

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

Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

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

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

Universitätsklinikum Bonn,
Deutschland

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

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

mepage von INSTAND e.V. als pdf-Files zum freien Download bereit.

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

So wurde beispielsweise im aktuellen **RV 530 Chlamydia trachomatis & Neisseria gonorrhoeae** eine Probe mit relativ hohen Mengen beider Zielorganismen versandt. Interessanterweise konnten einige kommerzielle und in-house PCR-Testsysteme hier nur die DNA von *C. trachomatis* im Gemisch mit *N. gonorrhoeae* DNA zuverlässig nachweisen.

Mittlerweile lässt sich auch in unseren geographischen Breiten innerhalb des typischen Patientenkontexts bei MRSA-Isolaten eine Zunahme der Vielfalt von zirkulierenden SCCmec-Varianten beobachten. In der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 539 MRSA/cMRSA** ein Methicillin-resistentes *S. aureus*-Isolat mit der **SCCmec-Kassette MREJ** (right extremity junction) **Typ IV** ausgesandt, das Methoden- bzw. Zielsequenz-bedingt bei einem Teil der aktuell eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zu falsch-negativen MRSA-Ergebnissen führte. Obwohl bei dieser Probe, im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit ähnlicher Probenkonstellation, diesmal erfreulicherweise eine etwas höhere Richtigkeitsquote erzielt werden konnte, bestätigt die Beobachtung von über 7% falsch-negativen MRSA-Ergebnissen erneut die Sinnhaftigkeit und auch Notwendigkeit des im Rahmen der PCR/NAT-Ringversuchsdiskussionen bereits mehrfach thematisierten **begleitenden kulturellen Nachweises von MRSA**. Selbst diejenigen Anwender, die mit ihren PCR-Testsystemen diese Variante zuverlässig detektieren konnten, sollten sich aufgrund der zuvor erwähnten Vielfalt und der Dynamik von „exotischeren“ SCCmec-Kassettypen nicht sicher sein, dass sie auch zukünftig alle der zirkulierenden Varianten problemlos und zuverlässig erfassen werden.

In einer der 4 Einzelproben des aktuellen Ringversuchs **RV 535: Borrelia burgdorferi** befanden sich relativ hohe Mengen der Spezies *Borrelia valaisiana* und *B. bisettiae*. Offenbar bereitete der zuverlässige PCR-gestützte Nachweis dieser dem *B. burgdorferi sensu lato*-Komplex zugehörigen Spezies einem Teil der Teilnehmer (bzw. den von

ihnen eingesetzten Testsystemen) gewisse Probleme. Etwas Hintergrundinformation zu diesen beiden Borrelien-Spezies finden Sie in dem ringversuchsspezifischen Teil dieser Diskussion.

Die Aussendung des **B. anthracis Stamm Pasteur** (positiv für das Virulenzplasmid pXO2 und die *B. anthracis*-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker *rpoB* und *dhp61*, jedoch negativ für das lethal- und edema-factor, sowie protective antigen-(*pagA*)-tragende Virulenzplasmid pXO1) in einer der 4 Proben des Ringversuchs RV 542: *Coxiella burnetii* & *B. anthracis* führte diesmal lediglich zu zwei falsch-negativen Ergebnissen innerhalb der gesamten Teilnehmerschaft. In den vorhergehenden Ringversuchsrunden war bei diesem Isolat noch eine höhere Zahl von falsch-negativen Ergebnissen beobachtet worden.

Mit der Auswahl eines etwas breiteren Spektrums von relevanten Carbapenemase-Genen bestätigte sich im Rahmen des Ringversuchs **RV 544 Carbapenemase-Gene** erneut die Vermutung, dass viele der derzeit verwendeten kommerziellen sowie *in-house* Testsysteme zur molekularen Carbapenemase-Detektion noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase-Genen aufweisen. Im Umfeld der molekularen Testung von Carbapenemase-Genen unterstützt uns ja zukünftig Frau Dr. Agnes Anders vom „Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger“ in Bochum bei der Auswahl von relevanten aber auch „interessanten“ klinischen Isolaten.

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

Aktueller **Hinweis auf neue Ringversuche in 2017**: Aufgrund einiger Anfragen aus dem Teilnehmer- und Kollegenkreis werden wir versuchen zwei zusätzliche Ringversuche zu etablieren und nach erfolgreichen Probe-Ringversuchsrunden dann auch möglichst zeitnah einzuführen:

- Der aktuelle Ringversuch **RV 543: Francisella tularensis** soll zukünftig als kombinierter Ringversuch um den Zielorganismus **Brucella spp.** erweitert werden.
- Für die externe Qualitätssicherung zukünftig kommerziell verfügbarer (und damit wohl auch vermehrt eingesetzter) **PCR/NAT-gestützten Nachweisverfahren für Urogenital-Infektionen** planen wir die Etablierung eines neuen Ringversuchs der vom Konzept her jeweils einige der nachfolgenden Erreger in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen innerhalb des 4-er Panels enthalten soll:

RV 547 „Uro-Panel“ zum Nachweis von: **Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum, Trichomonas vaginalis, Gardnerella vaginalis** und ggf. **Treponema pallidum**.

Sobald wir die komplexe Probenmatrix hinreichend optimiert haben und uns geeignetes Probenmaterial in ausreichender Menge zur Verfügung steht, wird seitens INSTAND e.V. unter den aktuellen Teilnehmern der Ring-

versuche „Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT“ eine entsprechende Bedarfsanalyse (mit der Möglichkeit zur Anmeldung für Proberingversuche) durchgeführt.

Hier noch **ein paar Reflexionen des Ringversuchsleiters**, die er sich nach der statistischen und fachlichen Auswertung der aktuellen Ringversuchsrunde wieder mal nicht verkneifen konnte: viele der seriösen Diagnostikhersteller geben sich größte Mühe bei der Testentwicklung und klinischen Evaluierung – und sind dann (zurecht) stolz auf die Leistungsdaten ihrer modernen PCR/NAT-Assays. Auffällig bei vielen der aktuellen, aber auch bei einigen der früheren Ringversuche ist das unterschiedlich gute Abschneiden von Teilnehmern mit ein und demselben kommerziellen, vorkonfektionierten und teilweise auch automatisierten und/oder kartuschenartig geschlossenen Testsystemen. Die meisten dieser Assays sind zudem auch noch IVD-zertifiziert – mit allen aufwändigen herstellerseitigen Vorkehrungen zur „zuverlässigen“ Durchführung und standardisierten Ergebnisinterpretation. Die auffällige „Streuung der Performance“ (bzw. das Auftreten einzelner Ausreißer) unterstreicht aus Sicht des Ringversuchsleiters umso mehr die Bedeutung der Qualitätsstandards, wie beispielsweise das regelmäßige Mitführen von geeigneten Extraktions-, Positiv- und Negativ-Kontrollen sowie Schulungen und kontrollierte Maßnahmen zur Vermeidung von exogenen Kontaminationsmöglichkeiten in PCR/NAT-Arbeitsbereichen, die u.a. im Rahmen der aktuellen RiLiBÄK, der Akkreditierung und der praxisorientiert verfassten MIQ-1 gefordert werden. Deren Sinnhaftigkeit und Stringenz mag aus Anwendersicht ja gelegentlich bezweifelt werden, wird aber in diesen Ringversuchsrunden (sozusagen von neutraler Warte aus) dennoch immer wieder aufs Neue bestätigt. Vielleicht lohnt es sich unter diesen Gesichtspunkten doch wieder mal ein Blick in die MIQ-1 oder die RiLiBÄK um hier und dort noch ungenutztes Potential auszuschöpfen...

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

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

Und eine kurze Anmerkung in eigener Sache: neben den überaus motivierten und engagierten Mitarbeitern der verschiedenen Sollwert-Laboratorien unterstützen uns bei der Konzeption und Auswertung der zahlreichen Ringversuche zum Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT noch zwei weitere Kollegen aus unserem Hause: Herr Dr. Dr. Martin Ehrenschwender und Herr Dr. Andreas Hiergeist. Allerherzlichsten Dank für ihre spontane Bereitschaft sowie ihr ehrenamtliches Engagement für unsere gemeinsamen Bemühungen zur externen Qualitätssicherung molekularbiologischer Nachweisverfahren in der infektiologischen Diagnostik.

Untersuchungsergebnisse November 2016

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

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 1625304 und Probe # 1625313), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1625302), *Helicobacter pylori* (Probe # 1625332), *Legionella pneumophila* (Probe # 1625362), *Salmonella enterica* ser. Enteritidis (Probe # 1625371), *Listeria monocytogenes* (Probe # 1625383), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1625403), *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 1625411), *Coxiella burnetii* (Probe # 1625424), *Bacillus anthracis* (Probe # 1615422), sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1625603).

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

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

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

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

Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung und/oder auf mangelnde Spezifität der eingesetzten Testsysteme zu betrachten. In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Die Tabellen 1 (Anhang 1) zeigen dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Er-

gebnisse 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.

Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten, und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen, zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR-Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR-Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: <http://www.udo-reischl.de>; Unterpunkt „Auswertung der Ringversuche“ und natürlich auch über die Homepage von INSTAND e.V. (<http://www.instand-ev.de>) als pdf-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion sowie deren tatkräftige Unterstützung bei der Konzeption und dem Aufbau neuer Ringversuche bedanken.

