

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2015 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
Martin
Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
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 PCR/NAT-gestützten Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, EHEC/STEC, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella enterica* und *Listeria spp.*, MRSA bzw. cMRSA, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Pneumocystis jirovecii* (vorm. *P. carinii*) und der molekularen Resistenztestung für Carbapenemase-Gene bei *Enterobacteriaceae* sowie die beiden vor kurzem neu ins Programm aufgenommenen Ringversuche zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von *Clostridium difficile* (Toxingene) und VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken) darstellen und kurz diskutieren.

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

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

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

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 16 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „Highlights“. So wurde beispielsweise im aktuellen RV 536 *Legionella pneumophila* zwei Proben mit der Spezies *Legionella micdadei* versandt, die von vielen unserer Ringversuchsteilnehmer fälschlicherweise als PCR-positiv getestet wurden.

Als weiteres „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 539 MRSA/cMRSA ein mecC-positives MRSA-Isolat ausgesandt, das erwartungsgemäß nur von ca. einem Drittel der Teilnehmer mit ihren MRSA-spezifischen PCR-Testsystemen detektiert werden konnte. Im gleichen Probenstet befand sich diesmal auch eine sog. mecA dropout Mutante bei der die SCCmec-Kassette zwar im *S. aureus*-Genom integriert vorliegt (d.h. die SCCmec-orfX-Übergangsregion, die bei den meisten der derzeit kommerziell erhältlichen MRSA-spezifischen PCR-Testsystemen als molekularer Surrogatmarker für die Anwesenheit eines mecA-Gens verwendet wird, ist in diesem Isolat also vorhanden), aber bei der das mecA-Gen großteils deletiert und daher phänotypisch nicht mehr funktionell ausgeprägt ist. Auch wenn solche mecA-Deletionsmutanten derzeit zumindest in unseren Breiten noch eher selten beobachtet werden, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher MSSA-Isolate geweckt werden, die „leere“ SCCmec-Kassetten tragen. Diese Beobachtung bestätigt erneut die Sinnhaftigkeit und auch Notwendigkeit des im Rahmen der PCR/NAT-Ringversuchsdiskussionen bereits mehrfach thematisierten begleitenden kulturellen Nachweises von MRSA.

Die Aussendung des *B. anthracis* Stamm Pasteur (positiv für das Virulenzplasmid pXO2 und die *B. anthracis*-spezi-

fischen chromosomalen Sequenzmarker *rpoB* und *dhp61*, jedoch negativ für das lethal- und edema-factor, sowie protective antigen-(*pagA*)-tragende Virulenzplasmid pXO1) in einer der 4 Proben des Ringversuchs RV 542: *Coxiella burnetii* & *B. anthracis* führte diesmal nur zu einem falsch-negativen Ergebnis innerhalb der Teilnehmerschaft. Mit der Auswahl eines etwas breiteren Spektrums von relevanten Carbapenemase-Genen bestätigte sich im Rahmen des neu eingeführten Ringversuchs **RV 544 Carbapenemase-Gene** die Vermutung, dass viele der derzeit verwendeten Testsysteme zur molekularen Carbapenem-Resistenztestung noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase-Genen aufweisen. So wurde das OXA-181-Gen in einer der Ringversuchsproben nur von ca. zwei Drittel und das IMP-14-Gen nur von einem Drittel der Teilnehmer mit ihren spezifischen Testsystemen erkannt.

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 2015

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: *Helicobacter pylori* (Probe # 1525331), *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Probe # 1525351 und Probe # 1525354), *Legionella micdadei* (Probe # 1525364), *Listeria monocytogenes* (Probe # 1525384), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1525401), *Coxiella burnetii* (Probe # 1525421), *Francisella tularensis* (Probe # 1525434), *Clostridium difficile* (Probe # 1525452), sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1525602).

Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u. a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Auswertung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

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

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten „grenzwertig positiven“ Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von „durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten“ eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: als Richtwert für die Bewertung von Ringver-

suchsergebnissen gilt das 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen). Bei den meisten Probenmaterialien der aktuellen Ringversuchsrunde stellen falsch-negative Ergebnisse damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar.

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

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

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

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

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1525301), eine Probe mit einer ca. 10-fach höheren Menge an *C. trachomatis* (# 1525304, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL), eine Probe (# 1525301) mit ca. 1×10^4 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* sowie eine Probe mit einer ca. 10-fach

höheren Menge an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1525302; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL).

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

Auch wenn die schwach positive Probe # 1525301 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 202 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* diesmal erfreulicherweise keine falsch-negativen Ergebnisse. Bei der ca. 10-fach stärker CT-positiven Probe # 1525304 des aktuellen Probensets wurden von den 202 Teilnehmern diesmal nur insgesamt ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Da hier von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei dem falschen Ergebnis vermutlich um Ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“. Der betreffende Teilnehmer führte auf seinem Ergebnisformular die Verwendung eines „other commercial tests“ an. Für die beiden *C. trachomatis*-negativen Proben # 1525301 und # 1525303 fanden sich diesmal 3 falsch-positive Ergebnisse.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die beiden positiven Proben # 1525301 und # 1525302 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^4 bzw. 1×10^5 CFU/mL) diesmal nur von zwei der insgesamt 202 Teilnehmer jeweils ein falsch-negatives Ergebnis für Gonokokken DNA mitgeteilt. Bei den beiden GO-negativen Proben wurden jedoch von 5 bzw. 2 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse berichtet. Dieser im Vergleich zu früheren Ringversuchsrunden doch überraschend hohe Anteil an falsch-positiven Ergebnissen deutet auf Kontaminationseignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung hin. Den betroffenen Laboratorien sollten diese Ergebnisse Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Angesichts der mit 1×10^4 bzw. 1×10^5 IFU/mL ehrlicherweise nicht als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in den CT-positiven Proben # 1525301 und # 1525304 sowie 1×10^4 bzw. 1×10^5 CFU/mL an Zielorganismen in den GO-positiven Proben # 1525301 und # 1525302 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern ebenfalls Anlass zur Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen NAT-gestützten Testsysteme geben.

Da die beobachteten „Sensitivitätsprobleme“ diesmal nur äußerst marginal ausfallen, sich offensichtlich nicht

auf bestimmte Testkonzepte eingrenzen lassen und sporadisch durch das ganze Portfolio der eingesetzten Testsysteme gehen, kann dem großen Rest des Teilnehmerfeldes erneut eine erfreulich gute analytische Sensitivität und Spezifität ihrer CT- und GO-spezifischen NAT-Testsysteme, sowie der angewandten Prozeduren zur Probenaufarbeitung und -prozessierung attestiert werden. Angesichts der streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen bleibt es für den Ringversuchsleiter jedes Mal aufs Neue verwunderlich, dass ein nennenswerter Anteil der teilnehmenden Laboratorien mit den betroffenen Testsystemen erfolgreich die vorgegebenen Zielwerte erreicht. Ohne denjenigen Teilnehmern, die mit bestimmten kommerziellen Testsystemen die Zielwerte nicht erreichen, zu nahe treten zu wollen, deutet dieser Umstand in diesen Fällen dann wohl eher auf individuelle Abweichungen vom Protokoll oder bestimmte Fehler bei der Probenabarbeitung, als auf intrinsische Unzulänglichkeiten, der in der Regel gut evaluierten Testsysteme hin.

Ich glaube, es ist auch für den Leser dieser Ringversuchsdiskussion weitgehend nachvollziehbar, dass wir als Organisatoren von Testkonzept- und Testplattform-übergreifenden Ringversuchen bei der Konfektionierung unserer Probenmaterialien leider nicht jede Besonderheit im Abarbeitungsprotokoll von kommerziellen Testsystemen berücksichtigen oder unterschiedliche Arten von Ringversuchssprobenmaterial 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 Ringversuchssproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen, wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden, von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden sowohl die *C. trachomatis*- als auch die *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen von allen 10 Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen erfolgreich nachgewiesen.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 202 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionseignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen dieser Ringver-

suchsauswertung in Tab. 3 (Anhang 1, S. 1) nicht zwischen dem spezifischen Nachweis von Chlamydien und Gonokokken differenziert wurde. Mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme wurden insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Um diesmal und auch zukünftig eine detaillierte Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen, haben wir zusätzlich die Tabellen 4 bis 7 (Anhang 1, S. 2-3) angefertigt. In den Tabellen 4 und 5 (Anhang 1, S. 2) sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in den Tabellen 6 und 7 (Anhang 1, S. 3) nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet.

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

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType CT (13x), HAIN Lifescience FluoroType NG (11x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (1x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (7x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (5x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (3x), Amplex Hyplex STD *Chlamydia* und *Neisseria* (2x), Urethritis basic von fast-track Diagnostics (2x), Bioron RealLine *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* (2x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae* Real-TM (2x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (2x), Seegene Anyplex™ II STI-7 Detection (2x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (2x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (1x), QIAGEN artus CT/GC QS-RGQ Kit (1x), Aptima Combo 2 assay CT/GC (1x), Elisabeth Pharmacon EliGene *Neisseria* UNI Kit (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex PCR-ELISA (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), *C. trachomatis* RG detect von Institute of Applied Biotechnologies (1x) und *N. gonorrhoeae* RG detect von Institute of Applied Biotechnologies (1x).

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

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal eine Probe mit ca. 1×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1525312), eine Probe mit ca. 1×10^5 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1525314) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen

(# 1525311 und # 1525313), 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 99 Teilnehmern bei den zwei positiven und den zwei negativen Proben überwiegend korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Bei den beiden negativen Proben # 1525311 und # 1525313, die ausschließlich nicht infizierte Humanzellen und *Escherichia coli* enthielt, sollten die falsch-positiven Ergebnisse bei den vier betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres DNA-Isolierungsprozesses bzw. des jeweiligen *Chlamydia trachomatis*-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben. Bei der anzunehmenden sequenziellen Abarbeitung der vier Einzelproben deutet diese Ergebniskonstellation diesmal eher nicht auf Kontaminationsergebnisse bei der Probenaufbereitung durch Verschleppung von positivem Probenmaterial oder Nukleinsäure aus den Proben # 1525312 oder # 1525314 hin.

