

„Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT“: Auswertung des Ringversuchs Juni 2017 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
Holger Scholz⁴
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 Ringversuchssproben, dem Sinn und Zweck dieser neuen Möglichkeit zur externen Qualitätskontrolle im Umfeld der Nukleinsäurediagnostik sowie zu den Eckdaten unseres flexiblen Ringversuchskonzepts sei hier auf unsere initiale Veröffentlichung in der Zeitschrift „Der Mikrobiologe“ verwiesen [1]. Gerne werden wir hier auch weiterhin in regelmäßigen Abständen und in ähnlicher Form über die Ergebnislage, Auswertung und Analyse unser zukünftigen Ringversuche berichten.

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

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

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 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 an *C. trachomatis* und geringen Mengen an *N. gonorrhoeae*-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 ausgesandt, dessen SCCmec-Kassette eine Deletion im Methicillin-Resistenzvermittelnden *mecA*-Gen aufwies. Diese Probe führte Methoden- bzw. Zielsequenz-bedingt bei einem Teil der aktuell eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zu falsch-negativen MRSA-Ergebnissen. 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 16% falsch-positiven MRSA-Ergebnissen erneut die Sinnhaftigkeit und auch Notwendigkeit des im Rahmen der PCR/NAT-Ringversuchsdiskussionen bereits mehrfach thematisierten **begleitenden kulturellen Nachweises von MRSA**. Selbst diejenigen Anwender, die mit ihren PCR-Testsystemen diese Variante zuverlässig detektieren und korrekt als MSSA befunden konnten, sollten sich aufgrund der zuvor erwähnten Vielfalt und der Dynamik von „exotischen“ SCCmec-Kassettentypen 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 532: *Bordetella pertussis*** befanden sich relativ hohe Mengen eines klinischen *Bordetella holmesii*-Isolats, das eine Genkopie des üblicherweise für den *B. pertussis*-Nachweis verwendeten IS481 Insertionselements aufweist. Auch solche Varianten können in unseren Breiten durchaus vorkommen und führten im Rahmen des aktuellen Ringversuchs bei zahlreichen Teilnehmern (bzw. bei den von ihnen eingesetzten Testsystemen) zu falsch-positiven PCR-Ergebnissen für *B. pertussis*.

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 aktuellen Ringversuch scheint dies insbesondere für solche Isolate zu gelten, die Kombinationen unterschiedlicher Carbapenemase-Gene aufweisen. Im Umfeld der molekularen Testung von Carbapenemase-Genen unterstützt uns ja Frau Dr. Agnes Anders vom Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger in Bochum weiterhin 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**: 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 4er-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 ;-)

Untersuchungsergebnisse Juni 2017

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 # 1715302 und Probe # 1715314), *Neisseria gonor-*

rhoeae (Probe # 1715303), *Helicobacter pylori* (Probe # 1715334), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 1715354), *Legionella pneumophila* (Probe # 1715363), *Salmonella enterica* ser. typhimurium (Probe # 1715372), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1715403) sowie *Francisella tularensis* (Probe # 1715432).

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 (z.B. 50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR-Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

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

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

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

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

einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt in einer Art Verdünnungsreihe jeweils eine Probe mit ca. 5×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1715303), eine Probe mit ca. 1×10^4 IFU/mL (# 1715301) und eine Probe mit ca. 5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1715302), sowie eine Probe mit einer relativ geringen Menge von ca. 5×10^2 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* (# 1715303) und eine Probe mit ca. 1000-fach höherer Menge an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1715302; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL).

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

Auch wenn die etwas schwächer positive Probe # 1715302 des aktuellen Ringversuchs nur mit ca.

5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fand sich unter den von insgesamt 237 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* diesmal nur ein einziges falsch-negatives Ergebnis. Bei den beiden ca. 2- und 10-fach stärker CT-positiven Proben # 1715301 und # 1715303 des aktuellen Probensets wurden von den 237 Teilnehmern diesmal nur insgesamt ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Da hier von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den einzelnen falsch-negativen Ergebnissen vermutlich um Ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“. Die betreffenden Teilnehmer führten auf ihren Ergebnisformularen die Verwendung von kommerziellen und IVD-gelabelten Testsystemen an, mit denen aber viele andere Teilnehmer die *C. trachomatis*-Zielorganismen in den entsprechenden Proben problemlos nachweisen konnten...

Für die *C. trachomatis*-negative Probe # 1715304 wurden aus dem gesamten Teilnehmerfeld ebenfalls nur zwei falsch-positive Ergebnisse berichtet.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die beiden positiven Proben # 1715302 und # 1715303 (*N. gonorrhoeae*; ca. 5×10^5 bzw. 5×10^2 CFU/mL) diesmal jedoch von 15 der insgesamt 237 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA bei der schwach positiven Probe mitgeteilt. Erfreulicherweise wurde die relativ hoch positive Probe # 1715302 von allen bis auf einen Teilnehmer korrekt positiv befundet.

Bei den beiden GO-negativen Proben wurden jedoch von 1 bzw. 6 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse und ein als fraglich klassifiziertes Ergebnis berichtet. Dieser im Vergleich zu früheren Ringversuchsrunden doch überraschend hohe Anteil an falsch-positiven Ergebnissen deutet auf Kontaminationsereignisse oder wie auch immer geartete Template-Nukleinsäure Verschleppungen bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung hin. Vor allem weil im aktuellen 4er-Set die GO-negative Probe # 1715304 (mit den 6 falsch-positiven Ergebnissen) bei sequentieller Abarbeitung unmittelbar auf die beiden GO-positiven Proben folgte. Den betroffenen Laboratorien sollten diese Ergebnisse Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminations-sicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Angesichts der mit 5×10^3 IFU/mL ehrlicherweise nicht als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in der CT-positiven Probe # 1715302 sowie 5×10^2 CFU/mL an Zielorganismen in der GO-positiven Probe # 1715303 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern ebenfalls Anlass zur Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen NAT-gestützten Testsysteme geben.

Da die beobachteten „Sensitivitätsprobleme“ diesmal nur äußerst marginal ausfallen, sich offensichtlich nicht auf bestimmte Testkonzepte eingrenzen lassen und sporadisch durch das ganze Portfolio der eingesetzten

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

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

Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchssproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen, wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden, von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden die *C. trachomatis*-Zielorganismen von allen 7 Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen in den beiden stärker CT-positiven Proben erfolgreich nachgewiesen. Auch in der relativ stark GO-positiven Probe # 1715302 gelang allen Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen der erfolgreiche Nachweis der *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen. Nur bei der sehr schwach GO-positiven Probe # 1715303 (in der zusätzlich noch relativ hohe Mengen an *C. trachomatis* enthalten waren) versagte der Nachweis bei 6 der insgesamt 7 Teilnehmer mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen. Da bei der Erteilung der Zertifikate ja bekanntermaßen ein falsches Ergebnis innerhalb der 4 bewerteten Ergebnisse toleriert wird, werden auch dies-

mal allen 7 Teilnehmern die entsprechenden Zertifikate erteilt.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen der insgesamt 237 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

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

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

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType CT (13x), HAIN Lifescience FluoroType NG (12x), BD Max CT/GC/TV assay (9x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (6x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (5x), SeegeneAnyplex™ II STI-7 Detection (5x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae/C. trachomatis* Real-TM (3x), AmpliSens *C. trachomatis*-FRT PCR Kit (3x), AmpliSens *N. gonorrhoeae*-screen-FRT PCR Kit (3x), QIAGEN artus CT/GC QS-RGQ Kit (2x), Hologic Aptima Combo 2 assay CT/GC (2x), Urethritis basic von fast-track Diagnostics (2x), VERSANT CT/GC DNA 1.0 Assay von Siemens (2x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (2x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (1x), Mikrogen FTD Urethritis plus (1x), Amplex Hyplex STD *Chlamydia* und *Neisseria* (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex PCR-ELISA (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), Genetrac *C. trachomatis/ N. gonorrhoeae* DNA Detection Kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID RDB2110 STD (1x), EUROIMMUN Euroarray STI-11 (1x), AmpliGnost *C. trachomatis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Immundiagnostik Kit (1x) und Liferiver *C. trachomatis/ N. gonorrhoeae* Real Time PCR Kit (1x).

Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems soll in diesem Zusammenhang auch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in Gegenwart von relativ hohen

Mengen an Zielorganismen (bzw. deren Nukleinsäure) die interne Kontrollreaktion aufgrund der „Konkurrenzsituation“ mit der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz durchaus negativ ausfallen kann, obwohl keine Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt. Bei **kombinierten Testsystemen** (Stichwort: Multiplex-PCR) kann ja bekanntlich auch die Gegenwart des einen Erregers oder Zielorganismus in hoher Menge die Nachweisempfindlichkeit für den gleichzeitigen Nachweis des/der anderen Erreger oder Zielorganismen im Multiplex-Reaktionsansatz negativ beeinflussen. Bei bestimmten suboptimal abgestimmten PCR/NAT-Testsystemen könnte die Zusammensetzung der Probe # 1715303 des aktuellen Ringversuchs eine solche Problemkonstellation repräsentieren und in der Konsequenz die etwas schlechteren Richtigkeitsquoten für den Gonokokken-DNA-Nachweis erklären.

