

# Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 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 Reischl<sup>1</sup>**  
**Martin Ehenschwender<sup>1</sup>**  
**Andreas Hiergeist<sup>1</sup>**  
**Matthias Maaß<sup>2</sup>**  
**Michael Baier<sup>3</sup>**  
**Dimitrios Frangoulidis<sup>4</sup>**  
**Gregor Grass<sup>4</sup>**  
**Heiner von Buttlar<sup>4</sup>**  
**Holger Scholz<sup>4</sup>**  
**Volker Fingerle<sup>5</sup>**  
**Andreas Sing<sup>5</sup>**  
**Enno Jacobs<sup>6</sup>**  
**Ingrid Reiter-Owona<sup>7</sup>**  
**Agnes Anders<sup>8</sup>**

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

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

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

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

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

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

Universitätsklinikum Bonn,  
Deutschland

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

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Nach erfolgreicher Etablierung dieser neuen Ringversuchs-Serie wollen wir hier auch für Kolleginnen und Kollegen, die bisher noch nicht an diesen Ringversuchen teilgenommen haben, die Ergebnisse der aktuellen Ringversuche für den PCR/NAT-gestützten Nachweis von **Neisseria gonorrhoeae**, **Chlamydia trachomatis**, **Bordetella pertussis**, **Helicobacter pylori**, **EHEC/STEC**, **Borrelia burgdorferi sensu lato**, **Legionella pneumophila**, **Salmonella enterica** und **Listeria spp.**, **MRSA** bzw. **cMRSA**, **Chlamydia pneumoniae**, **Mycoplasma pneumoniae**, **Coxiella burnetii**, **Bacillus anthracis**, **Francisella tularensis**, **Pneumocystis jirovecii** (vorm. **P. carinii**) und der **molekularen Resistenztestung für Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae** sowie die beiden vor kurzem neu ins Programm aufgenommenen Ringversuche zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von **Clostridium difficile (Toxingene)** und **VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken)** darstellen und kurz diskutieren.

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

So wurde im aktuellen **RV 530 Chlamydia trachomatis & Neisseria gonorrhoeae** beispielsweise eine Probe mit relativ hohen Mengen sowohl an *C. trachomatis*- als auch an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen versandt. Interessanterweise konnten einige kommerzielle und *in-house* PCR-Testsysteme hier nur die DNA von *C. trachomatis* im Gemisch zuverlässig nachweisen und beobachteten für *N. gonorrhoeae* DNA-Inhibition bzw. einen Ausfall der entsprechenden testspezifischen Inhibitionskontrollen. Innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 539 MRSA/cMRSA** erneut eine Mischung aus einem Methicillin-empfindlichen *S. aureus*-Isolat (MSSA) und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies ausgesandt, das methodenbedingt bei einem Teil der aktuell eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zu falsch-positiven MRSA-Ergebnissen führte. In der mikrobiologischen Praxis der PCR/NAT-gestützten MRSA-Direktnachweisverfahren wird relativ häufig die gleichzeitige Anwesenheit einer Methicillin-resistenten (also *mecA*-positiven) Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies und eines Methicillin-empfindlichen (also *mecA*-negativen) *S. aureus*-Isolates in dem entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. 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 knapp 7% 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**. Denn selbst diejenigen Anwender, die mit ihren PCR-Testsystemen alle Proben des aktuellen MRSA-Ringversuchs zuverlässig detektieren und korrekt befunden konnten, sollten sich aufgrund der bekannten Vielfalt und der Dynamik von „exotischeren“ SCC*mec*-Kassetten-typen (oder dem Auftreten von *mecA*-Gen-negativen aber dafür *mecC*-Gen-tragenden MRSA-Isolaten) nie wirklich

sicher sein, dass sie auch zukünftig alle der zirkulierenden Varianten problemlos und zuverlässig erfassen.

Interessant war auch die Ergebniskonstellation des **EHEC/STEC-Panels im RV 534**. Hier wurden neben einem „normalen“ O157-Isolats auch zwei weitere EHEC-Isolate mit etwas selteneren Shiga-Toxin-Genvarianten, *stx<sub>2f</sub>* bzw. *stx<sub>2d</sub>*, ausgesandt und dabei innerhalb aller Teilnehmer lediglich Richtigkeitsquoten von 55 bzw. 80% erzielt. Aus wissenschaftlicher Sicht ist bei den üblicherweise eingesetzten PCR/NAT-Testsystemen eine „diagnostische Lücke“ allenfalls für *stx<sub>2f</sub>* aufgrund der deutlich von den anderen Shiga-Toxin-Genen abweichenden Gensequenz zu erwarten. Bei der *stx<sub>2d</sub>*-positiven EHEC-Probe aus dem aktuellen Set scheint mit ca.  $5 \times 10^3$  CFU/mL die untere Nachweisgrenze einiger Testsysteme und deren diagnostischer Workflows bereits erreicht bzw. bereits leicht unterschritten zu sein.