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

Inhibitionskontrollen wurden von allen 99 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in-house*-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf hohem Niveau mit geringer statistischer Streuung.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (3x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (3x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (2x), AmpliSens *C. trachomatis* (1x), Sacace Biotechnologies *C. trachoma-*

tis Real-TM (1x), QIAGEN Chlamydiaceae (XII species) quantification kit (1x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (1x) und AmpliGnost *C. trachomatis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x).

RV 532: Bordetella pertussis

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1525322; *B. pertussis*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella bronchiseptica* (# 1525321 mit 1×10^5 CFU/mL), und eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella parapertussis* (# 1525324 mit 1×10^5 CFU/mL) als zum Zielorganismus verwandte Spezies. Die Probe # 1525323 enthielt diesmal keine Bordetellen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Wie schon im letzten Ringversuch bereitete der Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in der Probe # 1525322 den Teilnehmern keine allzu großen Schwierigkeiten. Bei einer Erregermenge von $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL wurden hier nur von zwei der insgesamt 146 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse berichtet. Bei einer Menge von 10^4 CFU/mL an *B. pertussis*-Zielorganismen (entspricht ca. 10^3 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ L) liegt man deutlich über den in früheren Ringversuchsrunden beobachteten unteren Nachweisgrenzen entsprechender PCR-Testsysteme.

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

Für die Proben # 1525321 und # 1525324 mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *Bordetella bronchiseptica* und *Bordetella parapertussis* wurden insgesamt 6 falsch-positive Ergebnis beobachtet und auch die nur mit *Escherichia coli* versetzte Probe #1525323 wurde von zwei Teilnehmern als positiv für *Bordetella pertussis* eingestuft. Hierbei handelt es sich offensichtlich um mangelnde analytische Spezifität der eingesetzten *B. pertussis*-spezifischen PCR/NAT-Testsysteme und, vor allem bei der Probe #1525323, um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Von den übrigen 142 der insgesamt 146 Teilnehmer wurden ausnahmslos richtig-negative Ergebnisse mitgeteilt.

Von einem Teilnehmer wurde das Ergebnis bei der positiven Probe # 1525321 als „fraglich“ klassifiziert. **Anmerkung des Ringversuchsleiters:** bei der Mitteilung von fraglichen Ergebnissen werden die entsprechenden Zertifikate nur dann erteilt, wenn diese Teilnehmer bei den übrigen 3 Proben des Ringversuchs korrekte Ergebnisse angegeben haben.

Inhibitionskontrollen wurden von 144 der insgesamt 146 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme (59 Teilnehmer) oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifizierte kommerzielle Testkits mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen (39 Teilnehmer) zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit (9x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP *B. pertussis* (4x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (2x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x), ARGENE Bordetella R-gene (3x), fast-track Diagnostics Bordetella (2x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (1x), Attomol Bordetella Realtime LT (1x), SIMPLEXA Bordetella Universal Direct Assay (1x), Meridian Bioscience illumigene Pertussis (1x), Vircell Speed-oligo Bordetella (1x), AmpliSens Bordetella multi FRT PCR Kit (1x), Labsystems Diagnostics *B. pertussis* + *B. parapertussis* Duplex Real-Time PCR (1x) und Seegene Seeplex PneumoBacter ACE Detection (1x).

RV 533: Helicobacter pylori

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit einer sehr hohen Menge an Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1525333; $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1525334; $\sim 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1525331, $\sim 10^4$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1525332), die nur humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden alle drei *H. pylori*-positiven Proben (#1525331, #1525333 und # 1525334) von allen der insgesamt 37 Teilnehmer ausnahmslos als richtig-positiv bewertet. Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Für das aktuelle Probenset wurden bei keinem der Teilnehmer falsch-positive PCR/NAT-Ergebnisse durch Kreuzreaktionen o.ä. beobachtet. Inhibitionskontrollen wurden von allen 37 Teilnehmern durchgeführt und von keinem Teilnehmer wurden Inhibitionsergebnisse bei den 4 Einzelproben 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.

Bis auf 24 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 4 x RIDA-GENE *Helicobacter pylori* von r-Biopharm angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in-house* Testsysteme.

Wie in der Testbeschreibung des RV 533 vermerkt, konnten die Teilnehmer auf freiwilliger Basis auch die vermeintliche Clarithromycin-Resistenz der untersuchten *H. pylori*-Isolate mitteilen. Diese Spezialuntersuchung zur molekularbiologischen Resistenztestung erfolgt in der Regel über die Amplifikation und Sequenzierung von charakteristischen Bereichen, innerhalb der *H. pylori* 23S rDNA bzw. der Sequenzanalyse dieses Genombereichs, mittels Hybridisierungssonden. Ergebnisse wurden hier von 34 der insgesamt 37 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines einzigen Teilnehmers waren die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

RV 534: EHEC/STEC

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei unterschiedliche, aber relativ stark EHEC-positive Proben: mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1525342: *E. coli*, *stx*_{2d}-positiv) und mit ca. 5×10^4 CFU/mL (# 1525343: *E. coli*, *stx*_{2c}- und O157-positiv) sowie eine Probe mit 5×10^5 CFU/mL eines ST- und LT-positiven ETEC-Isolats (# 1525341). Probe # 1525344 enthielt einen *E. coli*-Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ).

In diesem Ringversuch waren keine „exotischen“ Shiga-Toxin-Gene vertreten, sodass, begründet auf die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC, bei allen Proben durchwegs hohe Richtigkeitsquoten – sowohl für positive, als auch für negative Befunde – verzeichnet werden konnten. Die beiden EHEC-positiven Proben # 1525342 bzw. # 1525343 wurden von 118 bzw. 117 Teilnehmern als richtig-positiv berichtet. Eine naheliegende Erklärung für die 6 falsch-negativen Ergebnisse bei der *stx*_{2d}-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1525342 und 7 falsch-negativen Ergebnisse bei der *stx*_{2c}-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1525343 (diesmal hier vorwiegend Teilnehmer mit selbstentwickelten PCR/NAT-Testsystemen) gibt es aus Sicht der Ringversuchsauswertung nicht. Eventuell decken

die eingesetzten Testkonzepte der entsprechenden Teilnehmer nicht das gesamte zu erwartende Spektrum an „üblichen“ *stx*-1 und *stx*-2 Genen ab. Die Probe # 1525344 (*E. coli* K12 Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde diesmal von 121 der insgesamt 124 Teilnehmer korrekterweise als negativ befundet. Probe # 1525341, welche in der aktuellen Ringversuchsrunde ca. 5×10^5 CFU/mL eines ST- und LT-positiven ETEC-Isolats enthielt, wurde erfreulicherweise von nahezu allen der insgesamt 124 Teilnehmer korrekt als negativ für EHEC/STEC befundet. Von zwei bzw. drei Teilnehmern wurden die EHEC-negativen Proben # 1525341 und # 1525344 als positiv für EHEC eingestuft. Bei der ersten Probe (ETEC) handelt es sich dabei eventuell um mangelnde analytische Spezifität der eingesetzten EHEC-spezifischen PCR/NAT-Testsysteme oder (bei beiden Proben) um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Angesichts der streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen ist es auch hier etwas verwunderlich, dass der überwiegende Anteil der teilnehmenden Laboratorien mit den betroffenen Testsystemen erfolgreich die vorgegebenen Zielwerte erreicht, aber einzelne Laboratorien mit den identischen Testsystemen immer wieder aufs Neue falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse berichten. 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.

Da in den meisten der teilnehmenden Laboratorien ein NAT-gestützter Nachweis von Shiga-Toxin-Genen im Umfeld der EHEC-Diagnostik primär als Kulturbestätigungstest eingesetzt wird, werden bei zukünftigen Ringversuchen auch die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten, und der Schwerpunkt bleibt auf der Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme, und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze.

Neben *in-house* Testsystemen werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle Assays eingesetzt. In den Richtigkeitsquoten zeigte sich keine Über- bzw. Unterlegenheit eines Systems, was für die breite Etablierung PCR-/NAT-gestützter Testsysteme spricht. Inhibitionskontrollen wurden von 123 der 124 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsergebnisse wurden in keinem Fall beobachtet. Zudem wurden von 104 Teilnehmern die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt. Lediglich ein Teilnehmer berichtete hier falsche Ergebnisse.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die

Verwendung folgender Kits aufgeführt: RealStar EHEC PCR Kit von Altona diagnostic (1x), TIB Molbiol LightMix modular stx-1/stx-2/eae (2x), BD Max Enteric Panel (2x), Sacace Biotechnologies EHEC Real-TM (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), fast-track Diagnostics (1x) und Mast Isoplex VTEC (1x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Nachdem die Probenauswahl des letzten Ringversuchs mehr auf die analytische Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzielte, haben wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Prüfung der analytischen Sensitivität fokussiert. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt somit eine Probe mit einer hohen Menge an *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (# 1525353, $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL), zwei mit relativ geringer Menge (# 1525351 und # 1525354, je $\sim 1 \times 10^3$ Organismen/mL), sowie eine Probe mit einer sehr hohen Menge an *Borrelia garinii* OspA Typ 8 (# 1525352, $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL). Die Detektion von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto und *Borrelia garinii* in den Proben mit relativ hoher Erregerlast (# 1525352 mit $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL bzw. # 1525353 mit $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL) bereitete dem Großteil der Teilnehmer keinerlei Probleme, sodass für beide Proben eine hohe Quote richtig-positiver Ergebnisse erreicht wurde. Wie zu erwarten und auch im Rahmen der vorhergehenden Ringversuche stets zu beobachten war, werden mit abnehmender Erregerlast deutlich mehr falsch-negative Ergebnisse beobachtet – der Anteil an falsch-negativen Resultaten betrug bei einer Erregerlast von $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL ca. 10% und bei Erregerlasten von $\sim 1 \times 10^3$ Organismen/mL bereits an die 20%.