RV 531: Chlamydia trachomatis

Das Probenaset des aktuellen Ringversuchs enthielt diesmal eine Probe mit ca. 5×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1715313), eine Probe mit ca. 1×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1715311), eine Probe mit ca. 5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1715314), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1715312), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tab. 2 (Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den insgesamt 97 Teilnehmern bei der negativen Probe # 1715312 sowie bei allen drei *C. trachomatis*-positiven Proben (# 1715311, # 1715313 und # 1715314) diesmal durchwegs korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Die markante Übereinstimmung der aktuellen Ergebniskonstellation mit den Beobachtungen und hervorragenden Richtigkeitsquoten vorhergegangener Ringversuche mit ähnlicher Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen kann erneut als Beleg für eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz der eingesetzten Testsysteme sowie der aktuellen Kits und automatisierten Testplattformen zur Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Prozessierung angesehen werden.

Auch wenn mit ca. 5×10^3 IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht erreicht oder unterschritten sein sollte, stehen mit den Rückstellproben dieses Ringversuchs RV 531 Juni 2017 den Teilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität wieder geeignete Sets zur Überprüfung und Optimierung ihrer jeweiligen NAT-gestützten Testsysteme zur Verfügung. 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 der insgesamt 97 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen

schen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in-house*-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf erfreulich hohem Niveau. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (5x), BD Max CT/GC/TV assay (3x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (3x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (2x), GenID RDB 2110-STD (2x), Genetrac DK-CHT *C. trachomatis* DNA Detection Kit (2x), Seegene Allplex STI Essential Assay (1x), VERSANT CT/GC DNA 1.0 Assay von Siemens (1x) und EUROIMMUN Euroarray STI-11 (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 1715321; *B. pertussis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), eine Probe mit einem **IS481-positiven klinischen Isolat von *Bordetella holmesii*** (# 1715323 mit 1×10^5 CFU/mL), und eine Probe mit *Bordetella parapertussis* (# 1715324 mit 1×10^5 CFU/mL) als verwandten Spezies. Die Probe # 1715322 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

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

Wie schon im letzten Ringversuch bereitete der spezifische Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in der Probe # 1715321 den insgesamt 155 Teilnehmern keine allzu großen Schwierigkeiten. Die 7 Teilnehmer mit falsch-negativem *B. pertussis*-Ergebnis bei Probe # 1715321 verwundern etwas, aber vor einer kritischen Bewertung werden wir hier erst mal die Ergebniskonstellationen der kommenden Ringversuchsrunden abwarten. Im RV 532 befand sich diesmal wieder ein IS481-positives *Bordetella holmesii*-Isolat, das (Methoden- bzw. Zielsequenz-bedingt) mit einigen *B. pertussis*-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagierte. Diese Problematik spiegelt sich beispielsweise in einer Veröffentlichung französischer Kollegen wider [2].

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

dürftige“ Symptomatik hervorzurufen. Eine Abgrenzung zu den übrigen (IS481-negativen) *Bordetella*-Spezies muss jedoch aus diagnostischer Sicht stets gewährleistet sein (siehe Ringversuchsdiskussion April 2011).

Angesichts der üblicherweise sehr hohen Richtigkeitsquoten für *B. pertussis*-positive Ringversuchsproben und der technisch bzw. methodisch bei der Verwendung der IS481-Zielsequenz zu erwartenden Kreuzreaktion mit *B. holmesii* in Probe # 1715323 hat sich der Ringversuchsleiter (in enger Abstimmung mit dem Sollwertlabor) dazu entschlossen, bei der Erteilung der Zertifikate die falsch-positiven Ergebnisse bei *B. holmesii* nicht als falsch-negativ zu bewerten. Die 5 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der *B. parapertussis*-positiven Probe # 1715324 und die 2 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der „negativen“ Probe # 1715322 sollten jedoch intensiv daran arbeiten, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen Testsysteme zu verbessern.

Im Rahmen der genaueren Auswertung der mitgeteilten Ergebnisse sollte der Vollständigkeit halber noch angemerkt werden, dass der RIDAGENE *Borrelia* PCR-Testkit (r-biopharm) neben dem qualitativen Nachweis offenbar auch eine spezifische Differenzierung von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. holmesii* leisten kann. Von den entsprechenden Teilnehmern wurde hier zumindest durchwegs die korrekte Speziesinformation mitgeteilt. Inhibitionskontrollen wurden von 154 der insgesamt 155 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsergebnisse wurden bei dem aktuellen Probenset bei keinem der Teilnehmer innerhalb der jeweils ausgesandten vier Einzelproben beobachtet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete knapp die Hälfte der Teilnehmer (n=57) selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifizierte kommerzielle Testkits (n=51) mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 54 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 4 Teilnehmern die Verwendung des Pertussis-Toxin-Gens und von 3 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit (11x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Autoimmun Diagnostika Gen ID Tests (4x), Seegene Anyplex II RB5 Detection (4x), Seegene Allplex Respiratory Panel 1 (2x), Ingenetix Bacto Real *B. pertussis/B. parapertussis* (2x), BioMerieux ARGENE *Bordetella* R-gene (2x), Attomol *Bordetella* Realtime LT (2x), Sacace Biotechnologies *B.pertussis/B.parapertussis/B.bronchiseptica* Real-TM (2x), fast-track Diagnostics *Bordetella* (1x), Meridian Bioscience illumigene Pertussis (1x), Bio-Evolution RT PCR kit *B. pertussis/parapertussis* (1x), Genetrac *B. pertussis* DNA Detection Kit (1x), AmpliSens *Bordetella* multi FRT PCR Kit (1x), Altona diagnostic RealStar *Borde-*

tella PCR Kit (1x), Qiagen RespiFinder RG Panel (1x) und PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit einer sehr hohen Menge an Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1715331; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1715332; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1715334, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1715333), die nur humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden alle drei *H. pylori*-positiven Proben (# 1715331, # 1715332 und # 1715334) von allen der insgesamt 50 Teilnehmer als richtig-positiv bewertet. Lediglich ein Teilnehmer berichtete bei der schwach positiven Probe # 1715334 ein falsch-negatives Ergebnis. Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Für das aktuelle Probenset wurden bei keinem der Teilnehmer falsch-positive PCR/NAT-Ergebnisse durch Kreuzreaktionen o.ä. beobachtet. Inhibitionskontrollen wurden von 49 der insgesamt 50 Teilnehmer durchgeführt und von keinem Teilnehmer wurden Inhibitionsergebnisse bei den 4 Einzelproben beobachtet.

Sowohl die kommerziellen, als auch die eigenentwickelten Testsysteme schnitten im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab. So erreichten die *in-house* Testsysteme wie auch die kommerziellen Assays Richtigkeitsquoten von annähernd 100%, was die richtig-positiven und die richtig-negativen Ergebnisse betrifft.

Bis auf 27 Teilnehmer mit spezifizierten kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 1x LightMix Kit von TIB Molbiol und 1x Amplidiag *H. pylori*+ClariR von MOBIDIAG 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 39 der insgesamt 50 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 (# 1715341: *E. coli*, **stx_{2d}-positiv**) und mit ca. 1×10^4 CFU/mL (# 1715342: *E. coli*, *stx₁*-, *stx₂*-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv) und eine Probe mit 1×10^5 CFU/ml eines *Shigella sonnei*-Isolats (# 1715343). Probe # 1715344 enthielt einen *E. coli*-Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ).

Bis auf das EHEC-Isolat mit **stx_{2d}** waren im aktuellen Ringversuch keine wirklich „exotischen“ Shiga-Toxin-Gene vertreten, sodass, begründet auf die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC, bei allen Proben durchwegs hohe Richtigkeitsquoten – sowohl für positive, als auch für negative Befunde – verzeichnet werden konnten. Die beiden EHEC-haltigen Proben # 1715341 bzw. # 1715342 wurden jeweils von 124 bzw. 125 der insgesamt 133 Teilnehmer als richtig-positiv berichtet. Eine naheliegende Erklärung für die 8 falsch-negativen Ergebnisse bei der *stx₁*-, *stx₂*-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1715342 gibt es aus Sicht der Ringversuchsauswertung definitiv nicht. Dieses Isolat war in relativ hoher Menge in dem Probenmaterial vorhanden und wies auch nahezu die gesamte „Klavatur“ der klassischen EHEC Toxingene und Pathogenitätsfaktoren auf. Die 7 falsch-negativen sowie 2 fragliche Ergebnisse bei dem nur *stx_{2d}*-positiven aber *hly*- und *eae*-negativen EHEC-Isolat in Probe # 17153421 können mit einer unzureichenden Testspezifität oder -Abdeckung von unterschiedlichen Shiga-Toxin-Genen begründet sein. Bei genauerer Berachtung der aufgeschlüsselten Ergebnislage in Tab. 3 (Anhang 1, S. 7) dieses Ringversuchs fällt aber erfreulicherweise auf, dass alle der von den Anwendern spezifizierten kommerziellen Testkits sowie die meisten der eingesetzten *in-house* PCR/NAT-Assays das *stx_{2d}*-Gen (zumindest prinzipiell) gut erfassen.

