen auf, eine nennenswerte Inhibition wurde von keinem der Teilnehmer berichtet.

Danksagung

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

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

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000015.shtml>

1. Anhang1_lab000015.pdf (322 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ November 2014

Literatur

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11
3. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46331-0
4. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Pantón-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Pantón-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583

5. 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 Pantone-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
6. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z
7. Dumke R, Jacobs E. Evaluation of five real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2014 Nov;52(11):4078-81. DOI: 10.1128/JCM.02048-14

Bitte zitieren als

Reischl U, Schneider W, Holzmann T, Ehrenschröder M, Hiergeist A, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, Spletstößer W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2014 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab*. 2014;5:Doc05. DOI: 10.3205/lab000015, URN: urn:nbn:de:0183-lab000015

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000015.shtml>

Veröffentlicht: 16.12.2014

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.

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

Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: discussion of the November 2014 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
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Wolf Splettstößer⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Martin Kaase⁸

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

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

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

4 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

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

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

7 Institute for Medical Microbiology, Immunology

and Parasitology (IMMIP),
University of Bonn, Germany

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

Brief discussion of the current results

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

Examination results November 2014

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

The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *C. trachomatis* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL in sample # 1425304 and $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL in sample # 1425303) and three samples with various amounts of *N. gonorrhoeae* organisms ($\sim 10^3$ CFU/mL in sample # 1425301, $\sim 10^4$ CFU/mL in sample # 1425302 and $\sim 10^5$ CFU/mL in sample # 1425303).

Despite relatively low amounts of *N. gonorrhoeae* target cells in the positive sample # 1425301, only one false-negative and 4 false-positive results were observed among the *N. gonorrhoeae*-specific results reported by the 168 participants for all 3 GO-positive samples. Among the *Chlamydia trachomatis*-specific results, no false-positive and only 3 false-negative results were reported by the 168 participants.

Since the impact of false-positive *N. gonorrhoeae* PCR results can be dramatic in certain anamnestic constellations, false-positive GO results in sample # 1425304 should encourage the corresponding participants to review and optimize their CT- and GO-specific NAT-based assays. Inhibition controls were included by all of the 166 participants. With the exception of one inhibition event seen with one sample of the entire QC set of 4 samples by one participant, no further inhibitory events were reported. In this context, it should be noted, that we have not added putative inhibitory substances into the samples of the current distribution.

Tables 4 to 7 (Attachment 1, p. 2-3) were included this time to enable a detailed evaluation of the *C. trachomatis*- and GO-specific NAT components of combined GO/CT

test systems. In Tables 4 and 5 (Attachment 1, p. 2) only the *C. trachomatis* (CT)-specific results and in the Tables 6 and 7 (Attachment 1, p. 3) only the *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-specific results are presented and evaluated statistically.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three positive samples: # 1425311 with $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, # 1425314 with $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms and sample # 1425312 with $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Sample # 1425313 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 4), at least in general the reported results were correct for the three *C. trachomatis*-positive samples # 1425311, # 1425312 and # 1425313. Only three false-negative results were observed among the collective of 103 participants. This striking match of the current results with observations and accuracy rates in the last years can be considered as an evidence for a high reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing.

For the *C. trachomatis*-negative sample # 1425313, containing only non-infectious human cells and *E. coli*, one of the 103 participants reported a result classified as "questionable". Please note: for questionable results, certificates are only issued when correct results are reported by the participant for the remaining 3 samples of RV 531.

False-negative PCR-results with samples containing around $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms should encourage the participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system.

Run controls were performed by all of the 103 participants. With the exception of one inhibition event seen with one sample of the entire QC set of 4 samples by one participant, no inhibitory events were reported. 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 103 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1425324; 1×10^5 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella parapertussis* (# 1425323; 1×10^5 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella holmesii* (# 1425321 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL; IS481-positive strain!), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1425322).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. None of the 137 participants reported false-negative results for the sample # 1425324 (*B. pertussis*, 1×10^5 CFU/mL). The amount of 10^5 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms is significantly above the previously observed lower limit of detection for the corresponding PCR assays or test systems.