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

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis* (# 1625304, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL), zwei Proben mit einer 10-fach höheren Menge an *C. trachomatis*

(# 1625301 und # 1625302, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL), eine Probe (# 1625302) mit ca. 1×10^3 CFU/mL an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen, eine Probe mit 100-fach höherer Menge an *N. gonorrhoeae* (# 1625304; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) sowie eine Probe mit 1000-fach höherer Menge an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1625303; $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL).

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

Auch wenn die schwach positive Probe # 1625304 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 208 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* keine falsch-negative Ergebnisse.

Bei den beiden ca. 10-fach stärker CT-positiven Proben # 1625301 und # 1625302 des aktuellen Ringversuchs wurden von den 208 Teilnehmern diesmal nur insgesamt zwei falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Da hier von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den falschen Ergebnissen vermutlich um ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“. Bei den 3 CT-falsch-positiven Ergebnissen für Probe # 1625303 handelt es sich vermutlich um Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung der gleichzeitig prozessierten CT-positiven Proben. 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.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die drei positiven Proben # 1625302, # 1625303 und # 1625304 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^3 , 1×10^6 , bzw. 5×10^5 CFU/mL) diesmal von 14 der insgesamt 208 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA mitgeteilt. Auffällig war die Häufung von falsch-negativen Ergebnissen ($n=12$) bei Probe # 1625302, die neben einer relativ geringen Menge an Gonokokken zugleich relativ hohe Mengen an *C. trachomatis*-infizierten Zellen enthält. Offenbar sind einige der im Teilnehmerkreis eingesetzten kommerziellen und *in-house* PCR/NAT-Testsysteme etwas störanfällig, was den sensitiven Nachweis von Gonokokken bei gleichzeitiger Anwesenheit von *C. trachomatis* betrifft.

Angesichts der mit 1×10^5 IFU/mL ehrlicherweise nicht als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in den CT-positiven Proben # 1625301 und # 1625302 sowie 1×10^3 bzw. 5×10^5 CFU/mL an Zielorganismen in den GO-positiven Proben # 1625302 und

1625304 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern ebenfalls Anlass zur Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen NAT-gestützten Testsysteme geben.

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

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

Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen, wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden, von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden sowohl die *C. trachomatis*- als auch die *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen (bis auf die geringe Menge an Gonokokken in Probe # 1625302) von fast allen der 9 Teilnehmer mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen erfolgreich nachgewiesen.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 207 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionereignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in Tab. 3 (Anhang 1, S. 1) nicht zwischen dem spezifischen Nachweis von Chlamydien und Gonokokken differenziert wurde. Mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme wurden insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Um eine detail-

lierte Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen wurden diesmal 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 (11x), HAIN Lifescience FluoroType NG (10x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (4x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (4x), Urethritis basic von fast-track Diagnostics (4x), Seegene Anyplex™ II STI-7 Detection (4x), BD Max CT/GC/TV assay (4x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (3x), AmpliSens *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (2x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (2x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (1x), Amplex Hplex STD *Chlamydia* und *Neisseria* (1x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae* Real-TM (1x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (1x), QIAGEN artus CT/GC QS-RGQ Kit (1x), Aptima Combo 2 assay CT/GC (1x), Elisabeth Pharmacon EliGene *Neisseria* UNI Kit (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), *C. trachomatis* RG detect von Institute of Applied Biotechnologies (1x), *N. gonorrhoeae* RG detect von Institute of Applied Biotechnologies (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), AmpliGnost *C. trachomatis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), operon CT Oligogen (1x) und operon NG Oligogen (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* (# 1625311), eine Probe mit ca. 1×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1625313), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1625312 und # 1625314), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tab. 2 (Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den insgesamt 79 Teilneh-

mern bei den zwei positiven und den zwei negativen Proben überwiegend korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Lediglich 2 Teilnehmer berichteten bei der einen der beiden positiven Proben mit geringerer Menge an Zielorganismen (# 1625313 mit 1×10^3 IFU/mL) ein negatives Ergebnis für *C. trachomatis*.

Bei den beiden negativen Proben # 1625312 und # 1625314, die ausschließlich nicht infizierte Humanzellen und *Escherichia coli* enthielt, sollten die falsch-positiven Ergebnisse bei den drei betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres DNA-Isolierungsprozesses bzw. des jeweiligen *Chlamydia trachomatis*-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben. Bei der anzunehmenden sequenziellen Abarbeitung der 4 Einzelproben deutet diese Ergebniskonstellation sehr überzeugend auf Kontaminationsergebnisse bei der Probenaufbereitung durch Verschleppung von positivem Probenmaterial oder Nukleinsäure aus den beiden positiven Proben # 1625311 bzw. # 1625313 hin.

Angesichts der streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen bleibt es für den Ringversuchsleiter jedes Mal aufs Neue verwunderlich, dass ein unterschiedlich großer Anteil der teilnehmenden Laboratorien mit den betroffenen Testsystemen die vorgegebenen Zielwerte nicht erreicht. Ohne denjenigen Teilnehmern, die mit bestimmten kommerziellen Testsystemen die Zielwerte nicht erreichen, zu nahe treten zu wollen, deutet dieser Umstand in diesen Fällen dann wohl eher auf individuelle Abweichungen vom Protokoll oder bestimmte Fehler bei der Probenabarbeitung als auf intrinsische Unzulänglichkeiten der in der Regel gut evaluierten Testsysteme hin.

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. 1×10^3 IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht zu sein scheint, sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität sowohl falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Angesichts der nach wie vor anhaltenden Diskussion um das „Pooling“ von entsprechendem Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

Inhibitionskontrollen wurden von allen 79 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 auffäl-

ligen 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) und VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei positive Proben mit einer sehr hohen und einer etwa 100-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 1625324 mit 10^6 CFU/mL und # 1625322 mit 10^4 CFU/mL an *B. pertussis*) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1625321 und # 1625323), die lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielten.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA führte auch diesmal wieder zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben. Lediglich von einem der insgesamt 133 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1625321 und von 3 Teilnehmern für die negative Probe # 1625323 mitgeteilt. Hierbei handelt es sich offensichtlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Da diese Probe lediglich *E. coli*-Zellen enthielt ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des eingesetzten PCR/NAT-Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich. Unter den insgesamt 532 mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich zudem 10 falsch-negative klassifizierte Ergebnisse für die etwas schwächer positive Probe # 1625322 (10^4 CFU/mL an *B. pertussis*). Nicht zuletzt aufgrund der relativ geringen Erregermenge in dieser Probe wurden die negativen PCR-/NAT-Ergebnisse bei der Erstellung der Zertifikate diesmal nicht als „falsch-negativ“ gewertet. Inhibitionskontrollen wurden von 142 der insgesamt 145 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Im Rahmen der früheren Ringversuche hatten wir beobachtet, dass man sich offensichtlich erst bei einer Menge von ca. 10^3 CFU/mL an *B. pertussis*-Zielorganismen (entspricht ca. 10^2 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ l) der unteren Nachweisgrenze von entsprechend validierten *state of the art*-Testsystemen annähert. In der mikrobiologischen Praxis sind vor allem bei Rachenabstrichen gelegentlich auch geringe Erregermengen zu erwar-

ten – daher sollten falsch-negative Ergebnisse bei den betroffenen Teilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Dies gilt vor allem für denjenigen Teilnehmer, der die Probe # 1625324 (10^6 CFU/mL) negativ für *B. pertussis* befundet hat.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 65 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 8 Teilnehmern die Verwendung des Pertussis-Toxin-Gens und von 2 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gensegments als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit (9x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP *B. pertussis* (3x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (1x), Seegene Anyplex II RB5 Detection (2x), fast-track Diagnostics Bordetella (2x), ARGENE Bordetella R-gene (1x), AmpliSens Bordetella multi FRT PCR Kit (1x), Labsystems Diagnostics *B. pertussis* + *B. parapertussis* Duplex Real-Time PCR (1x), Ingenetix Bacto Real *B. pertussis/B. parapertussis* (1x), Altona diagnostic RealStar *Bordetella* PCR Kit (1x) und Sacace Biotechnologies Real TM *B. pertussis* (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben eines Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1625333; 1×10^4 CFU/ml und # 1625332; 1×10^3 CFU/ml) und eine positive Probe eines Clarithromycin-sensiblen *H. pylori*-Patientenisolats (# 1625334; 1×10^4 CFU/ml). Probe # 1515332 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial zusammen mit einer nennenswerten Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden alle 3 *H. pylori*-haltigen Proben (# 1625332, # 1625333 und # 1625334) und die negative Probe # 1625331 von allen der insgesamt 38 Teilnehmer ausnahmslos korrekt befundet.

Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Inhibitionskontrollen wurden von 37 der insgesamt 38 Teilnehmer durchgeführt und von keinem Teilnehmer wurden Inhibitionsergebnisse bei der Testung der 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 27 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 6 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 38 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 (# 1625341: *E. coli*, *stx*_{2c}-, *eae*-, *hlyA*- und O26:H11-positiv und # 1625343: *E. coli*, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv) und eine Probe mit 1×10^4 CFU/ml an *Salmonella enterica* ser. Enteritidis (# 1625344). Probe # 1625342 enthielt einen *E. coli*-K12-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 – beobachtet werden konnten. Die beiden EHEC-haltigen Proben # 1625341 bzw. # 1625343 wurden von 122 bzw. 121 der insgesamt 123 Teilnehmer als richtig-positiv berichtet. Von einem Teilnehmer wurde das Ergebnis bei der positiven Probe # 1625343 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.