Hier eine kleine informative Randnotiz von Herrn Prof. Dr. Alexander Mellmann aus dem Nationalen Konsiliarlaboratorium für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS) in Münster zur Relevanz des *stx_{2d}*-Gens: Zwei Publikationen [4], [5] beschreiben *stx_{2d}* erstmals; davon sind die *stx_{2d}*-Subtypen, die durch intestinalen Mukus aktivierbar sind, häufiger mit schweren Erkrankungen assoziiert [6]. Diagnostisch lassen sich diese beiden Arten nur schwierig unterscheiden – die Unterschiede liegen am Ende der A-Untereinheit [7] und werden wahrscheinlich nicht durch die üblichen diagnostischen PCR-Testkonzepte er-

fasst. *Stx_{2d}* ist häufig mit O91:H21-Isolaten assoziiert; auch in der aktuellen HUSEC-Kollektion sind mehrere Isolate mit *stx_{2d}* vorhanden was u.a. auch als Beleg für die klinische Relevanz des *stx_{2d}*-Subtyps gewertet werden kann.

Die Probe # 1715344 (*E. coli*-Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde diesmal von allen bis auf einen der insgesamt 133 Teilnehmer korrekterweise als negativ befundet. Probe # 1715343, welche in der aktuellen Ringversuchsrunde ca. 1×10^5 CFU/ml eines eines *Shigella sonnei*-Isolats enthielt, wurde erfreulicherweise von 127 der insgesamt 133 Teilnehmer korrekt als negativ für EHEC/STEC befundet.

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 132 der 133 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsereignisse wurden in keinem Fall beobachtet. Zudem wurden von 112 Teilnehmern die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin (*eae*)- und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt. Lediglich zwei Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives *eae*-Ergebnis.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol Light-Mix modular *stx*-1/*stx*-2/*eae* (6x), BD Max Enteric Bacterial Panel (4x), Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (2x), Sacace Biotechnologies EHEC Real-TM (1x), Biomerieux BioFire (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Assays (1x), fast-track Diagnostics (1x) und SureFood pathogen STEC screening PLUS von Congen (1x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Nachdem die Probenauswahl des letzten Ringversuchs mehr auf die analytische Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzielte, wollten wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Prüfung der analytischen Sensitivität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchproben enthielt somit eine Probe mit einer hohen Menge an *Borrelia garinii* OspA Typ3 (# 1715353, $\sim 5 \times 10^5$ Orga-

nismen/mL), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 1715351, $\sim 5 \times 10^4$ Organismen/mL) und eine Probe mit relativ geringer Menge (# 1715354, $\sim 5 \times 10^3$ Organismen/mL). Probe # 1715352 enthielt lediglich signifikante Mengen eines *E. coli* K12-Stammes.

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

Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen:

Die Detektion von *Borrelia garinii* in den Proben mit relativ hoher Erregerlast (# 1715353 mit $\sim 5 \times 10^5$ Organismen/mL bzw. # 1715351 mit $\sim 5 \times 10^4$ Organismen/mL) bereitete lediglich 2 bzw. 4 der insgesamt 127 Teilnehmer gewisse Probleme, sodass für beide Proben erfreulich hohe Quoten richtig-positiver Ergebnisse erreicht werden konnten. Bei einer erneut ca. zehnfach geringeren Erregerlast von $\sim 5 \times 10^3$ *Borrelia garinii*-Organismen/mL (Probe # 1715354) wurde bereits von 13 der insgesamt 127 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis berichtet. Ein Teilnehmer beobachtete mit seinem Borrelien-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen ein positives Ergebnis bei der negativen Probe # 17153512, die diesmal keine non-Borrelia Spirochäten sondern lediglich humanes Zellmaterial und signifikante Mengen eines *E. coli* K12-Stammes enthielt. Hier könnte es sich eventuell um eine Verschleppung von Borrelien-positivem Material aus der positiven Probe „1“ während der Aufarbeitung und DNA-Isolierung handeln.

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von 126 der 127 Teilnehmer 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 Borrelien-DNA verwendet, kommerzielle Testsysteme wurden von 73 der 127 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerzi-

ellen und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 97%) zu beobachten. Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *B. burgdorferi* PCR Kit (16x), HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (4x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (3x), Attomol *B. burgdorferi* Realtime LT (3x), BIORON RealLine *Borrelia* Kit (2x), Sacace Biotechnologies *B. burgdorferi* Real-TM (2x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (1x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (1x), DYNEX Real Time PCR *B. burgdorferi* (1x), Genetrac *B. burgdorferi* DNA Detection Kit (1x) und KITGEN *Borrelia* Kit (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 in einer Art von Verdünnungsreihe: Probe # 1715361 mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), Probe # 1715364 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) und Probe # 1715363 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL). Probe # 1715362 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Letztere (negative) Einzelprobe wurde erfreulicherweise von 117 der insgesamt 119 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Zwei Teilnehmer berichteten 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 sind die falsch-positiven *L. pneumophila* Befunde hier durch laborinterne Kontaminationseignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung bedingt.

Die relativ stark positive Probe # 1715361 mit ca. 5×10^4 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG2 wurde von allen 119 Teilnehmern korrekterweise als positiv interpretiert. Die etwa 10-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 1715364 (ca. 5×10^3 CFU/mL) konnte noch von 106 Teilnehmern korrekt als positiv identifiziert werden, allerdings wurden hier bereits schon 12 falsch-negative Ergebnisse berichtet und ein Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis als „fraglich“. Um die Grenzen der analytischen Sensitivität auszuloten, enthielt die Probe # 1715363 eine sehr geringe Menge an Zielorganismen (ca. 5×10^2 CFU/mL). Für diese Probe wurden nur 62 richtig-positive Ergebnisse von den insgesamt 119 Teilnehmern berichtet. Neben 62 falsch-negativen Ergebnissen wurden die Ergebnisse bei 2 Teilnehmern als „fraglich“ bewertet.

Aufgrund der geringen Erregeranzahl in Probe # 1715363 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 # 1715364 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 78 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 (7x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (5x), Mikrogen Diagenode Lpn-050 Kit (4x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (4x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (1x), Gerbion diarella *Legionella* real time PCR Kit LC und TM (1x), AnDiaTec *L. pneumophila* RT PCR Kit (2x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE detection (2x), Seegene Anyplex II RB5 Detection (1x), r-Biopharm RIDAGENE *Legionella* (1x), Luminex NxTAG Respiratory pathogen panel (1x), ARGENE *Legio pneumo/Cc r-gene* (1x), ARGENE Amp-Mix (1x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), KITGEN *L. pneumophila* Kit (1x), Sacace Biotechnologies *L. pneumophila* Real-TM (1x), Genetrac *L. pneumophila* DNA Detection 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 Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1715371; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1715374; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), sowie eine Probe mit etwa hundert-

fach geringerer Menge (#1715372; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL). Die vierte Probe des Sets (# 1715373) enthielt keine Zielorganismen sondern ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Vergleichbar mit manch früherer *Salmonella enterica* PCR/NAT-Ringversuchen waren diesmal nur zwei falsch-positive Ergebnisse bei der „negativen Probe“ # 1715373 zu beobachten. Dies deutet auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 27 Teilnehmern durchwegs korrekte Ergebnisse bei der Probe # 1715371 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen mitgeteilt. Lediglich die etwas schwächer positive Probe (# 1715374; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) wurde von zwei Teilnehmern falsch-negativ befundet und bei der sehr schwach positiven Probe # 1715372 (*Salmonella enterica* ser. Typhimurium, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) wurden 6 falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. 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 (4x), fast-track Diagnostics (1x), Mikrogen Diagenode Gastroenteritis Bacteria Panel (1x), KITGEN *S. enterica* Kit (1x) und Genetrac *S. enterica* DNA Detection Kit (1x). In enger Abstimmung mit unserem Sollwert-Laboratorium (Dr. U. Busch, Dr. U. Messelhäußer, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim) werden wir weiterhin versuchen, ab und an ein etwas exotischeres Serovar von *Salmonella enterica* zu versenden und zumindest eine der 4 Proben mit einer relativ geringen Menge an Zielorganismen zu versetzen – auch wenn im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften und/oder Richtlinien der einzelnen Fachgesellschaften derzeit noch keine genauen unteren Nachweisgrenzen für den NAT-gestützten Salmonellen-Nachweis festgelegt wurden.

RV 538: *Listeria* spp.