The *B. parapertussis* sample was tested false-positive by 4 participants whereas the *B. holmesii* sample was tested false-positive by 95 of the 137 participants. Since it is well known that *B. holmesii* strains may contain copies of the most popular *B. pertussis* target gene IS481, the high rate of false-positives is not really surprising for the latter sample. Considering that the detection rate of the *B. pertussis* sample # 1425324 was very high (indicating a good performance of the *B. pertussis*-specific PCR/NAT assays), and IS481 is still one of the most practical and sensitive target genes, we have not scored those (false) positive results for the *B. holmesii* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. For colleagues who are interested in the IS481 topic, there is a recent paper by Njamkepo et al. [2].

However, for participants who have observed false-positive *B. pertussis* results with *Bordetella parapertussis* in sample # 1425323, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity of their assay concepts. All of the remaining results reported by the 137 participants were correct. Run controls were performed by 134 participants and inhibition events were not observed among the samples of the current distribution.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained three samples with a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolated from a patient in the course of a antibiotic therapy failure study in a kind of dilution series. Sample # 1425331 contained approximately 5×10^5 CFU/mL, sample # 1425332 approximately 1×10^5 CFU/mL and sample # 1425334 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 the two *Helicobacter pylori*-positive samples (#1425331: $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL and # 1425332: $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) led

to correctness values of 100% for the positive as well as for the negative results reported by the 38 participants. As noted in the description of RV 533, clarithromycin resistance testing in the examined *H. pylori* isolates could be performed by participants on a voluntary basis. This molecular resistance testing is usually based on amplification and sequencing of characteristic regions within the *H. pylori* 23 S rDNA or the use of hybridization probes based qPCR assays. Results for clarithromycin resistance were reported by 32 of the 38 participants for the three *H. pylori*-positive samples of the current distribution. All of the reported molecular clarithromycin resistance testing results were correct.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed previously, the challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenic factors (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1425343 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive) and # 1425344 (*E. coli*, 1×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive). The other two EHEC-negative samples contained an *eae*-positive EPEC strain (sample # 1425341; 1×10^4 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1425342).

All of the 116 participants correctly reported negative results for samples # 1425342, containing only *E. coli* K12, and correctly detected the relatively high numbers of EHEC target organisms (1×10^5 CFU/mL) in sample # 1425343. The other “negative” sample (# 1425341), containing an *eae*-positive but *stx*-negative EPEC isolate, was reported EHEC-negative by 96 of the 116 participants. Nineteen participants reported a (false) positive result for sample # 1425341, but indicated the molecular detection of the *eae*/intimin gene only. For an EPEC strain, the reported “*eae*-positive” results are theoretically correct. So we re-assigned the solely positive *eae* detection as EPEC and modified them as “negative” for EHEC target organisms.

For the weak positive EHEC sample # 1425344, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in consistently high accuracy rates. It was correctly reported EHEC-positive by 111 of the 116 participants. The 5 participants (who observed an false-negative result with sample # 1425344) may check the analytical sensitivity of their individual PCR assay concepts.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test, most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower

detection limit obtained. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 101 of the 116 participating laboratories. With the exception of two laboratories, all reported results were correct. None of the participants observed significant inhibition of the NAT-reaction.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

Short recapitulation: So far 21 different species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato complex were described, that naturally present genetic differences in commonly used target genes. Of special interest – since of proven 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 proven pathogenicity for humans, seems to be rare and was so far only recovered from skin manifestations of Lyme borreliosis. *B. bissetii*, *B. lusitanae* und *B. valaisiana* are considered as potential human pathogens. Regarding *OspA*, especially *B. garinii* showed a striking heterogeneity with at least 5 genetic distinguishable “genotypes” in Europe.

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *B. spielmanii* organisms in our proprietary matrix: sample # 1425354 (1×10^5 genome equivalents/mL), sample # 1425353 (1×10^4 genome equivalents/mL) and sample # 1425351 (1×10^3 genome equivalents/mL). Sample # 1425352 contained about 1×10^4 genome equivalents/mL of *Borrelia turicatae* organisms.

B. spielmanii-containing samples with 10^4 to 10^5 genome equivalents per ml were correctly identified by 97%–99% the participants. Only 90% however identified the 10^3 genome equivalents/ml containing sample correct as positive. The false-negative results should prompt re-evaluation of the assay sensitivity.

The “negative” sample # 1425352 was classified false-positive by 11 and questionable by an additional three laboratories. Potentially, this is either due to cross-reactivity with this closely related spirochete or due to a contamination during sample preparation or analysis. Therefore, the workflow should be optimized to minimize clinically misleading false-positive results.