Eine naheliegende Erklärung für das falsch-negative sowie ein fragliches Ergebnis der *stx*₁-, *stx*₂-, *hlyA*- und *eae*-positiven Probe # 1625343 gibt es ebensowenig wie für das einzige falsch-negative PCR-Resultat bei dem *stx*_{2c}-, *eae*- und *hlyA*-positiven O26:H11 EHEC-Isolat (Probe # 1625341). Eventuell decken die eingesetzten Testkonzepte der entsprechenden Teilnehmer nicht das gesamte zu erwartende Spektrum an „üblichen“ *stx*₁- und *stx*₂-Genen ab (Gennachweis gilt als molekularer Marker für das Vorliegen von EHEC/STEC bzw. *Shigella dysenteriae* Typ 1 bei *stx*₁). Die Probe # 1625342 (*E. coli*-K12-Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde von nahezu allen Teilnehmern korrekterweise als negativ befundet – sie führte lediglich bei einem der insgesamt 123 Teilnehmer zu einem falsch-positiven Ergebnis. Die Probe # 1625344, welche *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) enthielt, wurde erfreulicherweise von fast allen Teilnehmern (bis auf einen) korrekt als negativ für EHEC/STEC berichtet. Bei der anzunehmenden sequenziellen Abarbeitung der 4 Einzelproben könnte diese Ergebniskonstellation bei dem Teilnehmer mit dem falsch-positiven Ergebnis für Probe # 1625344 eventuell auch auf Kontaminationsergebnisse bei der Probenaufbereitung durch Verschleppung von positivem Probenmaterial oder Nukleinsäure aus der positiven Probe # 1625343 hindeuten.

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 120 der 123 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsergebnisse wurden in keinem Fall beobachtet. Zudem wurden von 106 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 ein falsch-negatives *eae*-Ergebnis.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (2x), TIB Molbiol LightMix modular *stx*-1/*stx*-2/*eae* (2x), TIB Molbiol EHEC Toxin Gene *stx*1

und stx2 (1x), BD Max Enteric Bacterial Panel (1x), 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 Bio-Rad IQ-Check STEC VirX Kit (1x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

Daher wurden bei der Konzeption des Ringversuchs diesmal drei unterschiedliche *Borrelia*-Spezies an die Teilnehmer versandt. Das aktuelle Set an Ringversuchproben enthielt jeweils eine Probe mit ca. 1×10^5 Organismen/mL an *Borrelia valaisiana* (# 1625353), eine Probe mit ca. 1×10^4 Organismen/mL an *Borrelia garinii* OspA Typ 3 (# 1625351) und eine Probe mit ca. 1×10^4 Organismen/mL an *Borrelia bissettia* (# 1625354). Probe # 1625352 enthielt lediglich signifikante Mengen eines *E. coli*-K12-Stammes.

Nochmals eine **kurze Rekapitulation**: Schon die Tatsache, dass mittlerweile mehr als 20 verschiedene, dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörigen Spezies beschrieben sind, impliziert erhebliches Problempotential für den PCR-/NAT-gestützten Nachweis von *B. burgdorferi*. *B. garinii* ist eine seit langem bekannte, gesichert humanpathogene Spezies, die weit verbreitet in Europa und Asien vorkommt und häufig bei disseminierten Infektionen gefunden wird. Dagegen ist für die ebenfalls in Europa und Asien weit verbreitete *B. valaisiana* die Humanpathogenität sehr fraglich. Diese Spezies wurde aus Patientenproben bislang lediglich in einigen wenigen Fällen mittels PCR nachgewiesen, dagegen noch nie angezüchtet, findet sich dagegen sehr häufig in den Zecken. Für *B. bissettia* ist die Datenlage dagegen (noch) sehr begrenzt. Diese Spezies konnte in den USA aus Zecken mittels Kultur und PCR nachgewiesen werden, Erkrankungsfälle sind nicht bekannt. In Europa findet sich diese Spezies extrem selten in Zecken (bislang nur mittels PCR) oder Patientenproben. Allerdings steht ein Isolat aus Liquor (Deutschland, Neuroborreliose) zur Verfügung, das einzige gesichert dieser Spezies zuzuordnende Patientenisolat weltweit. Nachdem bei eigenen Untersuchungen zur Sensitivität verschiedener Amplifikationsprotokolle der Nachweis dieser Spezies z.T. erhebliche Probleme bereitete, ist das Ergebnis des vorliegenden Ringversuchs – von 99 der insgesamt 103 Teilnehmern richtig positiv befundet – besonders erfreulich.

Einmal mehr muss in diesem Zusammenhang vor der nicht zu empfehlenden Untersuchung von Zecken um daraus eine Therapieindikation abzuleiten gewarnt werden: Abgesehen davon, dass die Studienlage keinen signifikanten Informationsgewinn für die Patientenversorgung erwarten lässt, sind diese Untersuchungen ohne weitergehende Identifikation der nachgewiesenen Spezies schlicht als gefährlich für den Patienten einzustufen, da

die Angabe „*B. burgdorferi* s.l. nachgewiesen“ grundsätzlich auch nicht-humanpathogene Arten mit einschließt. Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen: Alle der 103 Teilnehmer berichteten diesmal ein korrekt negatives PCR/NAT-Ergebnis für die negative Probe # 1625352.

Der zuverlässige Nachweis von *Borrelia garinii* in der Probe mit relativ hoher Erregerlast (# 1625351 mit $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL) bereitete nahezu keinem der 103 Teilnehmer signifikante Probleme. Da hier von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den 2 falsch-negativen Ergebnissen vermutlich um ringversuchstypische "sporadische Ausreißer".

Borrelia valaisiana in der positiven Probe # 1625353 ($\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL) wurden bei 97 (97%) der insgesamt 103 Teilnehmer von den jeweils eingesetzten *Borrelia*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen zuverlässig erfasst und korrekterweise als positiv befundet, 6 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Probe # 1625354 mit ca. 10^4 *B. bissettia*-Zielorganismen/mL wurde von 99 (99%) der Teilnehmer als richtig positiv erkannt und lediglich 4 Teilnehmer berichteten ein falsch-negatives Ergebnis. Vor allem bei den letzten beiden Proben sollten falsch-negative Ergebnisse den betroffenen Teilnehmern Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Möglicherweise ist hier die Gesamtsensitivität des analytischen Workflows und/oder die Spezifität bzw. Abdeckung der unterschiedlichen *Borrelia*-Spezies des verwendeten PCR-NAT-Assays unzureichend.

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von allen 103 Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse 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 49 der 103 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen (Sensitivität zwischen 97 und 100%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 94%) zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den insgesamt 10 falsch-negativen Ergebnissen für die Proben # 1625354 (*B. bissettia*) und # 1625353 (*B. valaisiana*) 8 davon durch *in-house* Testsysteme generiert wurden. Gegebenenfalls sollte also die Sensitivität und/oder Spezifität der hauseigenen Testsysteme überprüft werden.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsys-

teme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (9x), HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (5x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), Lyme disease RecA gene Standard Kit von genesig (1x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (1x), AmpliSens *B. burgdorferi* (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 erfolversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 9) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1625364 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1625361 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1625362 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). Probe # 1625363 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Letztere Einzelprobe wurde erfreulicherweise von 102 der insgesamt 103 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Ein Teilnehmer berichtete hier ein falsch-positives Ergebnis. Da diese Probe lediglich *E. coli*-Zellen enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich. Vermutlich ist das falsch-positive Ergebnis hier durch laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung bedingt. Die relativ stark positive Probe # 1625364 mit ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG2 wurde von 101 Teilnehmern korrekterweise als positiv interpretiert. Die zwei falsch-negativen Ergebnisse beruhen vermutlich eher auf anwendungstechnischen Problemen als auf unzureichender analytischer Sensitivität. Die etwa 10-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 1625361 (ca. 10^4 CFU/mL) konnte noch von 97 Teilnehmern korrekt als positiv identifiziert

werden, allerdings wurden hier bereits schon 6 falsch-negative Ergebnisse berichtet. Um die Grenzen der analytischen Sensitivität auszuloten, enthielt die Probe # 1625362 eine sehr geringe Menge an Zielorganismen (ca. 10^3 CFU/mL). Für diese Probe wurden nur 67 richtig-positive Ergebnisse von den insgesamt 103 Teilnehmern berichtet. Neben 35 falsch-negativen Ergebnissen wurde auch ein Ergebnis als „fraglich“ klassifiziert.

Aufgrund der geringen Erregeranzahl in Probe # 1625362 haben wir diese Probe als „edukativ“ betrachtet und die Ergebnisse bei der Erteilung der Zertifikate hier nicht als „falsch-negativ“ gewertet. Allerdings sollte der aktuelle Ringversuch und insbesondere ein falsch-negatives Ergebnis in Probe # 1625362 zum Anlass genommen werden, die analytische Sensitivität des verwendeten Testsystems kritisch zu hinterfragen und gegebenenfalls zu optimieren.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 60 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 (6x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), Mikrogen Diagenode Lpn-050 Kit (3x), r-Biopharm RIDAGENE *Legionella* (3x), ARGENE Legio pneumo/Cc r-gene (3x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (2x), Seegene Anyplex II RB5 Detection (2x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (1x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x), Allplex respiratory panel (1x), BD Max (1x), Vircell Speed-oligo *Legionella* (1x), AnDiaTec *L. pneumophila* real time PCR Kit (1x) und Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (1x).