Aufgrund der geringen Erregeranzahl von $\sim 1 \times 10^3$ Organismen/mL in den Proben #1525351 und #1525354 und da beide Proben identische Stämme enthielten, wurden die berichteten negativen Ergebnisse diesmal nicht für beide Proben als „falsch-negativ“ gewertet.

Die Probe #1525354 mit $\sim 1 \times 10^3$ Organismen/mL (schraffiert dargestellt) wurde deshalb als „educational“ bewertet und nicht in die Bewertung einbezogen. Somit bestehen den Ringversuch alle diejenigen Teilnehmer, die beide besagten Proben falsch-negativ befundet haben – natürlich unter dem Vorbehalt, dass sie kein weiteres falsches Ergebnis innerhalb des aktuellen Probensets berichtet haben.

Allerdings sollte der aktuelle Ringversuch (und insbesondere ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe #1525352) zum Anlass genommen werden, die analytische Sensitivität des verwendeten Testsystems kritisch zu hinterfragen. Speziell sollten die Testsysteme auf die Detektionsfähigkeit für *B. burgdorferi* s.s. überprüft werden.

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von allen 111 Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse der PCR-Reaktion wurden im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie bei den vorhergehenden Ringversuchsrunden haben auch diesmal wieder ungefähr knapp die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *Borrelia*-DNA verwendet, kommerzielle Testsysteme wurden von 61 der 111 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen (Sensitivität zwischen 87 und 100%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 92%) zu beobachten. Das aktuell schlechte Abschneiden des Demeditec GenFlow Assays sollte angesichts der insgesamt nur 3 Teilnehmer in diesem Zusammenhang nicht überbewertet werden. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den 25 Teilnehmern, die insgesamt 32 falsch-negative Ergebnisse für die beiden Proben # 1525351 und # 1525354 mit relativ geringer Erregerlast berichteten, 14 davon durch *in-house* Testsysteme generiert wurden. Deshalb sollte also auch die Sensitivität der entsprechenden hauseigenen Testsysteme überprüft werden. Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (8x), HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (6x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (2x), BIORON RealLine *Borrelia* Kit (1x), ixSave *Borrelia* real time PCR kit TM von Gerbion (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), Immunodiagnostik MutaGEL *Borrelia* (1x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (1x) und Attomol *B. burgdorferi* Realtime LT (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine einzige positive Probe # 1525362, die mit einer Menge von ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila*

la-Serogruppe 2 versetzt war, Die Probe # 1525363 des aktuellen Sets enthielt ca. 10^6 CFU/mL an *Legionella micdadei* und Probe # 15253634 enthielt eine ca. hundertfach geringerer Menge an *Legionella micdadei* (10^4 CFU/mL) Die dritte für den entsprechenden Zielorganismus „negative“ Probe # 1525361 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*. Diese wurde erfreulicherweise von 103 der insgesamt 104 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Ein Teilnehmer berichtete hier ein als „fraglich“ klassifiziertes Ergebnis.

Die relativ stark positive Probe # 1525362 mit ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG2 wurde von allen 104 Teilnehmern korrekterweise als positiv interpretiert.

Die beiden mit relativ hohen Mengen an *Legionella micdadei* ($\sim 1 \times 10^6$ bzw. $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) versetzten Proben wurden von 94 bzw. von 98 Teilnehmern mit ihren *L. pneumophila*-spezifischen PCR-/NAT-Testsystemen korrekt als negativ befundet. Neun bzw. 5 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila*-DNA, was auf eine Kreuzreaktion bzw. mangelnde Speziespezifität der Zielsequenz zurückzuführen sein dürfte. Vor allem *in-house real-time* PCR-Protokolle mit ribosomalen Zielsequenzen zeigten in der Vergangenheit immer wieder Probleme bei der Speziespezifität. Bei Verwendung von nested Block-Cycler PCR-Protokollen zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und 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 63 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 43 Teilnehmern verwendet) fanden sich nicht. Inhibitionskontrollen wurden offenbar von 103 der 104 Teilnehmer durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden nicht berichtet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 43 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (9x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), Mikro-Gen Diagenode Lpn-050 Kit (6x), r-Biopharm RIDAGENE Legionella (4x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (2x), Gerbion diarella Legionella real time PCR Kit LC und TM (2x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (2x), ARGENE Legio pneumo/Cc r-gene (2x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (2x), Seegene

Seeplex PneumoBacter ACE detection (1x), GeneProof *Legionella pneumophila* PCR Kit (1x), Vircell Speed-oligo Legionella (1x) und Progenie Molecular RealCycler *M. pneumoniae* + *C. pneumoniae* + *Legionella* spp. (1x).

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1525371; *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), zwei mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1525373; *Salmonella enterica* ser. Enteritidis und # 1525372; *Salmonella enterica* ser. Grumpensis; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1525374), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Im Gegensatz zu manch früheren *Salmonella enterica* PCR/NAT-Ringversuchen war diesmal kein falsch-positives Ergebnis bei der negativen Probe # 1525374 zu beobachten. Dies deutet auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen 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.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 20 Teilnehmern nur je ein falsch-negatives Ergebnis bei zwei unterschiedlichen Proben mitgeteilt. Die Richtigkeitsquoten lagen somit annähernd bei 100%. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden für keine der Proben berichtet.

Kommerzielle Testsysteme kamen in 11 Fällen, selbstentwickelte Testsysteme in 9 Fällen zum Einsatz. Signifikante Unterschiede bezüglich Sensitivität oder Spezifität waren nicht zu erkennen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: r-biopharm RIDAGENE Bacterial Stool Panel (5x), Congen SureFood pathogen Salmonella PLUS (1x), TIB Molbiol LightMix Salmonella (1x), BD Max Enteric Panel (1x) und fast-track Diagnostics (1x).

RV 538: *Listeria* spp.

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

Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. Im aktuellen Ringversuch wurde jedoch eine Art Verdünnungsreihe von *Listeria monocytogenes* angefertigt, um primär die untere Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten Testsysteme abzuprüfen. Probe # 1525383 enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 5×10^5 CFU/mL), die auch von allen der insgesamt 32 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1525382 enthielt mit ca. 10^5 CFU/mL eine etwa fünffach 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* Probenmaterial enthielt die Probe # 1525384 diesmal eine sehr geringe Menge der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise konnte selbst diese schwach-positive Probe noch von 27 der insgesamt 32 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 (# 1525381), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs von keinem der 32 Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis beobachtet. Im Vergleich zu den vorhergegangenen Ringversuchen deutet dies auf eine kontinuierlich verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationseignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin.

Da wir uns innerhalb dieses Ringversuchsprogramms gelegentlich auch mit einzelnen Proben an die derzeit technisch machbare untere Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns dabei sehr wohl bewusst, dass bei vielen Fragestellungen das „technisch machbare“ nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem „diagnostisch sinnvollen“ ist), bestand beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostische Herausforderung in der Abprüfung der analytischen Sensitivität individueller Testkonzepte. Der möglichst selektiven Detektion bzw. differenzierten Erfassung von non-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. Von allen 32 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen

verwendet. Vermeintliche Inhibitionseignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet.

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

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

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

charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCCmec-Kassette im *S. aureus*-Genom als Zielsequenz verwenden.

Dass aber auch die SCCmec-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCCmec-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCCmec-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCCmec-Kassette vorhandene *mecA*-Gens versandt. Auch wenn wir uns im Rahmen dieser Ringversuchsserie zum Ziel gesetzt haben, primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, befand sich im aktuellen Ringversuch neben einem klassischen und unkomplizierten MRSA-Isolat auch ein derzeit noch eher selten anzutreffendes *mecC*-positives MRSA-Isolat und ein spezielles MSSA-Isolat mit *mecA*-Deletion innerhalb der SCCmec-Kassette.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1525391 eine relativ hohe Menge eines **mecC-positiven Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats** (MRSA; PVL-negativ; spa: spa:t10009; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), die Probe # 1525393 ein typisches MRSA-Patientenisolat (MRSA; PVL-negativ, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), und die Probe # 1525392 eine relativ hohe Menge eines **Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Patientenisolats mit *mecA*-Deletion innerhalb der integrierten SCCmec-Kassette (sog. *mecA* dropout Mutante)** (MSSA; PVL-negativ; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL). Die letzte der 4 Proben, # 1525394, enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der positiven MRSA Probe # 1525393 von nahezu allen der 314 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund des einen als „fraglich“ klassifizierten und der 3 falsch-negativen Ergebnisse bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden PCR-Testsysteme mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt oder es ging während der Probenaufarbeitung ein gewisser Anteil der Template-DNA bei der DNA-Isolierung oder der Komplettierung der PCR-Ansätze verloren. Angesichts der mit 1×10^5 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1525393 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus begründeten Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Bei der Probe # 1525394, die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von je einem der 314 Teilnehmer ein als „fraglich“ klassifiziertes und ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beobachtet. Hier liegt (auch angesichts der sequenziellen Folge direkt nach der MRSA-positiven Probe #1525393) das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontami-

nationseignisses oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe. Wie bereits mehrfach im Rahmen dieser ausführlichen Ringversuchsdiskussionen erwähnt, sind solche „Ausreißer“ bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion.