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

Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden, wie in dieser Ringversuchsrunde, auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein – so wie im Fall der Probe # 1715384, die diesmal ca. 5×10^4 CFU/mL an *Listeria ivanovii* enthielt. Probe # 1715381 des aktuellen Sets enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 5×10^4 CFU/mL), die erfreulicherweise von allen der insgesamt 46 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1715383 enthielt mit ca. 5×10^3 CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Lediglich ein Teilnehmer berichtete hier ein falsch-negatives Ergebnis. Erfreulicherweise wurde auch die Probe #1715382, welche ausschließlich humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt, von allen Laboratorien als „negativ“ befundet, was erneut für eine sehr gute Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden Laboratorien spricht.

Wie bereits in vorangegangenen Ringversuchsrunden wurden von den Teilnehmern ganz überwiegend *Listeria monocytogenes*-spezifische Testsysteme eingesetzt ($n=35$). Dies spiegelte sich in der Probe # 1715384 wider, welche eine signifikante Menge an *L. ivanovii* (5×10^4 CFU/mL) enthielt. Zehn der insgesamt 11 Teilnehmer mit explizit *Listeria* spp.-spezifischen Testsystemen berichteten diese Probe korrekt als positiv. Im Umkehrschluß spricht diese Datenlage jedoch für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung: hält ein Teilnehmer lediglich ein **L. monocytogenes-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben, und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Von allen 46 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: Progenie RealCycler *Listeria* spp. (2x), Sacace Biotechnologies *L. monocytogenes* Real-TM (1x), Liferiver *L. monocytogenes* Real Time PCR Kit (1x), fast-track Diagnostics Real Time Neonatal sepsis (1x), Genetrac *L. monocytogenes* DNA Detection Kit (1x), AmpliSens *L. monocytogenes* PCR Kit (1x) und QIAGEN mericon *Listeria* spp Kit (1x).

RV 539: MRSA

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

Wie an dieser Stelle bereits mehrfach thematisiert basieren einige der derzeit etablierten eigenentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum Direktnachweis von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern, Staphylokokkenspezies-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen in der entsprechenden Nukleinsäurepräparation. Da sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken das *mecA*-Gen für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Aussagekraft dieser PCR-gestützten Testsysteme für den Direktnachweis von MRSA aus nativem Patientenmaterial eingeschränkt, wenn beim Patienten eine gleichzeitige Besiedelung mit *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. 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 abzu prüfen, befand sich im aktuellen Ringversuch neben einem klassischen und unkomplizierten MRSA-Isolat auch ein derzeit noch eher selten anzutreffendes *mecC* posi-

ves MRSA-Isolat und ein spezielles MSSA-Isolat mit *mecA*-Deletion innerhalb der SCCmec-Kassette.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielten die beiden positiven Proben # 1715391 und # 1715394 diesmal ein typisches MRSA-Patientenisolat (MRSA; PVL-negativ, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL und $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), die Probe # 1715392 jedoch ein in unseren Breiten derzeit noch etwas seltener anzutreffendes **Methicillin-sensibles *S. aureus*-Patientenisolat mit *mecA*-Deletion innerhalb der integrierten SCCmec-Kassette (sog. *mecA* dropout-Mutante)** (MSSA; PVL-negativ; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Die letzte der 4 Proben, # 1715393, enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei den beiden positiven MRSA-Proben # 1715391 und # 1715394 von nahezu allen der insgesamt 302 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund des einen als „fraglich“ klassifizierten und der 3 falsch-negativen Ergebnisse bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden PCR-Testsysteme mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt oder es ging während der Probenaufarbeitung ein gewisser Anteil der Template-DNA bei der DNA-Isolierung oder der Komplettierung der PCR-Ansätze verloren. Angesichts der mit 1×10^5 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse vor allem bei Probe # 1715394 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus begründeten Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Bei der Probe # 1715393, die diesmal ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von je 3 der insgesamt 302 Teilnehmer ein als „fraglich“ klassifiziertes oder ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beobachtet. Hier liegt (auch angesichts der sequenziellen Folge direkt nach den MRSA- bzw. MSSA-positiven Proben das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontaminationsereignisses oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe. Wie bereits mehrfach im Rahmen dieser ausführlichen Ringversuchsdiskussionen erwähnt, sind solche „Ausreißer“ bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion.

Als „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in Probe # 1715392 eine sog. ***mecA* dropout-Mutante** ausgesandt. Bei solchen speziellen MSSA-Isolaten liegt die SCCmec-Kassette zwar im *S. aureus*-Genom integriert vor (d.h. die SCCmec-orfX Übergangsregion, die bei den meisten der derzeit kommerziell erhältlichen MRSA-spezifischen PCR-Testsystemen als molekularer Surrogatmarker für die Anwesenheit eines *mecA*-Gens verwendet wird, ist in diesem Isolat vorhanden), aber innerhalb dieser SCCmec-Kassette ist das Methicillin-Resis-

tenz vermittelnde *mecA*-Gen großteils deletiert und daher phänotypisch nicht mehr funktionell ausgeprägt. Auch wenn solche *mecA* Deletionsmutanten derzeit noch eher selten beobachtet werden, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher MSSA-Isolate geweckt werden, die „leere“ SCC*mec*-Kassetten tragen.

Hier ist natürlich der direkte Vergleich zur Ergebnislage von zwei unserer früheren MRSA-Ringversuche vom November 2012 und November 2015 interessant: damals wurden nämlich die gleichen *mecA* dropout MRSA-Isolate ausgesandt. Im November 2012 konnten von insgesamt 210 Teilnehmern lediglich 63 Teilnehmer (30%) und im November 2015 von insgesamt 314 Teilnehmern bereits 167 Teilnehmer (53%) einen korrekt negativen PCR/NAT-MRSA Nachweis führen. In der aktuellen Ringversuchsrunde wurden bei diesem *mecA* dropout MSSA-Isolat immerhin schon von 254 der insgesamt 302 Teilnehmer (84%) korrekt negative PCR/NAT-Ergebnisse für MRSA berichtet. Ich denke dieser Trend ist sehr erfreulich (sowohl für die betroffenen bzw. davon profitierenden „nicht-isolierungspflichtigen“ Patienten als auch für uns Diagnostiker) und auch überzeugend – selbst ohne hier jetzt großartige Statistik- oder Signifikanz-Algorithmen bemühen zu müssen ;-).

Zugegebenermaßen sind *mecA* dropout-Mutanten (ähnlich wie beispielsweise auch die *mecC* Resistenzgene bei früheren Ringversuchsrunden) unter den MRSA bzw. MSSA Patientenisolaten noch relativ selten und die Ergebniskonstellation dieses Ringversuchs sollte den diagnostischen Wert von SCC*mec*-basierten PCR-Testkonzepten in der mikrobiologischen Praxis nicht schmälern. Ungeachtet des verwendeten Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein positives Ergebnis für die edukative Probe # 1715392 nicht als „falsch“ bewertet. Allerdings sollte bei dem aktuellen MRSA Ringversuch insbesondere ein falsch-negatives Ergebnis für die Proben # 1715391 und # 1715394 oder ein falsch-positives Ergebnis für Probe # 1715393 zum Anlass genommen werden, die analytische Sensitivität bzw. die Kontaminationsanfälligkeit des verwendeten Testsystems kritisch zu hinterfragen.