RV 537: Salmonella enterica

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1625373; *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1625372; *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1625371; *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1625374), 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 2 der 4 Proben des Ringversuchssets zu tadellosen Richtigkeitsquoten von 100%. Einer von 21 Teilnehmern berichtete ein falsch-negatives Ergebnis bei Probe # 1625372, die ca. 5×10^4 CFU/mL an Salmonellen enthielt. Bezüglich der analytischen Sensitivität wurde es erst bei Probe # 1625371 ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) „interessant“. Nur mehr 18 der 21 Teilnehmer berichteten hier ein positives Ergebnis.

Auch in vorausgegangenen Ringversuchen waren bei relativ niedrigen Erregerlasten immer wieder falsch-negative Ergebnisse berichtet worden, was im Einzelfall eine Überprüfung der eingesetzten Testsysteme nach sich ziehen sollte.

Da in der aktuellen Ringversuchsrunde keine falsch-positiven Befunde für die negative Probe #1625374 (unmittelbar nach der hochpositiven Probe innerhalb des Probensets) mitgeteilt wurden, deutet dies, im Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden, auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden für keine der Proben berichtet. Kommerzielle Testsysteme kamen in 13 Fällen, selbstentwickelte Testsysteme in 9 Fällen zum Einsatz. Summe der Ergebnisse: 22 bei 21 Teilnehmern – verwunderlich zwar, aber nicht ganz selten im Rahmen dieser Ringversuchsrunden: durch Mehrfachnennungen von eingesetzten Testsystemen kann die absolute Anzahl der mitgeteilten Ergebnisse gelegentlich auch mal höher sein als die Anzahl der Teilnehmer (!).

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 (6x), BD Max Enteric Panel (2x), Congen SureFood pathogen Salmonella PLUS (1x), TIB Molbiol LightMix Salmonella (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 # 1625381 enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 5×10^5 CFU/mL), die auch von allen der insgesamt 36 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1625384 enthielt mit ca. 5×10^4 CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Mit ca. 5×10^3 CFU/mL *L. monocytogenes*/mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1625383 diesmal eine relativ geringe Menge der ent-

sprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise konnte selbst diese schwach-positive Probe noch von 35 der insgesamt 36 Teilnehmer als „positiv“ klassifiziert werden. Lediglich ein Teilnehmer berichteten hier ein negatives Ergebnis – vermutlich wurde in diesem Fall ein Testsystem mit etwas geringerer analytischer Sensitivität verwendet.

Um mögliche Kontaminationsereignisse während der Prozessierung und DNA-Präparation bei der *L. monocytogenes*-positiven Probe # 1625381 aufzudecken, haben wir diese übrigens bewusst am Anfang des aktuellen 4er-Sets unmittelbar vor die negative Probe # 1625382 positioniert. Umso erfreulicher gestaltet sich die aktuelle Ergebniskonstellation: keiner der 36 Teilnehmer hat bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1625382), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, ein falsch-positives Ergebnis berichtet. Im Vergleich zu den vorhergegangenen Ringversuchen deutet dies auf eine kontinuierlich verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen 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 36 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsergebnisse 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 Ergeb-

nisfeld 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

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

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

Dass aber auch die *SCCmec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden *SCCmec*-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen *SCCmec*-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der *SCCmec*-Kassette 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 abzuprüfen, befand sich im aktuellen Ringversuch ausnahmsweise mal keine Mischung aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken mit *mecA*-Gen, sondern ein in unseren Breiten derzeit noch eher seltener vorkommendes MRSA-Isolat mit *SCCmec*-Kassette vom Typ IV.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1625391 diesmal ein Methicillin-resistentes *Staphylococcus epidermidis*-Isolat ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), die Probe # 1625393 ein Methicillinsensibles *S. aureus*-Isolat (MSSA, PVL-negativ, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), die Probe # 1625394 ein CA-MRSA-Patientenisolat (MRSA; PVL-positiv, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und die Probe # 1625392 eine relativ hohe Menge eines **Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats mit einem bisher noch eher selten anzutreffenden *SCCmec* Kassetten- bzw. MREJ-Typ IV** (MRSA; PVL-negativ; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Die Abkürzung **MREJ** steht dabei für *staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) right-extremity junction*. MREJ umfasst das rechte Ende der sog. *SCCmec*-Kassette, die *SCCmec*-Integrationsstelle sowie das angrenzende *orfX*-Gen innerhalb des Staphylokokken-Genoms. Diese (leider in weiten Teilen sowie in zahlreichen Kombinations- und Ausführungsformen bereits umfassend und einschlägig patentrechtlich geschützten) Genelemente sind beliebte Zielsequenzen für moderne MRSA-spezifische PCR/NAT-Amplifikations- und Detektionsverfahren.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der positiven (CA-)MRSA Probe # 1625394 von nahezu allen der 305 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 2 falsch-negativen und dem einen als „fraglich“ klassifiziertem Ergebnis 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 # 1625394 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit vergleichbarer Probenkonstellation wurde bei dem MSSA-Isolat in Probe # 1625393 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 297 der insgesamt 305 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, ein Teilnehmer hat sein Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Die übrigen 7 Teilnehmer berichteten bei dieser Probe, die ja lediglich ein „banales“ Methicillinempfindliches *S. aureus*-Isolat enthielt, falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Angesichts der hinlänglich bekannten Konsequenzen eines MRSA-Nachweises für das spezielle Management von MRSA-positiven Patienten

und möglicherweise sogar die Initiierung einer Eradikationstherapie ist diesen Ringversuchs-Teilnehmern dringend anzuraten, ihre Testsysteme zu überprüfen bzw. die methodische Eignung ihres jeweiligen Testkonzepts zu hinterfragen.

Von 4 dieser 8 Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruht. Da in der Probe # 1625393 zwar *S. aureus*-spezifische Marker, aber kein *mecA* Gen zu finden sein kann, sollten die falsch-positiven Ergebnisse bei allen 7 betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres DNA-Isolierungsprozesses bzw. des jeweiligen MRSA-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben. Bei der anzunehmenden sequenziellen Abarbeitung der 4 Einzelproben ist diese Ergebniskonstellation theoretisch aber auch mit möglichen Kontaminationsereignissen bei der Probenaufbereitung durch Verschleppung von positivem Probenmaterial oder Nukleinsäure aus der MRSA-hochpositiven Probe # 1625392 vereinbar. Abgesehen von diesen wenigen „Ausreißern“ spricht die Ergebnislage jedoch für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Auch diesmal scheinen die SCCmec-basierten Testkonzepte wieder einen gewissen analytischen Vorteil gegenüber Testsystemen mit einer getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA*-Gen zu besitzen.

Wie aber in einigen der vorhergegangenen Ringversuche bereits mehrfach diskutiert, haben auch die erstgenannten Testkonzepte gewisse Limitationen. Dies wird im Rahmen des aktuellen Ringversuchs mit der Probe # 1625392 erneut auf eindrucksvolle Weise aufgezeigt. Denn das hier versandte MRSA-Isolat besitzt eine (in unseren Breiten derzeit noch eher seltener vorkommende bzw. anzutreffende) SCCmec-Kassette vom Typ IV, deren terminale Nukleinsäuresequenz sich deutlich von den typischerweise anzutreffenden MRSA-Isolaten mit SCCmec-Kassettentyp I bis III unterscheidet.

Hier wurden lediglich von 283 der insgesamt 305 Teilnehmer richtig-positive Ergebnisse mitgeteilt. Zugegebenermaßen ist dieser SCCmec-Typ unter den MRSA-Patientenisolaten noch relativ selten und die Ergebniskonstellation dieses Ringversuchs sollte den diagnostischen Wert von SCCmec-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 # 1625392 als „edukativ“ deklariert und daher nicht als „falsch-negativ“ bewertet.

Bei der Probe # 1625391, die ausschließlich eine relativ hohe Menge an Koagulase-negativen Staphylokokken (*S. epidermidis*; *mecA*-positiv, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) sowie nennenswerte Mengen an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von 5 der 305 Teilnehmer falsch-positive MRSA-Ergebnisse beobachtet. Wie bereits zuvor bei Probe # 1625393 diskutiert, liegt auch hier das Auftreten von sporadischen laborinternen

Kontaminationsereignissen oder einer Kreuzkontamination mit MRSA-positiven Proben während der DNA-Extraktion und -abarbeitung nahe. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der erfreulich große Anteil von richtig-positiven Ergebnissen bei der MRSA-positiven Probe # 1625394 und die überwiegend richtig-negativen Befunde bei den beiden MRSA-negativen Proben erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht. Abgesehen von der besagten Probe mit dem SCCmec Typ IV-positiven MRSA-Isolat belegt die Ergebnislage dieses Ringversuchs erneut die mittlerweile sehr hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind und/oder überprüfen wollen, ob ihr spezifisches Testsystem MRSA mit SCCmec Typ IV erfassen kann, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine-Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 64 der insgesamt 310 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diesmal sowohl die negativen, als auch die positiven Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA- bzw. CA-MRSA-Problematik finden sich beispielsweise unter: Linde et al. (2005) [2] oder Witte et al. (2005) [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. (2007) [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 (4x), HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (2x), HAIN Lifescience Genoquick MRSA (2x), Amplex easyplex MRSA (2x), Roche COBAS 4800 MRSA (2x), VELA diagnostics Sentosa SA Direct MRSA Test (2x), r-biopharm RIDAGENE PVL PCR (1x), GeneProof MRSA PCR Kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA combi (1x) und Congen SureFast MRSA 4Plex (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

Eine wichtige Anmerkung wie immer vorab: dieser Ringversuch ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Chlamydia pneumoniae*-DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispiels-

weise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *C. pneumoniae*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 13) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1625402; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1625401; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml), eine Probe mit geringer Menge (# 1625403; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1625404; nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen).