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 auch zum aktuellen Zeitpunkt noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase-Genen aufweisen. Im aktuellen Ringversuch scheint dies insbesondere für das *Enterobacter cloacae*-Isolat mit der NDM-7 Carbapenemase zu gelten. Im Umfeld der molekularen Testung von Carbapenemase-Genen unterstützt uns ja Frau Dr. Agnes Anders vom Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger in Bochum dankenswerterweise 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 zu zwei neuen Pilot-Ringversuchen**: wie bereits bei der Ringversuchsauswertung vom Juni dieses Jahres angekündigt, werden wir den mehrfach vorgetragenen Wünschen aus dem Teilnehmer- und Kollegenkreis nachkommen und ab Mai 2018 zwei zusätzliche Ringversuche in Form von sog. Pilot-Ringversuchen anbieten. Nach (hoffentlich) erfolgreichem Abschluss der beiden Probe-Ringversuchsrunden im Mai und November 2018 werden diese Ringversuche dann ab 2019 ins reguläre Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. übernommen:

- Der aktuelle Ringversuch **RV 543: Francisella tularensis** wird zukünftig als kombinierter Ringversuch um den Zielorganismus **Brucella spp.** erweitert.
- Für die externe Qualitätssicherung zukünftig kommerziell verfügbarer (und damit auch vermehrt eingesetzten) **PCR/NAT-gestützten Nachweisverfahren für Urogenital-Infektionen** haben wir inzwischen ein Ringversuchskonzept etabliert, das jeweils einige der nachfol-

genden Erreger in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen innerhalb des 4er-Panels enthalten wird.

**RV 547 „Uro-Panel“** zum Nachweis von:

**Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum, Trichomonas vaginalis, Gardnerella vaginalis** und ggf. **Treponema pallidum**.

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

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

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

Und gestatten Sie mir noch eine kleine Anmerkung in eigener Sache: neben den überaus motivierten und engagierten Mitarbeitern der ausgewählten Sollwert-Laboratorien unterstützen uns bei der Konzeption und Auswertung der zahlreichen Ringversuche zum Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT noch Kolleginnen und Kollegen aus unserem Hause. Herr PD Dr. Dr. Martin Ehrenschnöder fungiert seit August 2017 nun auch formell als stellvertretender Ringversuchsleiter für die Ringversuche zum Bakterien- und Pilzgenomnachweis (PCR/NAT). Allerherz-

lichsten Dank für ihre spontane Bereitschaft sowie ihr ehrenamtliches Engagement für unsere gemeinsamen Bemühungen zur externen Qualitätssicherung molekularbiologischer Nachweisverfahren in der infektiologischen Diagnostik.

## Untersuchungsergebnisse November 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: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1725304), *Bordetella pertussis* (Probe # 1725324), *Borrelia afzelii* (Probe # 1725351), EHEC (Probe # 1725344), *Legionella pneumophila* (Probe # 1725361), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1725402), *Clostridium difficile* (Probe # 1725452), VRE (Probe # 1725462) sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1725604).

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 Proben-

zusammensetzung 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. (<https://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 Analysesysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive, als auch für negative Befunde.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit ca.  $\sim 5 \times 10^4$  IFU/mL an *C. trachomatis*

(# 1725304), zwei Proben mit einer ca. 2-fach bzw. 10-fach höheren Menge an *C. trachomatis* (# 1725303 mit  $\sim 1 \times 10^5$  IFU/mL und # 1725302 mit  $\sim 5 \times 10^5$  IFU/mL), eine Probe (# 1725304) mit ca.  $5 \times 10^3$  CFU/mL an *N. gonorrhoeae*, eine Probe mit einer ca. 10-fach höheren Menge an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1725301;  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) sowie eine Probe mit einer sehr hohen Menge von ca.  $\sim 5 \times 10^6$  CFU/mL an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1725303).