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind und/oder überprüfen wollen, ob ihr spezifisches Testsystem *mecA* Deletionsmutanten bei SCC*mec*-Kassetten tragenden *S. aureus*-Isolaten erfassen kann, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Darüber hinaus bestätigt das „besondere“ MSSA-Isolat der aktuellen Ringversuchsrunde erneut die Sinnhaftigkeit und auch Notwendigkeit des im Rahmen der PCR/NAT-Ringversuchsdiskussionen bereits mehrfach thematisierten **begleitenden kulturellen Nachweises** von MRSA.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine-Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende (PVL-negative) Ergebnisse der molekularbiologischen PVL-Testung wurden von 92 der insgesamt 302 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme von drei falsch-positiven PVL-Ergebnissen waren diese diesmal durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA- bzw. CA-MRSA-Problematik finden sich beispielsweise unter Linde et al. [8], oder Witte et al. [9]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR-Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in Reischl et al. [10]. 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), Amplex easyplex MRSA (3x), r-biopharm RIDAGENE PVL PCR (1x), GeneProof MRSA PCR Kit (1x), Greiner Bio-One Genspeed MRSA (1x), VELA diagnostics Sentosa SA Direct MRSA Test (1x), AmpliSens MRSA-screen-titre-FRT PCR kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA combi (1x), Congen SureFast MRSA 4Plex (1x) und Diarella MRSA real time PCR Kit TM von Gerbion (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 13) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1715402; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1715404; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml), eine Probe mit geringer Menge (# 1715403; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1715401; 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 alle Teilnehmer die Zielorganismen in der positiven Probe # 1715402 (ca. 5×10^5 IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Auch die zehnfach geringere Menge an Zielorganismen der Probe # 1715404 konnte von 132 der 134 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die sehr geringe Erregermenge in Probe # 1715403 (1×10^4 IFU/mL) wurde noch von 129 teilnehmenden Laboratorien erfasst und korrekt bewertet. Für die Probe ohne Zielorganismen # 1715401 (*Escherichia coli*) dokumentierten 133 der 134 Teilnehmer ein korrektes negatives Ergebnis. Daneben fand sich für diese Probe noch ein falsch-positives Ergebnis. 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 dem isoliert falsch-positiven Ergebnis 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 in keiner der versandten Proben Teilnehmer beobachtet, Inhibitionskontrollen wurden von insgesamt 133 der 134 Teilnehmer durchgeführt. Selbstentwickelte in-house NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 42 Labors eingesetzt, alle weiteren Teilnehmer vertrauten auf kommerzielle Assays. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (9x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bakterien (5x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (4x), ARGENT Chla/Myco pneumo r-gene (3x), AmpliSens *M. pneumoniae*/C. pneumoniae (3x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (3x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 21 (2x), fast-track Diagnostics Respiratory pathogens 33 (1x), Sacace Biotechnologies *M./C. pneumoniae* Real-TM (2x), *M./C. pneumoniae* RG detect von Institute of Applied Biotechnologies (2x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE Detection (2x), Seegene Anyplex RB5 detection (1x), Ingenetix Bacto Real *C. pneumoniae* (1x), Luminex NxTAG Respiratory pathogen panel (1x), Euroclone Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit (1x), r-Biopharm RIDAGENE *C. pneumoniae* (1x), Vircell Speed-oligo *Chlamydomphila pneumoniae* (1x), fast-track Diagnostics Real Time Neonatal sepsis (1x), PathoFinder Respi-Finder 2Smart (1x) und Genetrac *C. pneumoniae* DNA Detection Kit (1x).

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

Aufgrund zahlreicher Rückfragen von Teilnehmern des vergangenen Ringversuchs hier eine wichtige Anmerkung vorab: der Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Mycoplasma pneumoniae* ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an Myco-**

plasma 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.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1715412 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) und Probe # 1715413 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL). Um die Spezifität der Testsysteme abzu prüfen enthielt Probe # 1715414 diesmal nennenswerte Mengen an *Haemophilus influenzae* – eine zum Genus der Zielorganismen *Mycoplasma* verwandten Spezies. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1715411), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen und probenmaterialähnlichen Proteinkomponenten enthielt. Alle der insgesamt 149 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1715412 problemlos und zuverlässig nachweisen. 15 Teilnehmern gelang hingegen der Nachweis des Zielorganismus in der etwas schwächer positiven Probe # 1715413 (ca. 10^4 Genomkopien/mL) nicht. Dies sollte zum Anlass genommen werden, die Sensitivität des verwendeten Testsystems sowie die Prozesse der Probenabarbeitung zu evaluieren. Ein Teilnehmer hat hier sein Ergebnis als „fraglich“ klassifiziert. Bei der Probe # 1715414 mit *Haemophilus influenzae* wurden von 147 Teilnehmern korrekt negative Ergebnisse mit ihren jeweiligen *M. pneumoniae*-spezifischen Testsystemen beobachtet. Bei den 2 falsch-positiven Ergebnissen handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung oder um Kreuzreaktivitäten, die in der Verwendung von Testsystemen mit unzureichender Spezies-Spezifität begründet sind. Aus diesem Grund sollten Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen bei der Probe mit *Haemophilus influenzae* versuchen, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen NAT-Testsysteme zu überprüfen und gegebenenfalls nachzubessern.

Die „negative“ Probe # 1715411, die anstelle von Zielorganismen lediglich *E. coli* enthielt, wurde diesmal von allen Teilnehmern als negativ befundet. Dies deutet auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden (und nicht nur dann, wenn sich diese negative Probe als Nummer 1 innerhalb des so versandten und vermutlich auch so abgearbeiteten 4er-Sets befindet).

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 67 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt, gravierende Unterschiede in den Richtigkeits-

quoten von kommerziellen Testsystemen und „in-house“ Assays waren nicht augenfällig.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 35 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt: LightMix *M. pneumoniae* [n=15], Minerva Biolabs Venor Mp [n=1], AmpliGnost MP PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe [n=5], Diagenode MP/CP [n=7] und r-Biopharm RIDAGENE Mp [n=7], sowie „andere kommerzielle Testsysteme“ [n=67]. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Diagnostics Kits (10x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (8x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bakterien (4x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (4x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (4x), AmpliSens *M. pneumoniae*/C. *pneumoniae*-FRT PCR Kit (3x), *M./C. pneumoniae* RG detect von Institute of Applied Biotechnologies (2x), Sacace Biotechnologies *M./C. pneumoniae* Real-TM (2x), AnDiaTec *M. pneumoniae* RT PCR Kit (2x), Seegene Anyplex RB5 detection (2x), Seegene PneumoBacter ACE detection (1x), Euroclone Duplica Real Time *M. pneumoniae* Detection Kit (1x), Sartorius Microsart AMP Mycoplasma (1x), Vircell Speed-oligo *M. pneumoniae* (1x), Luminex NxTAG Respiratory pathogen panel (1x), Ingenetix Bacto Real Mycoplasma pneumoniae (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x) und Genetrac *M. pneumoniae* DNA Detection Kit (1x).

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

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tab. 1: Anhang 1, S. 15) enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *C. burnetii* ($\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1715423 und $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1715421), eine Probe mit DNA des *B. anthracis* „STI“ Impfstammes ($\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL in Probe # 1715424), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* UR-1 Isolats DNA ($\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1715421), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1715422), 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 *B. 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: Altona diagnostics RealStar Anthrax PCR Kit (3x), Sacace Biotechnologies *C. burnetii* Real-TM (1x), Liferiver *C. burnetii* real time PCR Kit (1x), ThermoFischer LSI VetMAX *C. burnetii* RT PCR Kit (1x) und Bacterial CNS flow chip (1x).

***Coxiella burnetii*:** Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltete sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich. Die etwas stärker positive Probe # 1715421 (mit ca. 1×10^5 Genomkopien *C. burnetii*/mL) wurde von allen der insgesamt 39 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Die zweite positive Probe # 1715423 des Probesets (ca. 1×10^4 Genomkopien/mL von *C. burnetii*) wurde von 38 Labors korrekt berichtet, hier ist allerdings zudem ein fragliches Ergebnis zu registrieren. Dies sollte in dem betroffenen Labor zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems zu hinterfragen und die Prozesse der Probenaufarbeitung ggfs. zu optimieren. Die beiden Proben ohne Zielorganismus (# 1715422 und # 1715424) 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 Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet.

***Bacillus anthracis*:** Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Alle 22 Teilnehmer konnten die beiden Proben mit Zielorganismen (# 1715424 und # 1715421) sowie ohne Zielorganismen (# 1715422 und # 1715423) richtig klassifizieren.

Zur kurzen Rekapitulation: **B. anthracis-Stamm STI** ist positiv für die **B. anthracis-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker rpoB** oder **dhp61** und das **Virulenzplasmid pXO1** (kodiert für Letal- und Ödem-Faktor, sowie Protektives Antigen pagA), jedoch **negativ für das Virulenzplasmid pXO2**. 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 # 1715431 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1715432 mit ca. zehnfach geringerer Menge (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1715434 mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *F. tularensis* spp. *novicida*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1715433), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier fast alle der 26 Teilnehmer die relativ stark positiven Proben # 1715431 (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und # 1715434 (*F. tularensis* spp. *novicida*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) als positiv identifiziert. Die Probe mit der geringsten Erregermenge ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) konnte noch von 18 der 26 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die sieben falsch-negativen Bewertungen sowie das berichtete fragliche Ergebnis sollten Anlass geben, das verwendete Testsystem bzgl. Sensitivität zu evaluieren und ggfs. zu optimieren. Es muss kritisch angemerkt werden, dass in vorausgehenden Ringversuchsrunden auch in Proben mit geringerer Menge des Zielorganismus höhere Richtigkeitsquoten erzielt werden konnten.

Die *F. tularensis*-negative Probe # 1715433 wurde von allen Teilnehmern erfreulicherweise durchgehend als negativ befundet.