Aus den in der Tab. 2 (Anhang 1, S. 13) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch mit einer Ausnahme alle Teilnehmer die Zielorganismen in der positiven Probe # 1625402 (ca. 5×10^5 IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Auch die zehnfach geringere Menge an Zielorganismen der Probe # 1625401 konnte von 106 der 108 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die sehr geringe Erregermenge in Probe # 1625403 (5×10^3 IFU/mL) wurde noch von 100 teilnehmenden Laboratorien erfasst und korrekt bewertet. Im Rückblick mit den vorausgegangenen Ringversuchsrunden liegt das „lower limit of detection“ bei vielen *C. pneumoniae*-spezifischen Testsystemen wohl im Bereich von 10^3 IFU/mL, daher ging das von 8 Teilnehmern berichtete negative Ergebnis nicht in die Wertung ein. Dennoch sollte dies kein Grund sein, die Sensitivität des eingesetzten Testsystems sowie die Arbeitsabläufe zu evaluieren und weiter zu verbessern. Für die Probe ohne Zielorganismen # 1625404 (*Escherichia coli*) dokumentierten 126 der 129 Teilnehmer ein korrektes negatives Ergebnis. Daneben fanden sich für diese Probe noch zwei falsch-positive Ergebnisse. Dies unterstreicht einerseits aufs Neue die hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA. Andererseits könnte es sich bei den beiden isoliert falsch-positiven Ergebnissen eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit *E. coli*-DNA erscheinen eher als unwahrscheinlich. Eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde in keiner der versandten Proben beobachtet, Inhibitionskontrollen wurden von insgesamt 128 der 129 Teilnehmer durchgeführt. Selbstentwickelte *in-house* NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 38 Labors eingesetzt, alle weiteren Teilnehmer vertrauten auf kommerzielle Assays. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergeb-

nisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (10x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bacterial Kit (6x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (5x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae* (4x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (3x), Seegene Anyplex RB5 detection (2x), Seegene Allplex RP 4 detection assay (2x), Ingenetix Bacto Real *C. pneumoniae* (1x), Biologio ReadyMax B-CAP Assay (1x), 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 zwei positive Proben: Probe # 1625414 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) und Probe # 1625411 mit einer niedrigen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^3$ Genomkopien/mL). Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielt Probe # 1625412 (*Mycoplasma genitalium*; $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL) diesmal nennenswerte Mengen an einer zu dem Zielorganismus verwandter Mykoplasmen-Spezies. Probe # 1625413 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Mit einer Ausnahme konnten die 123 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1625414 zuverlässig nachweisen, bei der schwächer positiven Probe # 1625411 war dies noch 118 Teilnehmern möglich. Für die Probe # 1625413 ohne Zielorganismus erreichte uns ein falsch-positives Ergebnis, ansonsten wurde diese Probe korrekt als „negativ“ klassifiziert. Wie auch in vorausgegangenen Ringversuchsrunden wurden auch diesmal wieder einige (5) falsch-positive Ergebnisse für die für die zweite „negative“ Probe (# 1625412, $\sim 10^4$ Genomkopien/mL *Mycoplasma genitalium*) berichtet, 118 Labors befundeten diese Probe korrekt als negativ. 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. Insgesamt jedoch zeigte die Ergebniskonstellation in einem breiten Teilnehmerfeld mit unterschiedlichsten Testsystemen und PCR-Protokollen eine relativ hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, für keine der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsergebnisse berichtet. Selbstentwickelte PCR-/NAT-Testsysteme kamen bei 42 Teilnehmern zum Einsatz, während in den anderen Laboratorien kommerzielle Testsysteme verwendet wurden. Die Richtigkeitsquoten lagen bei *in-house* und vorkonfektionierten Assays auf vergleichbarem Niveau.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 80 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt: LightMix *M. pneumoniae* [n=13], AmpliGnost MP PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe [n=6], Diagenode MP/CP [n=6], sowie „andere kommerzielle Testsysteme“ [n=55]. Teilnehmer mit den ersten drei der aufgeführten Testkits konnten damit durchwegs Richtigkeitsquoten von 100%, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika CAP Bacterial Kit (7x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (6x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (5x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 21 (4x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (3x), r-Biopharm RIDAGENE *M. pneumoniae* (3x), AmpliSens *M. pneumoniae*/*C. pneumoniae*-FEP PCR Kit (2x), Sartorius Microsart AMP Mycoplasma (2x), Biologio ReadyMax B-CAP Assay (2x), Seegene Allplex RP 4 detection assay (2x), Seegene Anyplex RB5 detection (1x), Labsystems Diagnostics *C. pneumoniae* + *M. pneumoniae* Duplex Real-Time PCR (1x) und Ingenetix Bacto Real Mycoplasma pneumoniae (1x).

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

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tab. 1 in Anhang 1, S. 15) enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *C. burnetii* ($\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1625424 und $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1625421), eine Probe mit DNA des *B. anthracis* „Pasteur“-Isolats ($\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe

1625423), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* UR-1-Isolats ($\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1625421) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1625422), 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 *C. 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: Life Technologies LSI VetMAX COX B ABSO QUANT (3x), Altona diagnostics RealStar Anthrax PCR Kit (2x), Sacace Biotechnologies *C. burnetii* Real-TM (1x), Sacace Biotechnologies *B. anthracis* Real-TM (1x) und Master diagnostica Tick-borne bacterial flow chip (1x).

Coxiella burnetii: Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich. Die etwas stärker positive Probe # 1625421 (mit ca. 1×10^4 Genomkopien *C. burnetii*/mL) wurde von allen der insgesamt 36 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Die zweite positive Probe # 1625424 des Probesets (ca. 1×10^3 Genomkopien/mL von *C. burnetii*) wurde von 34 Labors korrekt berichtet, hier sind allerdings ein fraglicher und ein falsch-negativer Befunde zu registrieren. Dies sollte in den betroffenen Labors zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems zu hinterfragen und die Prozesse der Probenaufarbeitung ggfs. zu optimieren. Die beiden Proben ohne Zielorganismus (# 1625422 und # 1625423) wurden erfreulicherweise von allen Teilnehmern korrekt als „negativ“ gewertet.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA der Teilnehmer enthielten durchwegs eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Relevante Inhibitionsergebnisse wurden hier lediglich von einem Teilnehmer und hier nur bei einer einzelnen Probe (# 1625424) innerhalb des aktuellen Probesets beobachtet.

Bacillus anthracis: Die Ergebnislage des Ringversuchs "*Bacillus anthracis*-DNA" ist ebenfalls relativ schnell dargestellt.

Alle 17 Teilnehmer konnten die beiden Proben ohne Zielorganismen (# 1625422 und # 1625424) richtig als „negativ“ klassifizieren. Von 16 der 17 Teilnehmer wurde die Probe # 1625421 (*B. anthracis* Stamm UR-1, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL) als positiv gewertet, lediglich ein fragliches Ergebnis wurde berichtet. Für die zweite *B. anthracis*-positive Probe (# 1625423, ***B. anthracis* Stamm Pasteur**, $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL) wurden 2 falsch-negative Ergebnisse eingesandt. Zur kurzen Rekapitulation: ***B. anthracis* Stamm Pasteur** 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 „Letal- und Ödem-Faktor sowie Protektives Antigen (pagA)-kodierende Virulenzplasmid pXO1. Aufgrund der nicht geringen Mengen des Zielorganismus im Probenmaterial sollte ein falsch-negatives Ergebnis bei den positiven Proben # 1615421 und # 1615423 unbedingt zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und gegebenenfalls die laborinternen Abläufe der Probenaufarbeitung zu prüfen. Wie immer stehen nach erfolgreichem Abschluss der aktuellen Ringversuchsrunde den Kolleginnen und Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen für *C. burnetii*-DNA und *B. anthracis*-DNA interessiert sind, mit den Proben dieses Ringversuchs auch gewissermaßen „standardisierte Rückstellproben“ zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

RV 543: *Francisella tularensis*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 17) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1625432 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1625434 mit ungefähr gleicher Menge (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1625431 mit ca. $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL an *F. tularensis* spp. *holarctica*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1625433), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier alle der 21 Teilnehmer die relativ stark positive Probe # 1625432 (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) als positiv identifiziert, lediglich ein Teilnehmer berichtete die Probe # 1625434 (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) fälschlich als negativ. Die Probe mit der geringsten Erregermenge (# 1625431, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) konnte noch von 19 der 21 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die zwei falsch-negativen Bewertungen sollten Anlass geben, die individuelle Art der Probenaufarbeitung und das verwendete Testsystem bezüglich Sensitivität zu evaluieren und gegebenenfalls zu optimieren, denn die vorhandene Menge des Zielorganismus sollte auch mit dieser klinisch relevanten Beimengung an nicht-Ziel-DNA sicher detektiert werden können. Die *F. tularensis*-negative Probe # 1625433 wurde diesmal von 2 Teilnehmern fälschlicherweise als „positiv“ klassifiziert. In Anbetracht der klinischen Konsequenzen eines solchen Befundes muss hier unbedingt eine Fehler-suche erfolgen! Dennoch deckt sich die Ergebnislage weitgehend mit den Beobachtungen aus vorherigen

Ringversuchen und spricht erneut für ein gutes Funktionieren der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *F. tularensis*-DNA der Teilnehmer enthielten durchwegs eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Master diagnostica Tick-borne bacterial flow chip (1x).