Die augenscheinlich „schlechte Datenlage“ bei der MRSA-positiven Probe # 1525391 ist bei näherer Betrachtung schnell erklärt. Hierbei handelt es sich um ein *S. aureus*-Patientenisolat, dessen phänotypische Oxacillin-Resistenz nicht über die Anwesenheit des „üblichen“ *mecA*-Gens sondern vielmehr über das **mecC-Gen** kodiert bzw. vermittelt wird. Hierbei handelt es sich um mittlerweile zwar mehrfach aber insgesamt jedoch noch sehr sporadisch beobachtete Oxacillin-resistente *S. aureus*-Isolate, die auf Gesamtgenomebene alle üblicherweise verwendeten *S. aureus*-Speziesmarker aufweisen, sich in der SCCmec-orfX-Region aber auf Sequenzebene von den „typischen“ MRSA-Isolaten deutlich unterscheiden und zusätzlich noch anstatt des „populären“ *mecA*-Gens ein resistenzvermittelndes *mecC*-Gen mit stark abweichender Gensequenz tragen. Bei den mit diesem *mecA*-Homolog ausgestatteten Bakterienisolaten erfolgt die Integration des *mecC*-Gens innerhalb einer neuartigen SCCmec-Genkassette vom Typ XI in das *S. aureus*-Genom (selbst auf Aminosäureebene weisen das *mecA*- und *mecC*-Genprodukt eine Homologie von weniger als 63% auf). Diese signifikanten Sequenzunterschiede führen bei allen kommerziellen oder *in-house* SCCmec-basierten PCR-Testsystemen, die nicht auf die speziellen Gensequenzen des *mecC*-Gens hin optimiert wurden, zwangsläufig zur „Nichtererkennung“ solcher *mecC*-positiven MRSA-Isolate. Das MRSA-Isolat im Probe # 1525391 konnte daher (erwartungsgemäß) nur von denjenigen Teilnehmern erkannt werden die speziell auf dieses „neue“ Methicillin-Resistenzgen abgestimmte Testsysteme in Verwendung haben.

Interessant ist hier der direkte Vergleich zum MRSA-Ringversuch vom Mai 2014: damals wurde nämlich das gleiche *mecC*-positive MRSA-Isolat ausgesandt und von insgesamt 298 Teilnehmern konnten vor Jahresfrist lediglich 59 Teilnehmer (19%) einen positiven PCR/NAT MRSA-Nachweis führen. In der aktuellen Ringversuchsrunde wurden immerhin schon von 115 der insgesamt 314 Teilnehmer (36%) korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse berichtet. Auch wenn solche *mecC*-positiven MRSA-Isolate derzeit zumindest in unseren Breiten noch sehr selten nachgewiesen werden, so soll mit der erneuten Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher *mecC*-positiven MRSA-Isolate geweckt werden. Derzeit beschränkt sich der Nachweis von *mecC*-positiven MRSA-Isolaten (methoden- oder prävalenzbedingt?) noch auf einige wenige Einzelfälle – diese diagnostische Lücke gelangt aber zunehmend in das Bewusstsein der Testhersteller einige der kommerziellen PCR/NAT-Testsys-

teme wurden bereits um eine *mecC*-Komponente erweitert.

Als weiteres „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in Probe # 1525393 eine sog. ***mecA* dropout-Mutante** ausgesandt. Bei solchen speziellen MSSA-Isolaten liegt die SCC*mec*-Kassette zwar im *S. aureus*-Genom integriert vor (d.h. die SCC*mec*-orfX Übergangsregion, die bei den meisten der derzeit kommerziell erhältlichen MRSA-spezifischen PCR-Testsystemen als molekularer Surrogatmarker für die Anwesenheit eines *mecA*-Gens verwendet wird, ist in diesem Isolat vorhanden), aber innerhalb dieser SCC*mec*-Kassette ist das Methicillin-Resistenz vermittelnde *mecA*-Gen großteils deletiert und daher phänotypisch nicht mehr funktionell ausgeprägt. Auch wenn solche *mecA*-Deletionsmutanten derzeit noch eher selten beobachtet werden, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher MSSA-Isolate geweckt werden, die „leere“ SCC*mec*-Kassetten tragen.

Auch hier ist wieder der direkte Vergleich zu einem unserer früheren MRSA-Ringversuche interessant (in diesem Fall der vom November 2012): damals wurde nämlich das gleiche *mecA* dropout MRSA-Isolat ausgesandt und von insgesamt 210 Teilnehmern konnten lediglich 63 Teilnehmer (30%) einen korrekt negativen PCR/NAT MRSA-Nachweis führen. In der aktuellen Ringversuchsrunde wurden immerhin schon von 167 der insgesamt 314 Teilnehmer (53%) korrekt negative PCR/NAT-Ergebnisse für MRSA berichtet.

Zugegebenermaßen sind sowohl die *mecC*-Resistenzgene als auch *mecA* dropout-Mutanten unter den MRSA- bzw. MSSA-Patientenisolaten noch relativ selten und die Ergebniskonstellation dieses Ringversuchs sollte den diagnostischen Wert von SCC*mec*-basierten PCR-Testkonzepten in der mikrobiologischen Praxis nicht schmälern. Ungeachtet des verwendeten Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die Probe # 1525391 und/oder ein positives Ergebnis für die Probe # 1525392 nicht als „falsch“ bewertet. Damit nun die Erteilung der entsprechenden Zertifikate für diese Ringversuchsrunde aber nicht allzu willkürlich ausfällt (denn ein Fehler unter 4 Ergebnissen wird ja laut Bewertungsschema toleriert), ist in Tab. 2 (Anhang 1, S. 12) nur eine der „besonderen“ Proben (i.e. Probe #1525392) schraffiert dargestellt. Somit bestehen den Ringversuch selbst diejenigen Teilnehmer, die schlimmstenfalls beide der edukativen Proben falsch befundet haben – natürlich unter dem Vorbehalt, dass sie kein weiteres falsches Ergebnis innerhalb des aktuellen Probensets berichtet haben.

Allerdings sollte bei dem aktuellen MRSA-Ringversuch insbesondere ein falsch-negatives Ergebnis für Probe #1525393 oder ein falsch-positives Ergebnis für Probe #1525394 zum Anlass genommen werden, die analytische Sensitivität bzw. die Kontaminationsanfälligkeit des verwendeten Testsystems kritisch zu hinterfragen.

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

Darüber hinaus bestätigen die beiden „besonderen“ MRSA- bzw. MSSA-Isolate der aktuellen Ringversuchsrunde erneut die Sinnhaftigkeit und auch Notwendigkeit des im Rahmen der PCR/NAT-Ringversuchsdiskussionen bereits mehrfach thematisierten **begleitenden kulturellen Nachweises** von MRSA.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine-Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende (PVL-negative) Ergebnisse der molekularbiologischen PVL-Testung wurden von 85 der insgesamt 314 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme von zwei falsch-positiven PVL-Ergebnissen waren diese diesmal durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA- bzw. CA-MRSA-Problematik finden sich beispielsweise in Linde und Lehn [2] oder Witte et al. [3]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR-Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in Reischl et al. [4]. Mittlerweile sind auch schon einige kommerzielle *real-time* PCR Testsysteme für den zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis von PVL-Genen bei MRSA- und MSSA-Isolaten verfügbar (z.B. von r-biopharm oder von TIB Molbiol).

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience Genotype MRSA (6x), HAIN Lifescience Genotype Staphylococcus (2x), HAIN Lifescience Genoquick MRSA (2x), Roche Cobas 4800 (2x), GeneProof MRSA PCR Kit (1x), r-biopharm RIDAGENE PVL PCR (1x), Seegene Magicplex sepsis Real-time test (1x), Amplex easyplex MRSA (1x) und Greiner Bio-One Genspeed MRSA (1x).

RV 540: Chlamydia pneumoniae

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

niae-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 13) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1525403; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ IFU/mL) und eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1525401; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL), eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL an *Mycoplasma pneumoniae* (# 1525402), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1525404), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Aus den in der Tab. 2 (Anhang 1, S. 13) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch alle Teilnehmer die Zielorganismen in der positiven Probe # 1525403 (ca. 10^6 IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Die Probe # 1525401 mit der hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (ca. 10^4 IFU/mL) wurde erfreulicherweise ebenfalls mit lediglich einer Ausnahme als „positiv“ berichtet. Da in vorausgegangenen Ringversuchen auch noch etwa zehnfach geringere Erregerlasten (ca. 10^3 IFU/mL) sicher detektiert werden konnten, sollte ein falsch-negatives Ergebnis der *C. pneumoniae*-haltigen Proben sicherlich zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und ggfs. auch die Prozessabläufe bei der Probenaufarbeitung zu hinterfragen. Für die Proben ohne Zielorganismen # 1525402 (*Mycoplasma pneumoniae*) und # 1525404 (*Escherichia coli*) ist im Vergleich zum vorausgegangenen Ringversuch die Anzahl falsch-positiver Befunde angestiegen. Während alle Labors die Probe # 1525402 als „negativ“ berichteten, fanden sich bei Probe # 1525404 3 falsch-positive und ein fragliches Ergebnis. Hierbei dürfte es sich am ehesten um eine laborinterne Kontamination bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von *E. coli* erscheinen eher als unwahrscheinlich.

Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt, lediglich ein Teilnehmer berichtete eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion in der „negativen“ Probe # 1525404. Selbstentwickelte *in-house* NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 43 Labors eingesetzt, kommerzielle Assays wurden von 76 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.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 12 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 9 Teilnehmern der

Diagenode MP/CP Kit und von 7 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit angegeben.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (9x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac community acquired Pneumonia Kit (1x), GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (7x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (6x), Seegene Pneumobacter ACE detection (1x), Seegene Anyplex RB5 detection (1x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (1x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (1x), Immundiagnostik MutaPLATE *C. pneumoniae* (1x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (2x), Euroclone Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit (2x), AmpliSens *M. pneumoniae*/C. pneumoniae (2x), r-Biopharm RIDAGENE *C. pneumoniae* (1x) und Labsystems Diagnostics *C. pneumoniae* + *M. pneumoniae* Duplex Real-Time PCR (1x).