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

RV 544: Carbapenemase-Gene

Der seit 2015 in das reguläre Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommene Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Carbapenemase-Gene“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zur molekularen Resistenztestung bzw. dem Direktnachweis von charakteristischen Carbapenemase-Genen aus DNA-Präparationen von Reinkulturen an Enterobacteriaceae** konzipiert. Zum orientierenden Herantasten an die technische Eignung und die „Praktikabilität“ der versandten Probenmaterialien werden wir uns in den ersten Runden dieses methodisch anspruchsvollen Ringversuchs zur molekularen Resistenztestung auf die Abprüfung eines kleinen Spektrums der derzeit häufigsten Carbapenemase-Gene bei *Enterobacteriaceae* beschränken: KPC, VIM, OXA-48 ähnliche Gene, GES-Carbapenemasen, NDM, IMP und GIM. Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 18) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit

Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1715441 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit dem VIM-2-Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL), Probe # 1715442 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit den Genen für KPC-2 und OXA-48 (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL) und Probe # 1715444 enthielt *Serratia marcescens*-Zielorganismen mit dem NDM-1-Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 1715443 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

74 der 77 Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in der Probe # 1715441 fest. Für die Probe mit NDM-1 positiver *Serratia marcescens* (# 1715444) wurden mit einer Ausnahme korrekte Ergebnisse berichtet. Hoch lag die Richtigkeitsquote auch für die Probe # 1715442, hier berichteten 75 Teilnehmer die Probe als „Carbapenemase-positiv“, bei genauerem Hinsehen muss jedoch festgestellt werden, dass sechs Teilnehmern eines der beiden Carbapenemase-Gene (vor allem KPC-2) „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! Dieser letzte Punkt sollte auch für die 2 Teilnehmer mit „falsch-positiven“ Ergebnissen für die Probe # 1715443 beherzigt werden, man bedenke die klinischen Konsequenzen eines fälschlicherweise Carbapenemase-positiv berichteten Enterobacteriaceae-Isolats!

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Direktnachweis von Carbapenemase-Genen Teilnehmer enthielten mit einer Ausnahme 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), AmpliGnost Carbapenemase PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Amplex eazypex SuperBug complete A (1x), Amplex eazypex SuperBug complete B (1x) und GENSPEED SuperBug CR (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 drei positive Proben: Probe # 1715451 mit einer relativ hohen Menge an *Clostridium difficile*, ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1715453

und # 1715454 mit ca. zehnfach geringerer Menge ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1715452), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthält.

Die „hochpositive“ *Clostridium difficile*-Probe # 1715451 wurde erfreulicherweise von allen 130 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ klassifiziert. Auch die beiden Proben mit ca. zehnfach geringerer Erregermenge (# 1715453 und # 1715454) wurden von 128 bzw. 129 Labors korrekt berichtet. Falsch-negative Ergebnisse sollten auch hier zum Anlass genommen werden, das verwendete Testsystem bzgl. analytischer Sensitivität und Spezifität zu evaluieren und auch die laborinternen Prozesse der Probenaufbereitung und -abarbeitung kritisch zu hinterfragen. Letzteres gilt insbesondere für Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen für die lediglich *E. coli*-enthaltende Probe # 1715452. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich. Mit einer Ausnahme wurden Inhibitionskontrollen mitgeführt, eine nennenswerte Inhibition wurde für keine der Proben berichtet.

Wie in Tab. 3 (Anhang 1, S. 20) angegeben, verwendeten der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme, während selbstentwickelte Testkonzepte in 17 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: HAIN Lifescience GenoType CDiff (7x), HAIN Lifescience FluoroType CDiff (2x), r-Biopharm RIDAGENE CD Toxin A/B (6x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (5x), r-Biopharm RIDAGENE *C. difficile* (4x), 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* (1x), Seegene Allplex GI-Bacteria Assay (1x), eazplex *C. difficile* complete Assay (1x), Congen SureFast *C. difficile* 3Plex (1x) und GENSPEED *C. diff* OneStep (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 drei Vancomycin-

resistente *Enterococcus* Stämme: Probe # 1715461 (*Enterococcus faecalis* **van A**, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1715462 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecium* **van B**, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), und Probe # 1715463 (*Enterococcus avium* **van A**, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1715464), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden „positiven“ Proben mit vanA bzw. vanB tragenden *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* (# 1715461 und # 1715462) mit lediglich zwei bzw. 3 Ausnahmen von allen Teilnehmern als „VRE-positiv“ klassifiziert. Immerhin 7 falsch-negative Ergebnisse wurden für den vanA-tragenden *E. avium*-Stamm (# 1715463) eingereicht. Im Falle einer Infektion mit dem Erreger kommt dem korrekten Nachweis einer Vancomycin-Resistenz natürlich eine hohe Bedeutung zu. Wie bereits im vorangegangenen Ringversuch waren alle eingereichten vanA/vanB Differenzierungen korrekt. Die „negative“ Probe # 1715464 wurde erfreulicherweise durchwegs als „VRE-negativ“ berichtet. 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.

Unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: HAIN Lifescience GenoType *Enterococcus* (8x), Roche LightCycler VRE detection Kit (2x), AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz differenz. von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), amplex eazplex VRE (1x), GeneProof VRE PCR Kit (1x) und GENSPEED VanABC plus (1x).

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Der 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. Das aktuelle Set enthielt zwei positive Proben (siehe Tab. 1: Anhang 1, S. 22): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1715601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^5 CFU/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 1715603; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^4 CFU/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1715602 und # 1715604) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen. Der Nachweis des Zielorganismus aus der stärker positiven Probe (# 1715601, ca. 1×10^5 Genomkopien/mL) gelang allen 102 Teilnehmern. Probe # 1715603 mit einer zehnfach geringeren Erregermenge wurde noch von 100 der 102 Teilnehmer korrekt als „positiv“ identifiziert. Für die Teilnehmer mit falsch-negativen/fraglichen Befunden in dieser Ringversuchsrunde bleibt unser Appell unverändert bestehen, die Sensitivität der verwendeten Testsysteme zu hinterfragen, da eine

Erregermenge von 1×10^4 nicht als „äußerst gering“ einzuschätzen ist.

Bei den Proben ohne Zielorganismen (# 1715602 und # 171604), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs von jeweils einem Teilnehmer ein falsch-positives bzw. fragliches Ergebnis berichtet (Tab. 2: 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 *P. jirovecii* (4x), Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (3x), Biolegio ReadyMax Atypical pneumonia-1 Assay (2x), Genetrac *P. jirovecii* DNA Detection 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, Oberschleißheim, Bonn, Dresden, München, Berlin, Bochum und Regensburg bedanken, die nach wie vor hochmotiviert an der praktischen Umsetzung unseres gemeinsamen Vorhabens zur externen Qualitätssicherung mitarbeiten.

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

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2017-8/lab000026.shtml>

1. Anhang1_lab000026.pdf (353 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ Juni 2017

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. *Mikrobiologe*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11
3. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46331-0
4. Piérard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol*. 1998 Nov;36(11):3317-22.
5. Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun*. 1996 May;64(5):1569-76.
6. Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schürk-Bulgrin R, Karch H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis*. 2006 Nov 1;43(9):1160-7. DOI: 10.1086/508195
7. Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun*. 1996 May;64(5):1569-76.
8. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Pantone-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Pantone-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
9. Witte W, Bräulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Pantone-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 24:1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
10. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

Korrespondenzadresse:

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

Bitte zitieren als

Reischl U, Schneider W, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Anders A. „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT“: Auswertung des Ringversuchs Juni 2017 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab.* 2017;8:Doc03. DOI: 10.3205/lab000026, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000265

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2017-8/lab000026.shtml>

Veröffentlicht: 19.07.2017

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/>.

“Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT”: comprehensive discussion of the June 2017 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
Holger Scholz⁴
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 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 June 2017

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

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

The current set of QC samples contained three samples with different amounts of *C. trachomatis* ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL in sample # 1715303, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL in sample # 1715301 and 5×10^3 IFU/mL in sample # 1715302) and two samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1715302 and $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL in sample # 1715303). Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target organisms in the positive sample # 1715302, all but one of the 237 participants reported correct positive CT results. For the two samples with a two- or ten-fold higher amount of *C. trachomatis* (#1715301 and # 1715303), only 1 false-negative result was observed in the current distribution. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by only 15 of the 237 participants for sample # 1715303, which contained a very low number of *N. gonorrhoeae* target organisms (5×10^2 CFU/mL) next to a high amount of *C. trachomatis* (5×10^4 IU/mL). Also 7 false-positive results for the two GO-negative samples were reported by participants. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, contamination events of the "GO-negative" sample "4" by target organism or PCR products of the positive samples "2" and/or "3" is by far

not unlikely in the current sample constellation. So the observation of false-positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their GO-specific NAT-based test system.

Since the amount of target organisms in the GO-positive samples # 1715302 and # 1715303 could not be considered as "extremely low", false negative results should also encourage the corresponding participants to review and optimize their GO specific NAT-based assays (or at least the GO-specific components if they are using multiplex assay concepts).

Inhibition controls were included by all but one of the participants and no inhibitory events were reported. Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity were observed for the *C. trachomatis*- and *N. gonorrhoeae*-specific NAT assays used by the 237 participants.

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

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three positive samples in a kind of dilution series: # 1715313 with $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, # 1715311 with $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, and sample # 1715314 with $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Sample # 1715312 of the current set contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 4), all of the results reported for the negative sample # 1715312 and the three CT-positive samples # 1715311, # 1715313 and # 1715314 were correct.