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 drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1625441 enthielt *Klebsiella oxytoca*-Zielorganismen mit den Genen für KPC-3 und VIM-1 (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL), Probe # 1625442 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit den Genen für NDM-1 und OXA-48 (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL) und Probe # 1625443 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit dem OXA-232-Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 1625444 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

Alle Teilnehmer stellten erfreulicherweise (zumindest ein) Carbapenemase-Gen in den Proben # 1625441 und #1625442 fest. Bei genauerem Hinsehen muss jedoch festgestellt werden, dass in beiden Proben einigen Teilnehmern ein Carbapenemase-Gen „durchrutschte“, wegen des Nachweises eines weiteren Carbapenemase-Gens wurden die Proben korrekt als „positiv“ klassifiziert. Hier heißt es aufpassen und auch bei formal richtigem Ergebnis den Ursachen auf den Grund gehen! Gleiches gilt für die Teilnehmer, die diese Proben aufgrund der Detektion von Carbapenemasen positiv meldeten, welche gar nicht in der Probe enthalten waren. Eine gründliche Prüfung der Spezifität der verwendeten Testsysteme bzw. der Prozesse bei der Probenaufarbeitung (Kreuzkontaminationen?) ist sicherlich empfehlenswert. Dieser letzte

Punkt sollte auch für die 2 Teilnehmer mit „falsch-positiven“ Ergebnissen für die Probe #1625444 beherzigt werden, man bedenke die klinischen Konsequenzen eines fälschlicherweise Carbapenemase-positiv berichteten Enterobacteriaceae-Isolats! Für die Probe # 1625443 berichteten 58 der 63 Teilnehmer ein positives Ergebnis (*Klebsiella pneumoniae* mit OXA-232, was zur „Familie“ der OXA-48-ähnlichen Carbapenemase-Gene gehört). Ein falsch-negatives Ergebnis sollte Anlass geben, einerseits die „Coverage“ des verwendeten Carbapenemase-Assays zu evaluieren und sich andererseits der möglichen Lücken bewusst zu sein. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Direktnachweis von Carbapenemase-Genen aller Teilnehmer enthielten jeweils eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID Carbapenemase (2x) und AmpliGnost Carbapenemase PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x).

RV 545: Clostridium difficile

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Clostridium difficile“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an Clostridium difficile-DNA** aus 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 # 1625453 mit einer hohen Menge an *Clostridium difficile*, ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1625452 mit ca. zehnfach geringerer Menge ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1625451 und # 1625454), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden „positiven“ *Clostridium difficile*-Proben # 1625452 und # 1625453 wurden erfreulicherweise von 102 der 103 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 den Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen für die lediglich *E. coli*-enthaltende Probe # 1625451. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich. Die zweite „negative“ Probe wurde erfreulicherweise von allen Teilnehmern korrekt befundet. Inhibitionskontrollen wurden

durchwegs mitgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden für keine der Proben berichtet. Wie in Tab. 3 (Anhang 1, S. 20) angegeben, verwendete der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme, während selbstentwickelte Testkonzepte in 13 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. 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 (14x), r-Biopharm RIDAGENE *C. difficile* (7x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (5x), r-Biopharm RIDAGENE *C. difficile* LC2.0 (2x), HAIN Lifescience GenoType CDiff (6x), Altona diagnostic RealStar *C. difficile* PCR Kit (5x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (2x), Meridian Bioscience illumigene *C. difficile* (2x), fast-track Diagnostics *C. difficile* (2x), Quidel AmpliVue *C. difficile* Assay (1x), Congen SureFast *C. difficile* 3plex (1x) und Seegene Kit (1x).

RV 546: VRE

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Vancomycin-resistente Enterokokken“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an DNA Vancomycin-resistenter Enterokokken** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 21) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei Vancomycin-resistente Enterococcus-Stämme: Probe # 1625463 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen *Enterococcus faecium* **van A** resistent, ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1625461 (*Enterococcus gallinarum* **van A** und **van C** resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Probe # 1625464 ca. $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL an *Enterococcus faecium*. Im Ringversuchssprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1625462), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden „positiven“ Proben # 1625461 und # 1625463 mit vanA bzw. vanA und vanC tragenden Enterokokken mit lediglich zwei Ausnahmen von allen Teilnehmern als „VRE-positiv“ klassifiziert. Wie bereits im vorangegangenen Ringversuch waren alle eingereichten vanA/vanB-Differenzierungen korrekt.

Aus Sicht der Krankenhaushygiene und der Auswirkungen auf das Patientenmanagement mag der Nachweis eines intrinsisch Vancomycin-resistenten *Enterococcus gallinarum* aufgrund der (zumeist) chromosomalen Kodierung des Resistenzgens unproblematisch erscheinen, und ein positiver Befund nicht immer ein klassischer „VRE im Sinne der Krankenhaushygiene“ sein. Im Falle einer Infektion mit dem Erreger kommt dem korrekten Nachweis

einer Vancomycin-Resistenz natürlich eine hohe Bedeutung zu. Einige Testsysteme bieten neben dem Nachweis von vanA/B/C-Resistenzgenen auch Informationen über die zugehörige Enterokokken-Spezies und können bei bestimmten Befundkonstellationen die Interpretation erleichtern bzw. das erforderliche Hygienemanagement eines Patienten konkretisieren.

Die beiden „negativen“ Proben # 1625462 und # 1625464 waren erfreulicherweise durchwegs als „VRE-negativ“ berichtet worden. Bei den eingesetzten Testsystemen zeigt sich in den letzten Jahren ein Trend hin zu kommerziell erhältlichen, vorkonfektionierten Systemen. Unterschiede in Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu *in-house* Assays waren jedoch nicht zu erkennen. Insgesamt war die Ergebnislage dieser Probenaussendung sehr erfreulich.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: HAIN Lifescience GenoType Enterococcus (6x), AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz differenz. von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), QIAGEN artus VanR QS-RGQ Kit (1x) und GeneProof VRE PCR Kit (1x).

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Dieser im Jahr 2013 neu in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch Nr 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis von *Pneumocystis jirovecii*-DNA** in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set zwei positive Proben (siehe Tab. 1 in Anhang 1, S. 22): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1625602; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 5×10^5 Genomkopien/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 1625603; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 5×10^3 Genomkopien/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1625601 und # 1625604) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Der Nachweis des Zielorganismus aus der stärker positiven Probe (# 1625602, ca. 5×10^5 Genomkopien/mL) gelang allen 96 Teilnehmern. Probe # 1625603 mit einer hundertfach geringeren Erregermenge wurde noch von 93 der 96 Teilnehmer korrekt als „positiv“ identifiziert. Für die Teilnehmer mit falsch-negativen Befunden in dieser Ringversuchsrunde bleibt unser Appell bestehen, die Sensitivität der verwendeten Testsysteme zu hinterfragen, da eine Erregermenge von 5×10^3 nicht als „äußerst gering“ einzuschätzen ist.

Bei den Proben ohne Zielorganismen (# 1625601 und # 1625604), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs von 2 (# 1625601) bzw. 1 (# 1625604) Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse berichtet (Tab. 2 in Anhang 1, S. 22).

Dies legt ein laborinternes Kontaminationsereignis oder eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe und sollte eine sorgfältige Aufarbeitung nach sich ziehen. Andererseits sprechen die mehrheitlich richtig-negativen Ergebnisse für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen im Teilnehmerkreis. Mit einer Ausnahme wiesen alle eingesetzten Testsysteme Inhibitionskontrollen auf, eine nennenswerte Inhibition wurde von keinem der Teilnehmer berichtet. Bei den verwendeten Testsystemen lagen *in-house* Assays zahlenmäßig fast gleichauf mit kommerziellen Testsystemen. Unterschiede in Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit waren nicht zu erkennen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Diagnostics *Pneumocystis jirovecii* (3x), Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (2x) und SureFast *P. jirovecii* PLUS (1x).

Danksagung

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

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

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2017-8/lab000024.shtml>

1. Anhang1_lab000024.pdf (435 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ November 2016

Literatur

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583

3. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Pantone-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 24:1-5. 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

Bitte zitieren als

Reischl U, Schneider W, Ehrenschrwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2016 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab.* 2017;8:Doc01. DOI: 10.3205/lab000024, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000248

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2017-8/lab000024.shtml>

Veröffentlicht: 09.01.2017

Copyright

©2017 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/>.

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

Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: comprehensive discussion of the November 2016 distribution for external quality assessment of nucleic acid-based protocols in diagnostic medical microbiology by INSTAND e.V.

Abstract

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

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

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

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

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

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

3 Institute of 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 2016

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

Despite the mixed presence in different proportions and/or relatively low amounts of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* target organisms in some QC samples of the current set, 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 almost identical amounts of *C. trachomatis* ($\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL; sample # 1625301 and sample # 1625302), one sample with $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* (# 1625304) and three samples with various amounts of *N. gonorrhoeae* organisms ($\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL in sample # 1625303, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1625304 and $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL in sample # 1625302).

Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target cells and the simultaneous presence of *N. gonorrhoeae* organisms in the positive sample # 1625304, no false-negative results were observed among the *Chlamydia trachomatis*-specific results, reported by the 208 participants. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, 12 false-negative GO results were observed for sample # 1625302, which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in a relatively low amount of 1×10^3 CFU/mL with *C. trachomatis* infected cells simultaneously present in high amounts. For sample # 1625303, results were classified as “questionable” by 7 participants. For questionable results, certificates are only issued when correct

results are reported by the participant for the remaining samples of RV 531.

Since the amount of target organisms in CT-positive samples # 1625301, # 1625302, and NG-positive samples # 1625302, # 1625303 and # 1625304 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 207 participants and no inhibitory events were reported.

Tables 4 to 7 (Attachment 1, p. 2-3) were included this time to enable a detailed evaluation of the *C. trachomatis*- and GO-specific NAT components of combined GO/CT test systems. In the 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: # 1625313 with $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms and sample # 1625311 with $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Samples # 1625312 and # 1625314 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* bacterial background.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 4), the reported results were almost correct for the two positive samples. Only two false-negative results were reported for *C. trachomatis*-positive sample # 1625313 containing a relatively low number of *C. trachomatis*-infected cells.

For the two *C. trachomatis*-negative samples # 1625312 and # 1625314 containing only human cells and *E. coli*, 3 false-positive results were observed among the 79 participants.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the “negative” samples 2 and 4 by target organism or PCR product carry-over from the positive samples 1 and/or 3 might have occurred within the sample prep and amplification workflow of these laboratories. So false positive results should encourage the affected participants to re-

view 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 79 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 79 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a very high amount of *Bordetella pertussis* (# 1625324; 1×10^6 CFU/mL), one sample with an approximately hundredfold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1625322; 1×10^4 CFU/mL), as well as two samples containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1625321 and # 1625323).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only 1 of the 133 participants reported false-positive results for the *B. pertussis*-negative sample # 1625321 and three false-positives were observed with *B. pertussis*-negative sample # 1625323. The false-positivity issue is probably due to contamination events in the course of sample preparation or PCR/NAT amplification.

A cross reaction due to a possible low specificity of the used PCR/NAT test system is unlikely, because the negative samples contained only *E. coli* cells in the sample matrix as a kind of bacterial background. For sample # 1625322, 10 false-negative results were observed. With an amount of 10^4 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms, the lower limit of detection of appropriate test systems is obviously "slightly touched" but not reached – as 123 participants were able to clearly detect the *B. pertussis* organisms in this sample.

For the detection of *B. pertussis*, most participants used self-developed (in house) test systems with inhibition and/or positive controls. Therefore, 84 participating laboratories used IS481 insertion sequence, 15 the *B. pertussis* toxin coding gene and 2 ribosomal genes.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained two samples with Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* (sample # 1625333 with 1×10^4 CFU/ml and sample # 1625332 with 1×10^3 CFU/ml). Sample # 1625334 contained of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain (with 1×10^4 CFU/ml) and sample # 1625331 con-

tained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The availability of well evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in two of the three *Helicobacter pylori*-positive samples (# 1625333 and # 1625334: $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) led to positive predictive values of 100%. Also for the *Helicobacter pylori*-negative sample # 1625331 correctly negative PCR/NAT-results were reported by all the 38 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 38 participants. With one exception, the molecular clarithromycin resistance testing results were correct.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed previously, the challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenic factors (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1625343 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive) and # 1625341 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-negative, *stx*_{2c}-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive). The other two EHEC-negative samples contained a *Salmonella enterica* ser. Enteritidis strain (sample # 1625344; 1×10^4 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1625342).

Almost all of the 123 participants correctly reported negative results for sample # 1625344, containing only *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. The second "negative" sample (# 1625342), containing only *E. coli* K12 was with one exception also correctly commented as EHEC/STEC-negative. For the EHEC/STEC-positive samples # 1625341 and # 1625343, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation (and relatively high numbers of target organisms present in the respective samples) resulted in consistently high accuracy rates. Sample # 1625341 was correctly reported positive by 122 of the 123 participants, while even 121 participants identified sample # 1625343 as positive and one participant classified his result as "questionable".

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 106 of the 123 participating laboratories. All of 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.

Short recapitulation: So far 21 different species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato complex were described, that naturally present genetic differences in commonly used target genes. To further address this heterogeneity and to monitor the analytical sensitivity and specificity of the PCR/NAT assays applied by the diverse group of international participants, *Borrelia valaisiana* as well as *Borrelia bissettae* were included in the actual panel.

While *B. garinii* is a well known human pathogenic species present in Europe and Asia, *B. valaisiana* – though frequently present in ticks in Europe and Asia – was rarely found in patient specimen and only by PCR, questioning a relevant human pathogenic potential. In the USA, *Borrelia bissettae* was isolated from ticks but never found in patient specimen, while in Europe this species is extremely rare in ticks (1 study, by PCR only) and patients, but one patient isolate (neuroborreliosis, Germany) is available.

The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia valaisiana* (# 1625353; $\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL), one sample with *Borrelia garinii* OspA type 3 (sample # 1625351; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL) and one sample with *Borrelia bissettae* (sample # 1625354; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL). Sample # 1625352 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. With the exception of six false-negative results for sample # 1625353 (containing a high number of *B. valaisiana* target organisms), four false-negative result for sample # 1625354 (*B. bissettae*) and two false-negative result for sample # 1625351 (*B. garinii*) all participants reported correct results for the three positive samples. The false-negative results should prompt re-evaluation of the assay specificity and/or 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. Looking at the species composition of the current panel, slight differences in test performance are getting apparent between commercially available kits and in-house assays for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

RV 536: *Legionella pneumophila*

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

In order to assess the analytical sensitivity of certain *Legionella pneumophila*-specific PCR assays, the current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Legionella pneumophila* serogroup 2: sample # 1625364 (1×10^5 CFU/ml), sample # 1625361 (1×10^4 CFU/ml) and sample # 1625362 (1×10^3 CFU/ml). Sample # 1625363 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive samples # 1625361 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and # 1625364 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) were correctly tested positive by 97 and 101 of the 103 participating laboratories, respectively. For the third positive sample within the current distribution, # 1625362, which contained a relatively low amount of *L. pneumophila* target organisms ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL), only 67 of the 103 participants reported a correctly positive result.

With an amount of 10^3 CFU/mL of *L. pneumophila*, the lower limit of detection of appropriate test systems is obviously reached and so the results for the latter sample were not considered in the course of issuing the certificates.

Since the amount of target organisms in *L. pneumophila*-positive samples # 1625361 and # 1625364 could not be considered as “extremely low”, false-negative results should encourage the participants to review and optimize the workflow and concept of their individual *L. pneumophila*-specific PCR/NAT assays.

Sample # 1625363, which contained only *E. coli*, was classified as false-positive by one laboratory. This is probably due to contamination events in the course of sample preparation or PCR/NAT amplification. All participants have included inhibition controls in their test systems and no significant inhibitions of the PCR/NAT reactions were observed or reported.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: sample # 1625373 contained $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL, sample # 1625372 contained $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL and sample # 1625371 contained $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL. Sample # 1625374 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. Almost all participants reported

correct results for the negative sample # 1625374, and for the positive samples # 1625372 and # 1625373. Reporting a false-negative result for sample # 1625372 should prompt a thorough re-evaluation of the performance of the test system.

Sample # 1625371, containing a relatively low amount of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis target organisms ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) was correctly identified as “positive” by 18 of the 21 participants. Inhibitoric components in the sample matrix or events during 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 (# 1625382; only *E. coli* cells), and three samples positive for *L. monocytogenes* (# 1625381, # 1625384 and # 1625383). The *Listeria monocytogenes*-containing samples (# 1625381 with 5×10^5 CFU/mL of *L. monocytogenes* and # 1625384 with 5×10^4 CFU/mL of *L. monocytogenes*) were correctly reported positive by all participants. In addition, the “negative” *E. coli* containing sample # 1625382 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 # 1625383, containing only 5×10^3 CFU/mL of *L. monocytogenes*. Only one of the 36 participants has observed a false-negative result for this weak positive sample.

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

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA DNA in typical clinical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we 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 # 1625393 of the current distribution contained a *S. aureus* (MSSA, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Correct (negative) results were reported by 297 of the 305 participating laboratories. The participant who reported “questionable” for sample # 1625393 indicated the use

of an assay concept for the independent detection of the *mecA* gene and a *S. aureus* species marker gene. Some of the 7 participants who reported (false-) positive MRSA PCR results listed the use of in-house or commercial assay concepts relying on the quantitative detection of the *mecA* and *S. aureus* target genes.

One sample of the current set (# 1625391) contained an oxacillin-sensible CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-positive, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Correct (negative) results were reported by 299 of the 305 participating laboratories. Assuming a simultaneous processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the “negative” sample by target organisms or PCR products of the positive samples 2 or 4 is obvious.

False positive results for samples # 1625391 and/or # 1625393 should encourage the affected participants to review and optimize his DNA extraction procedure and/or the MRSA specific NAT-based test system.

Sample # 1625394 contained a typical cMRSA or CA-MRSA isolate (MRSA, PVL-positive, spa:t 310; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 303 of 305 participating laboratories.