Approximately half of the participating laboratories used self-developed (in-house) tests with inhibition and/or positive controls. Only 2 out of 104 participants noted significant inhibition of the NAT-reaction in one sample of the current distribution. There were also no significant differences in test performance between commercially

available kits and in-house assays for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

RV 536: *Legionella pneumophila*

Due to numerous requests: this test is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for direct detection of low amounts of *Legionella pneumophila* from appropriate clinical specimen (such as respiratory specimens for example). Individual samples may contain relatively small amounts of the corresponding target organism. For this reason, participation is promising only for diagnostic laboratories, which have established a highly sensitive and specific PCR-/NAT-based method for the detection of *L. pneumophila* DNA or who want to evaluate their method with the help of an external quality control.

The current set of QC samples contained two positive samples with *Legionella pneumophila* serogroup 5 (# 1425364; $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL and # 1425361; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) next to one sample containing *Legionella dumoffii* (# 1425362; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1425363 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ($\sim 1 \times 10^6$ and $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) samples # 1425361 and # 1425364 were correctly tested positive by 96 of the 97 participating laboratories, respectively. Sample # 1425362, which contained $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Legionella dumoffii*, was classified as false-positive by 8 of the participating laboratories. Observing false-positive *L. pneumophila* PCR results for non-pneumophila *Legionella* spp. should encourage the corresponding participants to review and optimize the analytical specificity of their “*L. pneumophila*-specific” assays and/or PCR-protocols.

One of the participants reported 3 “questionable” results and one negativ result for the 4 samples of the current distribution. When checking his report form in more detail, the use of a *Legionella* spp. (genus)-specific PCR assay was indicated. So the simple reason for this result constellation is obvious and we restricted the corresponding certificate on the detection of *Legionella* spp. only.

All but one of the 97 participants indicated the use of internal or external inhibition controls in their assay concepts and none of the investigated samples showed inhibition.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained two samples with *Salmonella enterica* serovar Typhi (sample # 1425371 with 1×10^5 CFU/mL, and sample # 1425373 with 1×10^4 CFU/mL). Sample # 1425372 contained *Salmonella enterica* serovar Grumpensis (with 1×10^5 CFU/mL) and sample # 1425374 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. The discussion of the PCR results reported by the 15 participants of the current distribution is very concise: only one false-negative result was reported for the weak

positive sample # 1425373 (containing 1×10^4 CFU/mL *Salmonella enterica* serovar Typhi), no false-negative results were reported for the other 2 *Salmonella enterica*-positive samples of the current distribution and no cross-reactions with the *E. coli* strain in sample # 1425374 were observed. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays.

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

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1425383; only *E. coli* cells), and three samples positive for *L. monocytogenes* (# 1425381, # 1425384 and # 1425382). With the exception of 5 false-negative results for the weak-positive sample # 1425382 (containing a very low amount of target organisms), the *Listeria monocytogenes*-positive samples # 1425381 and # 1425384 were correctly reported positive by all participants. In addition, the “negative” *E. coli*-containing sample # 1425383 was also identified as negative by all laboratories. Most of the participants used *Listeria monocytogenes*-specific assays. As noted in the report form, participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT-assays may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. In this case, (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species (which may be present in some samples of future distributions) do not negatively affect issuing the corresponding QC certificates. In sum, the current results indicate a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA DNA in typical clinical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs, so the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a background of human cells and other components. It is therefore important to note that NAT assays designed mainly for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set. Despite one “interesting” sample (containing an *S. aureus* patient isolate which presents as a MSSA in conventional culture, susceptibility and agglutination testing but contains all MRSA marker

genes which are routinely used in modern molecular MRSA PCR/NAT screening assays), no “difficult” samples were included in the current distribution. Briefly, sample # 1425391 of the current set contained a *S. aureus* isolate (MRSA by genotype but MSSA by phenotype, *mecA*-positive, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1425392 contained a relatively high number of a methicillin resistant *S. aureus* isolate (MRSA, PVL-positive; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1425393 contained a CoNS strain oxacilin resistant (*S. epidermidis*; *mecA*-positive, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1425394 contained a CoNS strain oxacilin sensibel (*S. epidermidis*; *mecA*-negative, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL).