Also for the *C. trachomatis*-positive sample # 1715314, containing a relatively weak amount of target organisms, no false-negative result was observed among the 97 participants.

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

Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity were observed for the *C. trachomatis*-specific NAT assays used by the 97 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1715321; 1×10^5 CFU/mL), and three negative samples containing *Bordetella parapertussis* (# 1715324; 1×10^5 CFU/mL), *Bordetella holmesii* (# 1715323 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL; **IS481-positive B. holmesii strain!**), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1715322).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. Surprisingly, seven of the 155 participants reported false-negative results for the sample # 1715321 (*B. pertussis*, 1×10^5 CFU/mL). The amount of 10^5 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms is significantly above the previously observed lower limit of detection for the corresponding PCR assays or test systems.

The *B. parapertussis* sample # 1715324 was tested false-positive by 5 participants and (as expected somehow) the *B. holmesii* sample # 1715323 was tested false-positive by 103 of the 155 participants. Since it is well known that *B. holmesii* strains may contain copies of the most popular *B. pertussis*-target gene IS 481, the high rate of false-positives is not really surprising for the latter sample. Considering that the detection rate of the *B. pertussis* sample # 1715321 was very high (indicating a good performance of the *B. pertussis*-specific PCR/NAT assays), and IS481 is still one of the most practical and sensitive target genes, we have not scored those (false) positive results for the *B. holmesii* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. For colleagues who are interested in the IS481 topic, there is a recent paper [2].

However, for participants who have observed false-negative *B. pertussis* results with sample # 1715321 or false-positive *B. pertussis* results with *Bordetella parapertussis* in sample # 1715324, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity of their assay concepts. Except two false-positive results with the "negative" sample # 1715322 (presumably due to carry-over from the strong positive sample 1715321), all of the remaining results reported by the 155 participants were correct. Run controls were performed by 154 participants and inhibition events were

not observed among the samples of the current distribution.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained three samples with a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study in a kind of dilution series. Sample # 1715331 contained approximately 5×10^5 CFU/mL, sample # 1715332 approximately 5×10^4 CFU/mL and sample # 1715334 approximately 5×10^3 CFU/mL of the respective target organisms.

The availability of well evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in the three *Helicobacter pylori*-positive samples (#1715331, # 1715332, and # 1715334) led to positive predictive values of nearly 100%. Only one participant observed a false-negative PCR result for sample # 1715334. Also for the *Helicobacter pylori*-negative sample # 1715333 correctly negative PCR/NAT results were reported by nearly all the participating laboratories. Only one participant observed a false-positive PCR result.

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 39 of the 50 participants and all reported results of molecular susceptibility testing 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: # 1715342 (*E. coli*, 1×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive) and # 1715341 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-negative, ***stx*_{2a}-positive**, *eae*-negative and *hlyA*-negative). The other two EHEC-negative samples contained a *Shigella sonnei* strain (sample # 1715343; 1×10^5 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1715344).

All but one participant correctly reported negative results for sample # 1715344, containing only an *eae*-negative and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain. The second EHEC/STEC-"negative" sample (#1715343), containing a significant amount of a clinical *Shigella sonnei* isolate was also reported PCR-negative by all but four participants. For the EHEC/STEC positive samples # 1715341 and # 1715342, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation

resulted in consistently high accuracy rates. The *stx_{2a}*-positive EHEC sample # 1715341 was correctly reported positive by 124 of the 133 participants and 125 of the 133 participants detected the "classical" EHEC target organisms in the positive sample # 1715342 correctly.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*, and *hlyA* detection techniques were performed by 112 of the 133 participating laboratories. With two exceptions, 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 (EQAS) scheme also **other *B. burgdorferi* genotypes or genospecies will be present** in individual samples.

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

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *B. garinii* organisms in our proprietary matrix: sample # 1715353 (5×10^5 CFU/ml), sample # 1715351 (5×10^4 CFU/ml) and sample # 1715354 (5×10^3 CFU/ml). Sample # 1715352 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

With the exception of 13 false-negative results for sample # 1715354 (containing the lowest amount of the target organism), 3 false-negative and one "questionable" result for sample # 1715351 and 2 false-negative results for sample # 1715353 (containing the highest amount of the target organism) all of the remaining participants reported correctly results for the *B. garinii*-containing samples. The false-negative results should prompt re-evaluation of the assay sensitivity.

The "negative" sample # 1715352 was classified false-positive by only one laboratory. Potentially, this may be due to a contamination event from the positive sample # 1715351 during sample preparation or PCR/NAT analysis. Therefore, the workflow should be optimized to minimize clinically misleading false-positive results.

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

RV 536: *Legionella pneumophila*

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 # 1715361 (5×10^4 CFU/ml), sample # 1715364 (5×10^3 CFU/ml) and sample # 1715363 (5×10^2 CFU/ml). Sample # 1715362 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive samples # 1715361 ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) and # 1715364 ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) were correctly tested positive by all and by 106 of the 119 participating laboratories, respectively. For the third positive sample within the current distribution, # 1715363, which contained a very low amount of *L. pneumophila*-target organisms ($\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL), only 62 of the 119 participants reported a correctly positive result.

With a target organism load of below 10^3 CFU/mL of *L. pneumophila*, the lower limit of detection of appropriate test systems is obviously clearly 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 sample # 1715364 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 # 1715362 which contained only *E. coli*, was classified as false-positive by 2 of the participating laboratories. This is probably due to contam-

ination events in the course of sample preparation or PCR/NAT amplification. All but one of the 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 Typhimurium: sample # 1715371 contained 5×10^4 CFU/ml, sample # 1715374 contained 5×10^3 CFU/ml and sample # 1715372 contained 5×10^2 CFU/ml. Sample # 1715373 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

Sample # 1715371, containing the highest amounts of *Salmonella enterica* target organisms, was reported correctly by all of the 27 participants. Only two false-negative result was reported for the weak positive sample # 1715374, and two false-positive results were reported for the "negative" sample # 1715373. Even sample # 1715372, containing very low amounts of *Salmonella enterica* organisms (5×10^2 CFU/ml) was reported correctly positive by 21 of the 27 participants. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays and an improved procedure with regard to the prevention of contamination events during the individual sample preparation and PCR/NAT analytics in the participating diagnostic laboratories.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, contamination events of the negative sample "3" by target organism or PCR products of the positive samples "1" and/or "2" is by far not unlikely in the current sample constellation. So the observation of false-positive results for sample # 1715373 in the laboratory of 2 participants should encourage them to review and optimize their DNA extraction procedure and their specific PCR/NAT-based test system.

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1715382; only *E. coli* cells), two samples positive for *L. monocytogenes* (# 1715381 with $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL and # 1715383 with $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) and one sample with *Listeria ivanovii* (# 1715384) as a *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. The *Listeria monocytogenes*-containing samples (# 1715381 and # 1715383) were correctly reported positive by all but one participant. In addition, the "negative" *E. coli*-containing sample # 1715382 was correctly identified as negative by all laboratories. Thirty-five of the 46 participants indicated the use of *Listeria monocytogenes*-specific PCR/NAT assays, which is reflected by the high number of "false-negative" results for sample # 1715384, containing 1×10^5 CFU/mL *L. ivanovii*. However, as noted in the report form, participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT-assays may indicate

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

RV 539: MRSA

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

Samples # 1715394 and # 1715391 of the current distribution contained a typical clinical MRSA isolate (MRSA, PVL-negative; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL, respectively) whereas sample # 1715392 contained a significant amount of a so called "**mecA dropout**" **MSSA isolate** ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Only *E. coli* and human cells were present in sample # 1715393 of the current distribution.

The MRSA-negative sample # 1715393 was correctly reported negative by 296 of the 302 participants. Only three participants reported false-positive results, presumably due to intra-laboratory contamination events from the positive sample # 17153931 during sample preparation, amplification or detection. The MRSA-positive samples # 1715391 and # 1715394 were correctly reported positive by almost all of the 302 participants. One false-negative result was observed for sample # 1715391. Three false-negative results were reported for MRSA sample # 1715394 and one participant classified his/her result as "questionable". Affected participants are encouraged to analyse and optimize their NAT-based assays, because the amount of MRSA target organisms in the positive samples, especially # 1715394 (1×10^5 CFU/mL), was not abnormally low.

The apparently "bad" performances for the MRSA-negative but MSSA-positive sample # 1715392 are quickly explained on closer inspection. Sample # 1715392 contained one of the yet still relatively rare *S. aureus* strain, that belongs to the group of so-called **mecA dropout MSSA isolate**: Oxacillin sensitive *S. aureus* strains which contain the MRSA-typical SCCmec cassette, but significant parts or the entire *mecA* gene are deleted on genomic level. Consequently only 254 of the 302 participants reported correct negative MRSA results for this tricky sample.