One sample of the current set (# 1625392) contained a relatively high number of a yet atypical **methicillin resistant *S. aureus* isolate** (clinical MRSA isolate with an “exotic” SCCmec cassette type IV, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). As expected, the latter organisms were not reliably detected by a number of in-house SCCmec-based assay concepts and they were also missed by some of the current commercial tests. MRSA strains containing weird MREJ variants are admittedly rare and hence false-negative results were not counted in the course of issuing the certificates. By the way, **MREJ** refers to the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) right-extremity junction. MREJ comprises the right extremity of SCCmec, the SCCmec integration site, and the staphylococcal *orfX* gene.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported correct PCR/NAT results for MRSA. This indicates the implementation of efficient sample workup and DNA extraction procedures, functioning of individual prevention measures to avoid the risk of contamination and carry-over events, as well as sensitive and specific PCR/NAT assay concepts for the detection of MRSA among the broad spectrum of our international EQAS participants.

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 124 of the 305 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 et al. (2005) [2] or Witte et al. (2005) [3]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at: Reischl et al. (2007) [4]. In addition, commercial real-time PCR assays reliably targeting PVL-genes in MRSA and MSSA isolates are available from a number of

diagnostic companies in the meantime (for example: r-biopharm or TIB Molbiol).

RV 540: Chlamydia pneumoniae

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

To assess the analytical sensitivity of the NAT-assays used by the individual participating laboratories, the current set of QC samples contained a kind of dilution series of *C. pneumoniae* organisms in the sample matrix: sample # 1625402 contained about 5×10^5 IFU/mL, sample # 1625401 about 5×10^4 IFU/mL and sample # 1625403 about 5×10^3 IFU/mL of *C. pneumoniae*-positive human cells. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1625404 of the current set.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 13), all but one participant reported correct results for the positive sample # 1625402. 106 of the 108 participants also reported correct positive results for sample # 1625401, and also for the sample with the lowest amount of *C. pneumoniae* (# 1625403; 5×10^3 IFU/mL) 100 correct results were reported. Only two participants reported false-positive results for the "negative" sample # 1625404 (*E. coli*). Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 541: Mycoplasma pneumoniae

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

The current set of QC samples contained two positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1625414 and a lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^3$ genome copies/mL) was present in sample # 1625411. Sample # 1625412 was designed to monitor assay specificity: it contained a considerable amount of *M. genitalium* ($\sim 10^4$ genome copies/mL) as a related species to the target organism. The set was completed by sample # 1625413, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. Similar to the result constellations observed with past distributions of our external quality assessment schemes for *Mycoplasma pneumoniae* PCR/NAT detection, the availability of well-established commercial or in-house PCR/NAT-assays has led to a high percentage of correct results. With the exception of one laboratory, all 139 participants correctly reported sample # 1625413 as negative. The *Mycoplasma pneumoniae*-containing samples (#1625411 and # 1625414) were correctly reported by 118 and 122 of the 123 participants, respectively. Sample # 1625412 contained *M. genitalium* ($\sim 10^4$ genome copies/mL), and was erroneously reported positive by five laboratories. This may indicate lacking species-specificity of the test systems and trigger further investigations.

RV 542: Coxiella burnetii & Bacillus anthracis

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

The current set of QC samples (Tab. 1 in (Attachment 1, p. 15) contained two samples with different amounts of *C. burnetii* organisms ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL in sample # 1625424 and $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1625421), one sample with $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL of *B. anthracis* (sample # 1625421) and one sample with $\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL of a *B. anthracis* Pasteur Strain (sample # 1625423). Sample # 1625422 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

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

Coxiella burnetii: The relatively high amount (1×10^4 genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1625421 was correctly reported by all participants. The ten-fold lower concentration of the pathogen in sample # 1625424 was correctly identified as “positive” by 34 of the 36 participating laboratories. False-negative or questionable results should prompt a reassessment of the performance of the test system used and evaluation of processes regarding sample workup and analysis. The two “negative” samples (# 1625422 contained only *E. coli* and # 1625423 contained only *B. anthracis*) were correctly reported as 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: All participants correctly reported negative results for the samples # 1625422 and # 1625424 which did not contain the target organism. The “positive” sample # 1625421 containing $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL *B. anthracis* strain “UR-1” was correctly reported by 16 of the 17 participants. The questionable result we received for this sample should definitely prompt investigations regarding sample workup and performance of the test system, as the amount of the target organism in the sample is still above the lower limit of detection.

With the exception of two participants, the second positive sample # 16225423 ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL of *B. anthracis* strain “Pasteur”) was correctly reported. This particular strain is positive for the virulence plasmid pXO2 and the *B. anthracis*-specific markers *rpoB* and *dhp61*, but does not harbor “lethal and edema factor” encoding plasmid pXO1 and is therefore also negative for the commonly used pathogenicity marker *pagA* (coding for the “Protective Antigen”) After this round of external quality assessment, “standardized samples” are again available for colleagues who are interested in obtaining *B. anthracis* DNA-positive material for assay validation purposes. Requests for backup samples should be addressed to the EQAS coordinator (U. Reischl).

RV 543: Francisella tularensis

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is 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 (Tab. 1 in Attachment 1, p. 17) contained three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis* spp. *holarctica* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1625432, an approximately ten lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1625431, and a relative high amount of *Francisella*

tularensis spp. *tularensis* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1625434. Both samples with the highest amount of target organism (# 1625432 and # 1625434) were correctly identified as “positive” by all but one participant (Tab. 2 and 3 in Attachment 1, p. 17). Even with pathogen amounts of $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL (sample #1625431) 19 out of 21 labs were able to detect *Francisella* DNA. Two false-positive results were observed for the “negative” sample # 1625433 – this should be thoroughly evaluated, given the clinical consequences of a false-positive result! 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 in a sample harbouring even non-target DNA as it is given in clinical specimens.

RV 544: Carbapenemase genes

The concept of this novel EQAS panel for the detection of carbapenemase genes is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for molecular resistance testing or the direct detection of carbapenemase genes from DNA preparations of *Enterobacteriaceae* culture isolates. Because of the methodologically challenging design of EQAs for the molecular resistance testing of the wide range of known carbapenemase coding genes in different bacteria, the panel is narrowed down to a small selection of the currently most common carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae*: KPC, VIM, OXA-48-like genes, GES carbapenemases, NDM, IMP, and GIM. As shown in Tab. 1 (Attachment 1, p. 18), the current set contained three samples with different carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1625441 contained *Klebsiella oxytoca* with a KPC-3 and VIM-1 genes ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), sample # 1625442 contained an *Klebsiella pneumoniae* isolate with a NDM-1 and OXA-48 genes ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), and sample # 1625443 contained an *Klebsiella pneumoniae* isolate with a OXA-232 gene, which belongs to the OXA-48-like gene family ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL). The fourth sample # 1625444 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes.

All participants reported sample # 1625441 (*K. oxytoca* carrying KPC-3 and VIM-1 carbapenemase) as “carbapenemase positive”, although one participant did not detect VIM-1 and another reported the isolate OXA-positive. Notably, all participants were able to detect carbapenemase genes in sample # 1625442 (*K. pneumoniae* carrying NDM-1 and OXA-48), but again three laboratories missed the NDM-1 gene and one laboratory reported presence of VIM-1. The third “positive” sample # 1625443 (containing *Klebsiella pneumoniae* with a OXA-232 gene) was correctly reported by 58 of the

63 participants. A false-negative result for this sample should prompt investigations regarding the coverage of carbapenemase genes by the test system used.

RV 545: *Clostridium difficile*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *C. difficile* DNA in typical sample material**. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. The lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained two *Clostridium difficile*-positive samples: sample # 1625453 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL, and sample # 1625452 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL. Samples # 1625451 and # 1625454 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. The “positive” samples # 1625452 and # 1625453 were correctly reported as “positive” by 102 of the 103 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 # 1625451, 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 # 1625454 with no target organism was correctly identified as negative by all participants. 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. The current set of QC samples contained this time two vancomycin-resistant Enterococcus strains: *Enterococcus faecium* vanA (# 1625463, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and an *Enterococcus gallinarum* vanA and vanC positive strain (# 1625461, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1625464 contained *Enterococcus faecium* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and sample # 1625462 contained no target organisms but human cells and *E. coli* cells. All of the 39 participating laboratories reported correct results for the “positive”

sample 1625463. The vanA and vanC-positive *E. gallinarum* strain was also correctly reported as “vancomycin-resistant” by 37 of the 39 participants. 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 #1625462 and # 1625464, 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 suitable clinical sample material**. With the development of diagnostic material similar to clinical samples 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 two positive specimens (see Tab. 1 in Attachment 1, p. 22). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1625602, and an approximately hundredfold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 5 \times 10^3$ genome copies /mL) was present in sample # 1625603. The set was completed by samples # 1625601 and # 1625604 which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. Sample # 1625602, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL) and sample # 1625603 with a hundred-fold lower concentration of *P. jirovecii* were reported “positive” by 96 and 83 of the 96 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 “negative samples” (# 1625601 and # 1625604, containing only *E. coli*) were correctly classified “negative” by 94 and 95 participants, respectively. 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/2017-8/lab000024.shtml>
 1. Anhang1_lab000024.pdf (435 KB)

Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)”
November 2016

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

References

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologe*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukocidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 24:1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

Please cite as

Reischl U, Schneider W, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttlar H, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2016 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2017;8:Doc01. DOI: 10.3205/lab000024, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000248

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2017-8/lab000024.shtml>

Published: 2017-01-09

Copyright

©2017 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/>.