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal nur eine positive Probe: # 1525411 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*Mycoplasma pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL). Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielten Probe # 1525414 (*Mycoplasma genitalium*; $\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL) und Probe # 1525413 (*Mycoplasma salivarium*; $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) diesmal nennenswerte Mengen an DNA von dem Zielorganismus verwandter Mykoplasmen-Spezies. Probe # 1525412 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Mit einer Ausnahme konnten die 133 Teilnehmer die DNA von *M. pneumoniae* in Probe # 1525411 zuverlässig nachweisen. Für die zwei „negativen“ mit verwandten Mykoplasmen-Spezies (# 1525413 und # 1525414) versetzten Proben wurden 4 bzw. 8 falsch-positive Ergebnisse berichtet. Bei den falsch-positiven Ergebnissen könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Eventuelle Kreuzreaktivitäten der *M. pneumoniae*-spezi-

fischen PCR-Testsysteme mit DNA von anderen Mykoplasmen-Spezies sollten von den betroffenen Teilnehmern abgeprüft und die entsprechenden Testkonzepte ggf. nachgebessert werden. Die dritte „negative“ Probe (# 1525412) enthielt lediglich *E. coli* und wurde von 130 der 133 Teilnehmer korrekt als „negativ“ gewertet. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, für keine der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsereignisse berichtet. Selbstentwickelte PCR-/NAT-Testsysteme kamen bei 49 Teilnehmern zum Einsatz, während 84 Teilnehmer kommerzielle Testsysteme verwendeten. Die Richtigkeitsquoten lagen bei *in-house* und vorkonfektionierten Assays auf vergleichbarem Niveau. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (8x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (6x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (4x), Seegene PneumoBacter ACE detection (3x), r-Biopharm RIDAGENE *M. pneumoniae* (3x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (2x), AmpliSens *M. pneumoniae*/C. pneumoniae-FEP PCR Kit (2x), Euroclone Duplica Real Time *M. pneumoniae* Detection Kit (2x), Immundiagnostik MutaREAL *M. pneumoniae* (1x), Sartorius Microart AMP Mycoplasma (1x), Labsystems Diagnostics *C. pneumoniae* + *M. pneumoniae* Duplex Real-Time PCR (1x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (1x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (1x), fast-track Diagnostics Real Time PCR (2x) und fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 21 (2x).

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

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Coxiella burnetii* ($\sim 5 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1525421 und $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1525422), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* „Pasteur“-Isolats ($\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL in Probe # 1525424), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* UR-1-Isolats ($\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1525422) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1525423), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Der Übersichtlichkeit halber haben wir uns bei diesem kombinierten Ringversuch entschlossen, die Ergebnislage für die beiden unterschiedlichen Erreger auch in zwei getrennten Tabellen darzustellen: für *Coxiella burnetii* in

den Tabellen 2 und 3 (Anhang 1, S. 15) sowie für *Bacillus anthracis* in den Tabellen 4 und 5 (Anhang 1, S. 16). Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Sacace Biotechnologies *C. burnetii* Real-TM (1x), Altona diagnostics RealStar Anthrax PCR Kit (1x), Applied Biosystems *B. anthracis* (1x) und Liferiver *C. burnetii* real time PCR Kit (1x). ***Coxiella burnetii***: Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich einfach. Sowohl die etwas stärker positive Probe # 1525422 mit ca. 5×10^4 Genomkopien *C. burnetii*/mL als auch die zweite positive Probe # 1525421 des Probesets (ca. 5×10^3 Genomkopien/mL) wurden von allen der insgesamt 30 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Diese Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus den vorherigen Ringversuchen. Bei der Probe ohne Zielorganismus # 1525423 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie der zweiten „negativen“ Probe # 1525424, welche ca. 1×10^6 Genomkopien/mL *Bacillus anthracis* „Stamm Pasteur“ DNA enthielt, wurden ebenfalls durchwegs korrekt negative Ergebnisse berichtet. Mit 27 diagnostischen Labors, welche *in-house* Testsysteme zum spezifischen Nachweis von *C. burnetii* verwenden, waren die selbstentwickelten Assays den vorkonfektionierten kommerziellen Testkits zahlenmäßig überlegen. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA der Teilnehmer enthielten mit einer Ausnahme eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Bacillus anthracis: Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Alle 19 Teilnehmer konnten mit ihren jeweils vor Ort etablierten *B. anthracis*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die „negative“ Probe # 1525421 korrekt identifizieren, gleiches gilt für die zweite negative Probe # 1525423. Von 18 der 19 Teilnehmern wurde die Probe # 1525422 (*B. anthracis* Stamm UR-1, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL und *C. burnetii* $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL) korrekt als positiv bewertet, zudem wurde ein fragliches Ergebnis eingereicht. Aufgrund der nicht geringen Mengen des Zielorganismus im Probenmaterial sollte ein fragliches Ergebnis unbedingt zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und gegebenenfalls die laborinternen Abläufe der Probenaufarbeitung zu prüfen. Die zweite „positive“ Probe (# 1525424) enthielt den ***B. anthracis* Stamm Pasteur**: dieser ist zwar **positiv für das Virulenzplasmid pX02 und die *B. anthracis*-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker *rpoB* und *dhp61***, jedoch (im Gegensatz zum Stamm UR-1) **negativ für das „lethal- und edema-factor, sowie protective antigen-(*pagA*)“**–tragende **Virulenzplasmid pX01**. 18 der 19 Teilnehmer berichteten für diese Probe korrekt positive Befunde. Der Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis sollte den Ringversuch

zum Anlass nehmen, die Performance der verwendeten Testsysteme sowie die laborinternen Prozessabläufe zu evaluieren.

Wie immer stehen nach erfolgreichem Abschluss der aktuellen Ringversuchsrunde den Kolleginnen und Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen für *C. burnetii*-DNA und *B. anthracis*-DNA interessiert sind, mit den Proben dieses Ringversuchs auch gewissermaßen „standardisierte Rückstellproben“ zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

RV 543: *Francisella tularensis*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 17) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1525431 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*Francisella tularensis* spp. *novicida*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1525432 mit ca. zehnfach geringerer Menge (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1525434 mit ca. $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL an *F. tularensis* spp. *novicida*. Im Ringversuchssprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1525433), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier alle der 17 Teilnehmer die relativ stark positiven Proben # 1525431 (*F. tularensis* spp. *novicida*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und # 1525432 (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) als positiv identifiziert. Die Probe mit der geringsten Erregermenge ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) konnte noch von 15 der 17 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die zwei falsch-negativen Bewertungen sollten Anlass geben, das verwendete Testsystem bzgl. Sensitivität zu evaluieren und gegebenenfalls zu optimieren.

Die *F. tularensis*-negative Probe # 1525433 wurde von allen Teilnehmern erfreulicherweise durchgehend als negativ befundet. Die gesamte Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorherigen Ringversuchen und spricht erneut für ein gutes Funktionieren sowohl der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme, als auch der implementierten laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *F. tularensis*-DNA der Teilnehmer enthielten mit einer Ausnahme eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesand-

ten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionseignisse beobachtet.

RV 544: Carbapenemase-Gene

Der seit 2015 in das reguläre Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommene Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Carbapenemase-Gene“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zur molekularen Resistenztestung bzw. dem Direktnachweis von charakteristischen Carbapenemase-Genen aus DNA-Präparationen von Reinkulturen an Enterobacteriaceae** konzipiert. Zum orientierenden Herantasten an die technische Eignung und die „Praktikabilität“ der versandten Probenmaterialien werden wir uns in den ersten Runden dieses methodisch anspruchsvollen Ringversuchs zur molekularen Resistenztestung auf die Abprüfung eines kleinen Spektrums der derzeit häufigsten Carbapenemase-Gene bei *Enterobacteriaceae* beschränken: KPC, VIM, OXA-48 ähnliche Gene, GES-Carbapenemasen, NDM, IMP und GIM.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 18) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set vier Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1525441 enthielt *Serratia marcescens*-Zielorganismen mit dem OXA-48 Gen (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL), Probe # 1525442 enthielt *Escherichia coli*-Zielorganismen mit den Genen für NDM-5 und OXA-181 (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL), Probe # 1525443 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit den Genen für KPC-2 und VIM-1 (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL), und Probe # 1525444 enthielt ein *Enterobacter cloacae*-Complex-Isolat mit dem IMP-14 Gen (ca. 1×10^6 Genomkopien/mL).

Alle Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in der Probe # 1525441 (*Serratia marcescens* mit OXA-48 Gen) fest. Für die Probe # 1525443 berichteten 49 der 50 Teilnehmer ein positives Ergebnis (*Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit den Genen für KPC-2 und VIM-1), ein Teilnehmer berichtete ein negatives Ergebnis für VIM-1. Spannender war die Auswertung der Probe # 1525422, welche *Escherichia coli*-Zielorganismen mit den Genen für NDM-5 und OXA-181 enthielt. 39 Teilnehmer berichteten ein korrekt positives Ergebnis für das Vorliegen beider Gene. Die verbleibenden 11 Teilnehmer „verpassten“ entweder OXA-181 (10x) oder NDM-5 (1x). Es ist bekannt, dass einige OXA-48 ähnliche Carbapenemasen wie OXA-181 und OXA-232 in einigen kommerziellen Testsystemen nicht erkannt werden. **Da diese OXA-48 Varianten jedoch aktuell vermehrt nach Europa importiert werden, sollte sich jeder Nutzer im Klaren darüber sein, ob der im Labor verwendete molekulare Test solche OXA-48 Varianten detektieren kann oder nicht.** Die Lücken in der Abdeckung in der molekularen Testung auf Carbapenemasen zeigten sich eindrucksvoll an Probe # 1525444. Nur 14 Laboratorien berichteten hier richtig positive Ergebnisse und detektierten das IMP-14 Gen in dem ausgesandten *Enterobacter cloacae*-Complex-Isolat. Betalaktamase-Gene aus der IMP-Familie

stellen für NAT-Testsysteme wegen der großen Heterogenität der zahlreichen IMP-Varianten eine Herausforderung dar. In Deutschland sind Carbapenemasen vom Typ IMP, erst recht die Carbapenemase IMP-14, sehr selten. Ein falsch-negatives Ergebnis sollte Anlass geben, einerseits die „Coverage“ des verwendeten Carbapenemase-Assays zu evaluieren und sich andererseits möglicher Lücken bewusst zu sein.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Direktnachweis von Carbapenemase-Genen aller Teilnehmer enthielten jeweils eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionseignisse beobachtet. Selbstentwickelte *in-house* NAT-Testsysteme zur Detektion von Carbapenemase-Genen wurden von 17 der insgesamt 50 teilnehmenden Laboratorien eingesetzt, alle anderen Labors verwendeten kommerzielle Testkonzepte. 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. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkit aufgeführt: Cepheid GeneXpert Carba-R (16x).