Compared to the some previous rounds of PCR/NAT external quality assessment for MRSA, a much better dia-

gnostic performance was observed for these variant *S. aureus* genetic constellations. Similar *mecA* dropout variants, which have been sent out formerly in the November 2012 and November 2015 distributions, were detected by 30% (2012) and by 53% (2015) of participants who reported correctly MRSA negative results in the previous distributions. In the current distribution, 84% of the participants reported correct MRSA-negative results. This situation nicely reflects the various (and obviously successful) efforts of diagnostic companies and in-house assay development teams to continuously improve and adopt their protocols to the current challenges of direct PCR/NAT testing for MRSA.

Also, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor PVL (Panton-Valentine Leukocidin) or its coding gene *lukF/S-PV* was inquired. Corresponding results were reported by 92 of the 302 participating laboratories and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were correct in all but three cases. Additional information can be found at: Linde et al. [8] or Witte, W. et al. [9]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at Reischl et al. [10].

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

RV 540: Chlamydia pneumoniae

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

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 # 1715402 contained about 5×10^5 IFU/mL, sample # 1715404 about 5×10^4 IFU/mL and sample # 1715403 about 1×10^4 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 # 1715401 of the current set.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 13), all participants reported correct results for the positive sample # 1715402. 132 of the 134 participants also reported correct positive results for sample # 1715404, and also for the sample with the lowest amount of *C. pneumoniae*

(# 1715403; 1×10^4 IFU/mL) 129 correct results were reported. Only one participant reported false-positive results for the "negative" sample # 1715401 (*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 want to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory materials. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. As a consequence, diagnostic assays designed for *M. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *M. pneumoniae*-infected cells in individual samples of the RV 541 distributions.

The current set of QC samples contained two positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1715412 and an approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) was present in sample # 1715413. Sample # 1715414 was designed to monitor assay specificity: it contained a considerable amount of *Haemophilus influenzae* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), a species of a genus related to *Mycoplasma*. The set was completed by sample # 1715411, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

As also observed during the past distributions of our EQAS scheme 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. Among the *M. pneumoniae*-specific results reported by the 149 participants, all laboratories reported correct positive results for the relatively high positive sample # 1715412, but 15 participants reported false-negative results for sample # 1715413, which contained 1×10^4 genome copies/mL.

Sample # 1715414, which contained *Haemophilus influenzae*, was tested correctly negative by 147 of the 149 participants. Two participants reported false-positive results for the *Haemophilus influenzae* sample, which could be due to shortcomings in analytical specificity or just cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. The affected laboratories are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the analytical specificity of their PCR/NAT assays.

Sample # 1715411 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells. As no false-positive results were observed for the

"negative" sample, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. No inhibitory events or other noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results were observed.

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: Attachment 1, p. 15) contained two samples with different amounts of *C. burnetii* organisms ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1715423 and $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 1715421), one sample with $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL of *B. anthracis* strain UR-1 (sample # 1715421) and one sample with $\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL of a *B. anthracis* **STI vaccine strain** (sample # 1715424). Sample # 1715422 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

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

***Coxiella burnetii*:** The relatively high amount (1×10^5 genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1715421 was correctly reported by all participants. The ten-fold lower concentration of the pathogen in sample # 1715423 was correctly identified as "positive" by 38 of the 39 participating laboratories. The participant reporting a questionable result should reassess the performance of the test system used and evaluate processes of sample workup and analysis. The two "negative" samples (# 1715422 contained only *E. coli* and # 1715424 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 # 1715422 and # 1715423 which did not contain the target organism. The "positive" sample # 1715421 containing $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL *B. anthracis* strain "UR-1" was correctly reported by all 22 participants. The second positive sample # 1715424 ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL of

B. anthracis strain "STI") was correctly reported. This particular strain is positive for the *B. anthracis*-specific markers *rpoB* (or *dhp61*) and *pagA* and also contains the "protective antigen, lethal and edema factor" encoding plasmid pXO1, but not the virulence plasmid pXO2. With the completion of 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 contained three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis* spp. *novicida* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1715434, an approximately ten-fold lower amount of *Francisella tularensis* spp. *holarctica* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1715432, and a relative high amount of *Francisella tularensis* spp. *tularensis* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1715431.

Similar to QC samples from past distributions, the positive samples # 1715431 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *tularensis*) and # 1715434 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *novicida*) were correctly tested positive by 25 and 24 of the 26 participating laboratories, respectively. Even with pathogen amounts of $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL (sample # 1715432) 18 out of 26 labs were able to detect *Francisella* DNA. As no false-positive result was observed for the "negative" sample # 1715433, it seems that the participating laboratories have implemented functional precaution measures to prevent deleterious contamination events. Overall, these results corroborate the lower limits of detection observed in our previous EQAS distributions. Although the number of participating laboratories is still limited, the results of the present distribution indicate that the lower limit of detection is about or slightly below 10^4 organisms/mL when using currently employed and well evaluated PCR/NAT-based assay concepts for the detection of *F. tularensis* DNA.

RV 544: Carbapenemase genes

The concept of this novel EQAS-panel for the detection of carbapenemase genes is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for molecular resistance testing or the direct detection of car-

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 # 1715441 contained *Klebsiella pneumoniae* with a VIM-2 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), sample # 1715442 contained an *Klebsiella pneumoniae* isolate with two carbapenemase genes: KPC-2 and OXA-48 ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), and sample # 1715444 contained an *Serratia marcescens* isolate with a NDM-1 gene. The fourth sample # 1715443 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes.

74 of the 77 participating laboratories reported sample # 1715441 (*K. pneumoniae* carrying a VIM-2 carbapenemase) as "carbapenemase-positive". Notably, all but 2 participants were able to detect carbapenemase genes in sample # 1715442 (*K. pneumoniae* carrying KPC-2 and OXA-48), but six laboratories missed the KPC-2 gene. The third "positive" sample # 1715444 (containing *Serratia marcescens* with a NDM-1 gene) was correctly reported by 76 of the 77 participants. A false-negative result for carbapenemase gene-positive samples 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 three *Clostridium difficile* positive samples: sample # 1715451 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL and samples # 1715453 and # 1715454 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL. Sample # 1715452 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

The sample # 1715451 containing a relatively high amount of *C. difficile* (1×10^5 CFU/mL) was correctly reported as "positive" all of the 130 participating laboratories. Additionally, the two samples containing a ten-fold lower amount of the target organism (# 1715453 and # 1715454) were correctly identified by 128 and 129 participant, respectively. False-negative results should prompt a thorough evaluation of the test system and the

workflow. The latter is definitely warranted for the participants reporting a false-positive result for sample # 1715452, 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. With one exception, 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 three vancomycin-resistant *Enterococcus* strains: an *Enterococcus faecalis* vanA positive strain (# 1715461, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), an *Enterococcus faecium* vanB positive strain (# 1715462, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), and an *Enterococcus avium* vanA positive strain (# 1715463, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1715464 contained no target organisms but human cells and *E. coli* cells.

48 and 47 of the 50 participating laboratories reported correct results for the "positive" samples # 1715461 and #1715462, respectively. The vanA-positive *E. avium* strain was also correctly reported as "vancomycin-resistant" by 43 of the 50 participants. Of note, the reported dedicated vanA/vanB identifications for these three samples were all correct. We were pleased to see that also for the "negative" sample #1715464, 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. With one exception, 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: Attachment 1, p. 22). A relatively high concentration of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1715601, whereas in sample # 1715603 *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present at an approximately ten-fold lower concentration. The set was completed by samples # 1715602 and # 1715604 which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. Sample # 1715601, which contained *P. jirovecii* target organisms ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) at highest concentration and sample # 1715603 with a ten-fold lower concentration of *P. jirovecii*, were both reported "positive" by 102 and 100 of the 102 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" (# 1715602 and # 1715604, containing only *E. coli*) were correctly classified "negative" by 101 and 100 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/lab000026.shtml>

1. Anhang1_lab000026.pdf (353 KB)
Results of the proficiency testing scheme "Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)" June 2017

References

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. Mikrobiologie. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. J Clin Microbiol. 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11
3. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. J Med Microbiol. 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46331-0
4. Piérard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol. 1998 Nov;36(11):3317-22.
5. Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. Infect Immun. 1996 May;64(5):1569-76.
6. Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schürk-Bulgrin R, Karch H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. Clin Infect Dis. 2006 Nov 1;43(9):1160-7. DOI: 10.1086/508195
7. Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. Infect Immun. 1996 May;64(5):1569-76.
8. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Pantone-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Pantone-Valentine leukocidin]. Dtsch Med Wochenschr. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
9. 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
10. 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

Corresponding author:

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

Please cite as

Reischl U, Schneider W, Ehrenschröder M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Anders A. „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT“: Auswertung des Ringversuchs Juni 2017 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab. 2017;8:Doc03. DOI: 10.3205/lab000026, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000265

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2017-8/lab000026.shtml>

Published: 2017-07-19

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/>.