The MRSA negative samples # 1425393 and # 1425394 were reported correctly negative by 276 of 279 participants with their PCR-based MRSA-specific assays. Only three participants observed a false-positive or questionable result, which probably could have been caused by contamination events with MRSA DNA during the sample preparation, amplification or detection. Fortunately, for the PCR/NAT-positive MRSA samples # 1425391 and # 1425392, positive results were reported by nearly all of the 279 participants. Only 2 false-negative results were reported for each sample and one participant classified his result as “questionable”. Affected participants are encouraged to analyse and optimize their NAT-based assays, because the amount of MRSA target organisms in the respective samples (1×10^5 CFU/mL) was far away from abnormally low.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported a correct result, predominantly positive results for the two positive samples and correctly negative findings for the 2 CoNS samples. This indicates excellent sample workup and functional implementation of laboratory-specific prevention measures to avoid deleterious 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 61 of the 279 participating laboratories and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were all correct. A proven real-time PCR protocol targeting the PVL-encoding *lukF/S* genes and further information can be found at Linde and Lehn [4] or Witte et al. [5]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at Reischl et al. [6].

In addition, a number of commercial real-time PCR assays for direct detection of MRSA have implemented the molecular detection of PVL-encoding genes in the meantime.

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. pneumoniae* in typical (clinical) sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we intended to mimic the situation of pro-

cessing typical clinical samples like BAL or other respiratory specimens. So the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components. As a consequence, diagnostic assays designed for *C. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *C. pneumoniae* infected cells in individual samples of the QC set.

The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1425401 was spiked with $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL of *C. pneumoniae*, whereas sample # 1425403 contained an approximately ten fold lower amount of *C. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL). Sample # 1425404 contained significant numbers of *Chlamydia trachomatis*, an organism to assess analytical specificity. Only *E. coli* and human cells were present in sample # 1425402.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 13), all participants reported correct results for the positive sample # 1425401. 112 of the 113 participants also reported correct positive results for sample # 1425403 and correct negative results for sample # 1425404 (*E. coli*). Only one participant reported false-positive results for the second "negative" sample # 1425402 (*E. coli*). Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

The current set of QC samples contained three positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL) was present in sample # 1425412. An approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1425411 and sample # 1425413. The set was completed by sample # 1425414, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli*. 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 high percentage of correct

results. With the exception of one laboratory, all participants correctly reported samples # 1425411, # 1425412 and # 1425413 as positive. The negative sample # 1425414, containing only *E. coli* and human cells, was erroneously reported positive by one laboratory. This potentially indicates cross-contamination during sample preparation and diagnostic workup.

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 # 1425424 and $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1425423), two samples with hundred fold different amounts of *Bacillus anthracis* (sample # 1425421 with $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL and sample # 1425422 with $\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL). Sample # 1425422 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

For convenient data presentation and analysis, we decided to depict the PCR/NAT results for each target organisms within this combined EQAS scheme in two separate tables: please see Tables 2 and 3 (Attachment 1, p. 15) for the *Coxiella burnetii*-specific results and Tables 4 and 5 (Attachment 1, p. 16) for the *Bacillus anthracis*-specific results.

***Coxiella burnetii*:** The relatively high amount ($\sim 10^4$ genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1425423 (together with 5×10^4 genome copies/mL *B. anthracis*) was correctly reported as positive by all participants. 21 out of 22 participants also correctly identified sample # 1425424 with a tenfold lower amount of the target organism as positive. The two "negative" samples (#1425422 contained only *E. coli* and #1425421 contained only *B. anthracis*) were correctly reported by all diagnostic laboratories. Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good correlation with the expected results was observed. One participant has reported a false-negative result for *C. burnetii*: missing about 10^3 genome copies/mL in the course of molecular detection of a biosafety level 3 pathogen should initiate more detailed and careful investigations of methodical or technical reasons.

***Bacillus anthracis*:** The results for this EQAS scheme are easily discussed. All of the 17 participants correctly reported positive results for both positive samples

1425421 ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) and # 1425424 ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL). In addition, all participants correctly reported negative results for the two “negative” samples # 1425422 (containing *E. coli* and human cells) and # 1425423 (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 three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis* spp. *holarctica* ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) was present in sample # 1425433, an approximately tenfold lower amount ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1425431, and a high amount of *Francisella tularensis* spp. *novicida* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1425432.