RV 545: *Clostridium difficile*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 19) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben drei positive Proben: Probe # 1525451 und # 1525453 mit einer relativ hohen Menge an *Clostridium difficile*, ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL und $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), Probe # 1525452 mit ca. zehnfach geringerer Menge ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1525454), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden „hochpositiven“ *Clostridium difficile*-Proben # 1525451 und # 1525453 wurden erfreulicherweise von 82 bzw. 83 der 85 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ klassifiziert. Falsch-negative Ergebnisse sollten auch hier zum Anlass genommen werden, das verwendete Testsystem bzgl. analytischer Sensitivität und Spezifität zu evaluieren und auch die laborinternen Prozesse der Probenaufbereitung und -abarbeitung kritisch zu hinterfragen. Letzteres gilt insbesondere für Teilneh-

mer mit falsch-positiven Ergebnissen für die lediglich *E. coli*-enthaltende Probe # 1525454. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich. Probe # 1525452 enthielt mit $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL die geringste Menge des Zielorganismus und wurde von 79 Teilnehmern korrekt als positiv berichtet, leider wurden auch 5 falsch-negative Ergebnisse eingereicht. Hier sollte ggfs. die analytische Sensitivität des Testsystems hinterfragt werden. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionseignisse wurden für keine der Proben berichtet. Wie in Tab. 3 (Anhang 1, S. 19) angegeben, verwendeten der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme, während selbstentwickelte Testkonzepte in 12 Laboratorien zum Einsatz kam. In dieser Ringversuchsrunde zeigten sich (vergleichbar mit der vorausgegangenen) zwischen den kommerziellen Testsystemen und den Eigenentwicklungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität. Für eine verlässlichere Beurteilung sollten jedoch die folgenden Ringversuchsrunden abgewartet werden.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: r-Biopharm RIDAGENE CD Toxin A/B (15x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (3x), Altona diagnostic RealStar *C. difficile* PCR Kit (6x), HAIN Lifescience GenoType CDiff (5x), HAIN Lifescience FluoroType CDiff (1x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (2x), Meridian Bioscience illumigene *C. difficile* (1x), fast-track Diagnostics *C. difficile* (1x), Abacus Diagnostica GenomEra *C. difficile* (1x) und Greiner Bio-One Genspeed *C. difficile* (1x).

RV 546: VRE

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 20) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1525462 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecium* van B resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1525463 mit ca. gleicher Menge (*Enterococcus faecium* van A resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1525461 mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *Enterococcus faecalis*. Im Ringversuchssprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1525464), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden „positiven“ Proben # 1525462 und # 1525463 (je ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) mit vanA bzw. vanB tragenden Enterokokken mit lediglich einer Ausnahme von allen Teilnehmern als „VRE-positiv“ klassifiziert. Wie bereits im vorangegangenen Ringversuch waren alle eingereichten vanA/vanB Differenzierungen korrekt. Auch die beiden „negativen“ Proben # 1525461 und # 1525464 mit *E. coli* waren durchwegs als „VRE-negativ“ berichtet worden. Bei den eingesetzten Testsystemen hielten sich kommerziell erhältliche, vorkonfektionierte Systeme und Eigenentwicklungen in etwa die Waage. Bezüglich analytischer Sensitivität und Spezifität waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen, wenngleich einschränkend angemerkt werden muss, dass für eine verlässlichere Beurteilung weitere Ringversuchsrunden abgewartet werden sollten. Insgesamt war die Ergebnislage dieser Probenaussendung jedoch sehr erfreulich.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: HAIN Lifescience GenoType Enterococcus (9x), GeneProof VRE PCR Kit (1x) und Seegene Magicplex Sepsis Real-time test (1x).

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Dieser im Jahr 2013 neu in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch RV 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis von *Pneumocystis jirovecii*-DNA** in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set drei positive Proben (siehe Tab. 1, Anhang 1, S. 21): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1525601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 5×10^5 Organismen/mL), eine Probe mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1525604; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 5×10^4 Organismen/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1525602; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 5×10^3 Organismen/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1525603) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Die „negative“ Probe # 1525603 wurde von nahezu allen Teilnehmern korrekt als negativ für den Zielorganismus gewertet, lediglich 2 fragliche Ergebnisse wurden berichtet. Die betroffenen Teilnehmer sollten ggfs. die laborinterne Testdurchführung und die Performance des verwendeten Testsystems überprüfen. Im Vergleich zur vorausgegangenen Ringversuchsrunde kann jedoch insgesamt ein erfreulicher Rückgang falsch-positiver oder fraglicher Befunde festgestellt werden. Bei den „positiven“ Proben wurde Probe # 1525601 mit $\sim 5 \times 10^5$ Organismen/mL

von 90 der 91 Teilnehmer richtig klassifiziert. Die schwächer positive Probe # 1525604 (ca. 5×10^4 Organismen/mL) wurde noch von 86 Teilnehmern korrekt als „positiv“ gewertet, 5 Labors berichteten falsch-negative Ergebnisse. Wie bereits in der vorausgegangenen Ringversuchsrunde muss hier angemerkt werden, dass 10^4 Organismen/mL nicht gerade als „äußerst geringe“ Menge gelten und durchaus mit adäquaten Testsystemen und Arbeitsabläufen detektierbar sind. Leider ist hier (im Vergleich zum vorhergehenden Ringversuch) bislang keine Steigerung der Performance zu sehen. Die Probe mit der geringsten Menge an Zielorganismen (# 1525602, 5×10^3 Organismen/mL) konnte noch von 58 der 91 teilnehmenden Labors als „positiv“ erkannt werden. Neben 29 falsch-negativen Ergebnissen wurden auch 4 „fragliche“ Befunde übermittelt. Inhibitionskontrollen wurden von allen 91 Teilnehmern durchgeführt, lediglich 2 Inhibitionsergebnisse der „negativen“ Probe (# 1525603) wurden berichtet.

In-house PCR Assays wurden von 38 Teilnehmern eingesetzt, bei den kommerziellen Testsystemen waren r-Biopharm RIDAGENE *Pneumocystis jirovecii* (21x), TIB Mol-Biol LightMix *Pneumocystis jirovecii* (9x) sowie AmpliGnost *Pneumocystis jirovecii* PCR Kit (9x) die drei am häufigsten verwendeten.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Diagnostics *Pneumocystis jirovecii* (2x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (1x), Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (2x) and Liferiver *P. carinii* real time PCR Kit (1x).

Danksagung

Wie gehabt möchten wir uns an dieser Stelle recht herzlich bei allen Kollegen in den zahlreichen nationalen und internationalen Sollwertlaboratorien sowie bei den Kollegen und Mitarbeitern in Jena, Salzburg, Hamburg, 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/2015-6/lab000020.shtml>

1. Anhang1_lab000020.pdf (404 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ November 2015

Literatur

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

Korrespondenzadresse:

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

Bitte zitieren als

Reischl U, Schneider W, Ehrenschröder M, Hiergeist A, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Splettstößer W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2015 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2015;6:Doc05. DOI: 10.3205/lab000020, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000201

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2015-6/lab000020.shtml>

Veröffentlicht: 22.12.2015

Copyright

©2015 Reischl et al. Dieser Artikel ist ein Open-Access-Artikel und steht unter den Lizenzbedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 License (Namensnennung). Lizenz-Angaben siehe <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: discussion of the November 2015 distribution for external quality assessment of nucleic acid-based protocols in diagnostic medical microbiology by INSTAND e.V.

Abstract

This contribution provides a report on 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.

This highly requested scheme for external quality assessment (EQAS) of molecular diagnostic methods in the field of medical microbiology was launched 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 version.

Udo Reischl¹
Wulf Schneider¹
Martin Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
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 2015

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

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

The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *C. trachomatis* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL in sample # 1525301 and $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL in sample # 1525304) and two samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms ($\sim 10^5$ CFU/mL in sample # 1525302 and $\sim 10^4$ CFU/mL in sample # 1525301). Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target cells in the positive samples # 1525301 and # 1525304, only 1 false-negative result was observed among the *Chlamydia trachomatis*-specific results, reported by the 202 participants. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by only 2 of the 202 participants for samples # 1525301 and # 1525302, which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of 1×10^5 CFU/mL and 1×10^4 CFU/mL respectively. Also 7 false-positive results for the two GO-negative samples were reported by participants.

Since the amount of target organisms in CT-positive samples # 1525301, # 1525304, and NG-positive samples # 1525301 and # 1525302 could not be considered as “extremely low”, false negative results should encourage the participants to review and optimize their CT- and GO-specific NAT-based assays. Inhibition controls were included by all of the 202 participants and no inhib-

itory events were reported. Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity were observed for the *C. trachomatis*- and *N. gonorrhoeae*-specific NAT assays used by the 202 participants

Tables 4 to 7 (Attachment 1, p. 2-3) were include 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 two positive samples: # 1525312 with $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms and sample # 1525314 with $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Samples # 1525311 and # 1525313 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 4), the reported results were generally correct for the two positive samples.

For the *C. trachomatis*-negative samples # 1525311 and # 1525313 containing only non-infectious human cells and *E. coli*, 4 false-positive results and 2 false-negative results were observed among the 99 participants.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the “negative” sample 1 by target organism or PCR products of the positive samples “2” or “4” is unlikely in the current sample constellation. So false positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system.

This striking match of the current results with observations and accuracy rates in the last years can be considered as an evidence for a high reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing. Run controls were performed by all of the 99 participants and inhibition events were not observed this time. In this context, it should be noted, that we have not added putative inhibitory substances into the samples of the current distribution.

Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity were observed for the *C. trachomatis*-specific NAT assays used by the 99 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1525322; 1×10^4 CFU/mL), and three samples negative for the respective target organism: one negative sample containing *Bordetella parapertussis* (# 1525324; 1×10^5 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella bronchiseptica* (# 1525321 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), as well as one sample containing only human cells and *Escherichia coli* (# 1525323).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. Nearly all of the 146 participants reported correct positive results for the sample # 1525322 (*B. pertussis*, 1×10^4 CFU/mL). Two of the participating laboratories observed false-negative results for *B. pertussis* DNA in sample # 1525322. The amount of 10^4 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms is significantly above the previously observed lower limit of detection for the corresponding PCR/NAT assays or test systems. False-negative or questionable results should therefore lead to re-evaluations of the assay sensitivity.

Samples # 1525321 and # 1525324 which contained $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*, respectively, were correctly tested negative by 142 of the 146 participants but 6 of the participating laboratories observed false-positive results for *B. pertussis* DNA. Sample # 1525323 contained only *E. coli*. All but two participants correctly reported this sample as negative for *Bordetella pertussis*. The false-positivity issue is probably due to contamination events in the course of sample preparation or low analytical specificity of the used PCR/NAT test systems. For sample # 1525311, one result was classified as “questionable” by one participant. For questionable results, certificates are only issued when correct results are reported by the participant for the remaining 3 samples of RV 532.

For the detection of *B. pertussis*, most participants used self-developed (in-house) test systems with inhibition and/or positive controls. Therefore, 57 participating laboratories used IS481 insertion sequence, 8 the pertussis toxin coding gene and 2 ribosomal genes. Run controls were performed by 144 of 146 participants and no inhibition events were observed with the samples of the current distribution.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained three samples with a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study in a kind of dilution series. Sample # 1525333 contained approximately 1×10^5 CFU/mL, sample

1525334 approximately 1×10^5 CFU/mL and sample # 1525331 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 three *Helicobacter pylori*-positive samples (#1525331: $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL, #1525333: $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL, and # 1525334: $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) led to positive predictive values of 100%. Also for the *Helicobacter pylori*-negative sample #1525332 correctly negative PCR/NAT-results were reported by all the participating laboratories.

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 34 of the 37 participants. With one exception, the results were correct.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed previously, the challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenic factors (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1525343 (*E. coli*, 5×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*_{2c}-positive, *eae*-positive, *hlyA*-positive and O157-positive) and # 1525342 (*Escherichia coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*_{2d}-positive). The other two EHEC-negative samples contained an ETEC strain (sample # 1525341; 5×10^5 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1525344).

All but 3 participants correctly reported negative results for sample # 1525344, containing only *E. coli* K12. The other “EHEC-negative” sample (#1525341), containing a significant amount of an LT- and ST-positive ETEC isolate was also reported PCR-negative by all but two participants. For the EHEC/STEC positive samples # 1525342 and 1525343, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in consistently high accuracy rates. Sample # 1525342 was correctly reported positive by 118 of the 124 participants and 117 of the 124 participants detected the target organisms in the EHEC/STEC-positive sample # 1525343 correctly.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained. Partial or complete shiga toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 104 of the 124 participating laboratories.

With one exception, the reported results were correct. None of the participants observed significant inhibition of the NAT-reaction.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

The current set of QC samples contained three samples with *B. burgdorferi* sensu stricto organisms in our proprietary matrix: sample # 1525353 (1×10^4 genome equivalents/mL) and samples # 1525351 and # 1525354 (1×10^3 genome equivalents/mL). Sample # 1525352 contained about 1×10^5 genome equivalents/mL of *Borrelia garinii* OspA type 8 organisms.

With the exception of 15 and 17 false-negative results for samples # 1525351 and # 1525354 (containing a relatively low amount of 1×10^3 organisms/mL of *Borrelia* target organisms), one false-negative result for sample # 1525352 (1×10^5 organisms/mL) and 7 false-negative results for sample # 1525353 (1×10^4 organisms/mL) all participants reported correct results for the four positive samples. Regarding the low amount for samples # 1525351 and # 1525354 and the use of identical strains, the sample # 1525354 was set as an educational sample and not included in the evaluation. The false-negative results should prompt re-evaluation of the assay sensitivity.

Approximately half of the participating laboratories used self-developed (in-house) tests with inhibition and/or positive controls. None of the participants noted significant inhibition of the NAT-reaction. There were also no significant differences in test performance between commercially available kits and in-house assays for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

RV 536: *Legionella pneumophila*

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

serogroup 2 (# 1525362; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) next to two samples containing *Legionella micdadei* (# 1525363; $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL and # 1525364; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Sample # 1525361 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) sample # 1525362 was correctly tested positive by all of the 104 participating laboratories. Both of the *L. micdadei*-positive samples (# 1525363 with $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL and # 1525364 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) were correctly tested negative by 94 and 98 participating laboratories, respectively. Sample # 1525361, which contained only *E. coli*, was classified as “questionable” by one participant and the remaining 103 participants reported correct negative PCR/NAT results for *L. pneumophila* DNA. All but one participant included inhibition controls in their test systems. Only one inhibition of the PCR-/NAT-reactions was reported for sample 1525363.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained two samples with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (sample # 1525371 with 5×10^5 CFU/mL, and sample # 1525373 with 5×10^4 CFU/mL). Sample # 1525372 contained *Salmonella enterica* serovar Grumpensis (with 5×10^4 CFU/mL) and sample # 1525374 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. All participants reported correct results for samples #1525371 and #1525374. Sample #1525372, containing $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL *Salmonella enterica* serovar Grumpensis, as well as sample #1525373, containing $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL *Salmonella enterica* serovar Enteritidis was correctly identified as “positive” by 19 of the 20 participants. Reporting a false-negative result for this sample should prompt a thorough re-evaluation of the performance of the test system. Inhibitory events in the PCR-/NAT-reaction were not detected by any of the participants.

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1525381; only *E. coli* cells), and three samples positive for *L. monocytogenes* (# 1525382, # 1525383 and # 1525384). The *Listeria monocytogenes*-containing samples (# 1525382 with 1×10^5 CFU/mL of *L. monocytogenes* and # 1525383 with 5×10^5 CFU/mL of *L. monocytogenes*) were correctly reported positive by all participants. In addition, the “negative” *E. coli* containing sample # 1525381 was also identified as negative by all laboratories. Most of the participants used very sensitive *Listeria monocytogenes*-specific assays, which is reflected by the high number of correctly positive results for sample # 1525384, containing only 1×10^3 CFU/mL of *L. monocytogenes*.

It should be noted that participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT-assays may indicate the corres-

ponding results by the accessory code number 71. In this case, (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species do not negatively affect issuing the corresponding QC certificates. In sum, the current results indicate a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

RV 539: MRSA

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

Sample # 1525391 of the current set contained a relatively high number of a **mecC-positive and methicillin-resistant** *S. aureus* isolate (MRSA, PVL-negative, spa:t10009; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1525393 contained a typical MRSA isolate (MRSA, PVL-negative; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1525392 of the current set contained relatively high amounts of a **mecA dropout** MSSA isolate and only *E. coli* and human cells were present in sample # 1525394 of the current distribution. The MRSA-negative sample # 1525394 was correctly reported negative by 307 of the 314 participants. Only one participant reported a false-positive result, presumably due to intra-laboratory contamination events from the highly positive sample # 1525393 during the sample preparation, amplification or detection. The MRSA-positive sample # 1525393 was correctly reported positive by 310 of the 314 participants. Three false-negative results were reported for MRSA sample # 1525393 and one participant classified his/her result as "questionable". Affected participants are encouraged to analyse and optimize their NAT-based assays, because the amount of MRSA target organisms in sample # 1525393 (1×10^5 CFU/mL) was not abnormally low.

The apparently "bad" performances for the MRSA-positive sample # 1525391 and for the MRSA-negative sample # 1525392 are quickly explained on closer inspection. Sample # 1525391 contained a **mecC-positive *S. aureus*** isolate which was correctly detected and classified as MRSA only by 115 of the 314 participants.

Sample # 1525392 contained one of the yet still relatively rare *S. aureus* strains, that belongs to the group of so-called **mecA dropout MSSA** isolates: Oxacillin sensitive *S. aureus* strains which contain the MRSA-typical SCCmec cassette, but significant parts or the entire *mecA* gene are deleted on genomic level. Consequently only 167 of the 314 participants reported correct negative MRSA results for this tricky sample. Compared to the some

previous rounds of PCR/NAT external quality assessment, a much better diagnostic performance was observed for these variant *S. aureus* genetic constellations. The *mecC*-positive *S. aureus* isolate, sent out formerly in the May 2014 distribution, was detected by 19% of the participants at that time whereas 36% of participants reported correctly MRSA positive results in the current distribution. The *mecA* dropout variant, sent out formerly in the November 2012 distribution, was detected by 30% of the participants at that time whereas 53% of participants reported correctly MRSA negative results in the current distribution.

This situation nicely reflects the various (and obviously successful) efforts of diagnostic companies and in-house assay development teams to continuously improve and adopt their protocols to the current challenges of direct PCR/NAT testing for MRSA.

Also, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor PVL (Panton-Valentine Leukocidin) or its coding gene *lukF/S-PV* was inquired. Corresponding results were reported by 85 of the 314 participating laboratories and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were correct in all but two cases. Additional information can be found at Linde and Lehn [2] or Witte et al. [3]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at Reischl et al. [4].

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

RV 540: Chlamydia pneumoniae

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

The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1525403 was spiked with $\sim 1 \times 10^6$ IFU/mL of *C. pneumoniae*, whereas sample # 1525401 contained an approximately hundred fold lower amount of *C. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL). Sample # 1525402 contained significant numbers of *Mycoplasma pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL). Only *E. coli* and human cells were present in sample # 1525404.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 13), with one exception all participants reported correct results for the

positive samples # 1525401 and # 1525403. For the “negative” sample 1525402, containing *Mycoplasma pneumoniae*, all laboratories reports correct negative results. However, for the second “negative” sample # 1525404 (containing *E. coli*), we received 3 false-positive and 1 questionable report. Most probably, this is due to (cross-)contamination during sample processing and extraction, as cross-reactivity of NAT/PCR-based assays specific for *Chlamydia pneumoniae* with *Escherichia coli* is unlikely. Certainly, a false-positive result should prompt investigations and improvement of the diagnostic workflow.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

The current set of QC samples contained only one positive sample. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL) was present in sample # 1525411.

Samples # 1525414 and # 1525413 were designed to monitor assay specificity: they contained a considerable amount of *M. genitalium* ($\sim 10^5$ genome copies/mL) and *M. salivarium* ($\sim 10^5$ genome copies/mL) respectively, as a related species to the target organism. The set was completed by sample # 1525412, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

With the exception of one laboratory, all 133 participants correctly reported sample # 1525411 as positive. The *Mycoplasma salivarium* (# 1525413) and *Mycoplasma genitalium* (# 1525414) containing samples were correctly reported “negative” by 129 and 125 of the 133 participants, respectively. The false-positive results in these cases may indicate lacking species-specificity of the test systems and trigger further investigations. Additionally, “the negative” sample # 1525412, containing *E. coli*, was wrongly reported positive by 3 of the 133 participants. As a (cross-) contamination is the most probable explanation for a false-positive result in this sample, the diagnostic workflow should be re-assessed.

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

The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *Coxiella burnetii* organisms ($\sim 5 \times 10^3$ genome copies/mL in sample # 1525421 and $\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1525422), one sample with $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL of *Bacillus anthracis* (sample # 1525422) and one sample with $\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL of a *Bacillus anthracis* **Pasteur Strain** (sample # 1525424). Sample # 1525423 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 (5×10^4 genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1525422 was correctly reported by all participants, as well as the ten-fold lower concentration of the pathogen in sample #1525421. The two “negative” samples (#1525423 contained only *E. coli* and #1525424 contained only *B. anthracis*) were correctly reported negative by all participants. Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good correlation with the expected results was observed.

***Bacillus anthracis*:** The results for this newly introduced EQAS scheme are easily discussed. All participants correctly reported negative results for the samples # 1525421 and # 1525423 which did not contain the target organism. The “positive” sample # 1525422 containing $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL was correctly reported by 18 of the 19 participants. Additionally, we received one questionable result, which should definitely prompt investigations regarding sample workup and performance of the test system used by the reporting laboratory, as the amount of the target organism in the sample was pretty high.

With the exception of one participant, the second positive sample # 1525424 ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL of *B. anthracis* strain “Pasteur”) was correctly reported. This particular strain is positive for the virulence plasmid pX02

and the *B. anthracis*-specific markers *rpoB* and *dhp61*, but does not harbor “lethal and edema factor” encoding plasmid pXO1 and is therefore also negative for the commonly used pathogenicity marker *pagA*.

After this successful round of external quality assessment, “standardized samples” are again available for colleagues who are interested in obtaining *B. anthracis* DNA-positive material for assay validation purposes. Requests for backup samples should be addressed to the EQAS coordinator (U. Reischl).

RV 543: *Francisella tularensis*

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 *novicida* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1525431, an approximately hundred lower amount ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) was present in sample # 1525434, and a relative high amount of *Francisella tularensis* spp *holarctica* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1525432.

Similar to QC samples from past distributions, the positive sample # 1525431 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Francisella tularensis novicida*) and # 1525432 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *Francisella tularensis holarctica*) were correctly tested positive by all of the 17 participating laboratories. Even with pathogen amounts of $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL (sample #1525434) 15 out of 17 labs were able to detect *Francisella* DNA. As no false-positive result was observed for the “negative” sample # 1525433 – it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions measures to prevent deleterious contamination events. Overall, these results corroborate the lower limits of detection observed in our previous EQAS distributions. Although the number of participating laboratories is still not very high, the results of the present distribution indicate that the lower limit of detection is about or slightly below 10^4 organisms/mL when using currently employed and well evaluated PCR/NAT-based assay concepts for the detection of *F. tularensis* DNA.

RV 544: Carbapenemase genes

The concept of this novel EQAS-panel for the detection of carbapenemase genes is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for molecular resistance testing or the direct detection of carbapenemase genes from DNA preparations of Enterobacteriaceae culture isolates. Because of the methodologic-

ally challenging design of EQAs for the molecular resistance testing of the wide range of known carbapenemase coding genes in different bacteria, the panel is narrowed down to a small selection of the currently most common carbapenemase genes in Enterobacteriaceae: KPC, VIM, OXA-48 like genes, GES carbapenemases, NDM, IMP, and GIM.

As shown in Tab. 1 (Attachment 1, p. 18), the current set contained four samples with different carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: sample # 1525441 contained *Serratia marcescens* with OXA-48 gene ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL), sample # 1525442 contained an *Escherichia coli* isolate with a NDM-5 and OXA-181 gene ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL), sample # 1525443 contained an *Klebsiella pneumoniae* isolate with a KPC-2 and VIM-1 gene ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL) and sample # 1525444 contained an *Enterobacter cloacae*-Complex strain harbouring a IMP-14 gene ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL).

All participants detected a carbapenemase gene in the OXA-48-positive *S. marcescens* sample (# 1525441) and with the exception of one participant classified the sample # 1525443 (*Klebsiella pneumoniae* with KPC-2 and VIM1 genes) correctly as positive for the presence of both carbapenemase genes. The participant with the false-negative result detected KPC-2 but missed the VIM-1 gene. For sample # 1525442 (NDM-5 and OXA-181 positive *Escherichia coli*), 39 of the 50 participants correctly reported presence of both carbapenemase genes. However, 11 participants detected only NDM-5 (10x) or only OXA-181 (1x). **It is known that some OXA-48 like genes such as OXA-181 and OXA-232 are missed in certain commercial test systems.** As these OXA-48 variants are increasingly imported into Europe **any user should be fully aware if the molecular tests used in their laboratory is able to detect such OXA-48 variants.** For sample # 1525444 (*Enterobacter cloacae*-Complex strain with an IMP-14 gene), only 14 participants detected this carbapenemase. Detection of beta-lactamase genes of the IMP family by molecular assays is technically demanding because of the heterogeneity of the many IMP variants. Currently IMP carbapenemases, including IMP-14, are exceedingly rare among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Germany.

In-house NAT assays were used for the detection of carbapenemase coding genes by 17 of the 50 participating laboratories, while all others quoted the use of commercial test systems or kits on the result form. As these commercial test systems 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.

RV 545: *Clostridium difficile*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for**

the direct detection of *C. difficile* DNA in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. The lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained three *Clostridium difficile*-positive samples: sample # 1525453 with $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL, sample # 1525451 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL, and sample # 1525452 with $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL. Sample # 1525454 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. The samples # 1525451 and # 1525453 containing relatively high amounts of *C. difficile* (1×10^4 CFU/mL and $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) were correctly reported as “positive” by 82 and 83 of the 84 participating laboratories, respectively.

False-negative results should prompt a thorough evaluation of the test system and the workflow. The latter is definitely warranted for the participant reporting a false-positive result for sample # 1525454, containing only *E. coli*, but no target organism. As cross-reaction of the applied test system with *E. coli* DNA is unlikely, probably cross-contamination during the process of sample preparation and analysis is causative.

Sample # 1525452 with the lowest amount of target organism ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) was correctly identified as positive by 79 participants. Again a false-negative result should prompt re-assessment of the sensitivity of the used test system. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 546: VRE

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

Sample # 1525462 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecium* vanB ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1525463 contained a similar amount of *Enterococcus faecium* vanA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1525461 contained *Enterococcus faecalis* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1525464 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. Of the 31 participating laboratories, 30 and 31 correctly reported positive results for the samples # 1525462 and # 1525463, respectively.

Of note, the reported dedicated vanA/vanB identifications for these two samples were all correct. We were pleased

to see that also for the “negative” samples #1525461 and # 1525464, all participants reported correct “negative” results. This is especially important when considering the impact of molecular VRE detection on the clinical management of a patient. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

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

The latest set of QC samples contained three positive specimens (see Tab. 1, Attachment 1, p. 21). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 5 \times 10^5$ organisms/mL) was present in sample # 1525601, an approximately tenfold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 5 \times 10^4$ organisms/mL) was present in sample # 1525604 and an approximately hundredfold lower amount ($\sim 5 \times 10^3$ organisms/mL) was present in sample # 1525602. The set was completed by sample # 1525603 which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Sample # 1525601, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 5 \times 10^5$ organisms/mL) and sample # 1525604 with a ten-fold lower concentration of *P. jirovecii*, were reported “positive” by 90 and 86 of the 91 participating laboratories, respectively. Although this could be due to a loss of template DNA during pre-analytical sample preparation procedures or other reasons, observation of false-negative results should certainly trigger reassessment of the diagnostic workflow, sensitivity and/or specificity of the individual assay concept.

The sample containing the lowest amount of the target organism (# 1525602, $\sim 5 \times 10^3$ organisms/mL) was correctly identified as positive by 58 participants, 29 false-negative results were recorded. The “negative sample” (# 1525603, containing only *E. coli*) was correctly classified “negative” by 89 participants. In case of false-positive or questionable results, this should definitely prompt investigations regarding all processes involved in sample preparation and analysis in order to optimize the NAT assay used.

Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2015-6/lab000020.shtml>

1. Anhang1_lab000020.pdf (404 KB)
Results of the proficiency testing scheme "Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)"
November 2015

References

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. Mikrobiologe. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem Staphylococcus aureus: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors 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
3. Witte W, Bräulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with Pantón-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

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

Corresponding author:

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

Please cite as

Reischl U, Schneider W, Ehrenschröder M, Hiergeist A, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, von Buttlar H, Splettstößer W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2015 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab. 2015;6:Doc05. DOI: 10.3205/lab000020, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000201

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2015-6/lab000020.shtml>

Published: 2015-12-22

Copyright

©2015 Reischl et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License. See license information at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.