Similar to QC samples from past distributions, the sample # 1425433 (1×10^6 CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *holarctica*) was correctly identified by all participants. The positive samples # 1425431 and # 1425432 containing a tenfold lower amount of the target organism ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *holarctica* and *Francisella tularensis* spp. *novicida*, respectively) were correctly tested positive by 18 of the 19 participating laboratories. False-negative results for molecular detection of a biosafety level 3 pathogen should certainly trigger thorough investigations, especially as the amount contained in the sample ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) can definitely not be considered to be at the limit of detection. As no false-positive result was observed for the “negative” sample # 1425434 it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions measures to prevent deleterious contamination events.

RV 544: Carbapenemase genes

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

of the wide range of known carbapenemase encoding genes in different bacteria, the panel focuses on a small selection of the currently most common carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae*: KPC, VIM, OXA-48 like genes, GES carbapenemase, NDM, IMP, and GIM.

As shown in Tab. 1 (Attachment 1, p. 18), the current set contained three samples with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1425441 contained *Klebsiella pneumoniae* with KPC-2 and VIM-26 genes (approx. 1×10^6 genome copies/mL), sample # 1425443 contained *Morganella morganii* isolate with a NDM-1 gene (approx. 1×10^7 genome copies/mL) and sample # 1425444 contained a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring a OXA-48 gene (approx. 1×10^7 genome copies/mL). The fourth sample # 1425442 was designed negative control – it contained only *E. coli* without carbapenemase genes.

Results for the KPC-2 and VIM-26 positive *K. pneumoniae* sample (# 1425441), the OXA-48-positive *K. pneumoniae* sample as well as the NDM-1 positive *M. morganii* sample (# 1425443) were correctly reported positive by all of the 22 participants. Additionally, no false-positive results were reported for sample # 1425442 containing only *E. coli*, it therefore seems that the participating laboratories have implemented efficient precautions to prevent contamination events.

In-house NAT assays were used for the detection of carbapenemase encoding genes by 12 of the 22 participating laboratories, while the others quoted the use of commercial test systems or kits on the result form. As these commercial test system were not specified by all of the participants a detailed comparisons between commercial kits and the heterogeneous group of proprietary (in-house) test systems with respect to sensitivity, specificity or susceptibility to contamination events is not yet possible. Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity, as shown in Tab. 3 (Attachment 1, p. 18), were observed for the carbapenemase gene-specific NAT assays used by the 22 participants.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series, which was started in 2013, is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *P. jirovecii* DNA in appropriate clinical samples**. Therefore, the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components which may also be present in clinical samples.

The latest set of QC samples contained two positive specimens (Tab. 1; see Attachment 1, p. 19). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) was present in sample # 1425601 and an approximately tenfold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL) was present in sample # 1425604. The set was completed by sample # 1425602 and sample # 1425603, which contained

only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Sample # 1425601, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) was reported “positive” by all but one of the 81 participating laboratories (Tab. 2; Attachment 1, p. 19). Sample # 1415604 with a slightly lower concentration of *P. jirovecii* ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL) was correctly detected positive by 78 participants. Participants who reported a wrong negative result should reevaluate the sensitivity of their test system and sample workup, as the amount of 1×10^3 genome copies/mL cannot be considered as extremely low and is indeed technically easily detectable. Two laboratories reported false-positive results for sample # 1425602 and even three labs for sample # 1425603, containing only *E. coli* but no target organism. The reason for contamination of these samples should be evaluated.

The yet limited number of participants in the trials RV 542, RV 543, RV 560, together with an incomplete reporting of the assays and manufacturers applied, do not allow a sound evaluation of the quality of either commercial tests or the very heterogeneous in-house PCR/NAT assays in 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/lab000015.shtml>

1. Anhang1_lab000015.pdf (322 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)”
November 2014

References

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11
3. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46331-0
4. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Pantone-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Pantone-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
5. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Pantone-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;24(1):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
6. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z
7. Dumke R, Jacobs E. Evaluation of five real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2014 Nov;52(11):4078-81. DOI: 10.1128/JCM.02048-14

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, Ehrenschrwender M, Hiergeist A, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, Splettstößer W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2014 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab*. 2014;5:Doc05. DOI: 10.3205/lab000015, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000158

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000015.shtml>

Published: 2014-12-16

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.