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 # 1725304 des aktuellen Ringversuchs nur mit ca.  $5 \times 10^4$  IFU/mL an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fand sich unter den von insgesamt 191 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 # 1725303 und # 1725302 des aktuellen Probensets wurden von den 191 Teilnehmern diesmal ebenfalls nur jeweils 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 # 1725301 wurden aus dem gesamten Teilnehmerfeld ebenfalls nur 4 falsch-positive Ergebnisse berichtet.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die drei positiven Proben # 1725304, # 1725301 und # 1725303 (*N. gonorrhoeae*; ca.  $5 \times 10^3$ , ca.  $5 \times 10^4$  bzw.  $5 \times 10^6$  CFU/mL) diesmal jedoch von 7 der insgesamt 190 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken DNA bei der schwach positiven Probe # 1725304 und 2 falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken DNA bei der etwas stärker positiven Probe # 1725301 mitgeteilt. Erfreulicherweise wurde die diesmal sehr hoch positive Probe # 1725303 von allen Teilnehmer korrekt positiv befundet. Bei der einen GO-negativen Probe # 1725302 wurden jedoch von 3 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse 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 # 1725302 bei sequenzieller Abarbeitung unmittelbar auf eine GO-positive Probe folgte. Den betroffenen Laboratorien sollten diese Ergebnisse Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Angesichts der mit  $5 \times 10^4$  IFU/mL ehrlicherweise nicht als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in der CT-positiven Probe # 1725304 sowie  $5 \times 10^3$  CFU/mL an Zielorganismen in der GO-positiven Probe # 1725304 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern hier ebenfalls Anlass zur Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsysteme geben.

Da die beobachteten „Sensitivitätsprobleme“ diesmal nur relativ 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-Zielssequenzen 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

ren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen, wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden, von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden die *C. trachomatis*-Zielorganismen von allen 8 Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen in den beiden stärker CT-positiven Proben erfolgreich nachgewiesen. Auch in den beiden stärker GO-positiven Proben # 1725301 und # 1725303 gelang nahezu allen Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe-Testsystemen der erfolgreiche Nachweis der *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen. Nur bei der sehr schwach GO-positiven Probe # 1725304 (in der zusätzlich noch relativ hohe Mengen an *C. trachomatis* enthalten waren) versagte der Nachweis bei 4 der insgesamt 8 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 diesmal allen 8 Teilnehmern die entsprechenden Zertifikate erteilt.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen der insgesamt 191 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit den GenProbe CT/NG, Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen in den entsprechenden Tabellen 3 (Anhang 1, S. 1) aufgeführten Testsystemen wird erneut eindrucksvoll deutlich, dass mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet werden konnten. 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 (10x), HAIN Lifescience FluoroType NG (9x), BD Max CT/GC/TV assay (8x), GeneProof PCR Kits (3x), Urethritis basic von fast-track Diagnostics (3x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (3x), Seegene Anyplex™ II STI-7 Detection (2x), AmpliSens *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (1x), Mikrogen Diagno-

de Real Time PCR kits (1x), Mikrogen ampliCube STD (1x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae* Real-TM (1x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (1x), QIAGEN artus CT/GC QS-RGQ Kit (1x), Hologic Aptima Combo 2 assay CT/GC (1x), Elisabeth Pharmacon EliGene Neisseria UNI Kit (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex PCR-ELISA (1x), *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* RG detect von Institute of Applied Biotechnologies (1x), Applied Biosystems/Dx Real Time System (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x) und Immundiagnostik 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 # 1725303 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 Probenet des aktuellen Ringversuchs enthielt diesmal eine Probe mit ca.  $1 \times 10^5$  IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1725314), eine Probe mit ca.  $5 \times 10^4$  IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1725311), eine Probe mit ca.  $1 \times 10^4$  IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1725312), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1725313), die ausschließlich nicht infizierte humane Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tab. 2 (Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den insgesamt 74 Teilnehmern bei der negativen Probe # 1725313 sowie bei allen drei *C. trachomatis*-positiven Proben (# 1725311, # 1725312 und # 1725314) diesmal nahezu 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.  $1 \times 10^4$  IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme

noch nicht erreicht oder unterschritten sein sollte, stehen mit den Rückstellproben dieses Ringversuchs RV 531 vom November 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 74 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden auch diesmal bei keiner der insgesamt vier Proben mitgeteilt. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in-house* Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf erfreulich hohem Niveau.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: BD Max CT/GC/TV assay (5x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), HAIN Lifescience GenoType CT (2x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (2x), Seegene Allplex STI Essential Assay (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), Sansura Biotech *C. trachomatis* DNA Fluorescence Diagnostic Kit (1x), Euroclone Duplica Real Time (1x) und VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (1x).

## RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (# 1725321; *B. pertussis*,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/ml), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1725324; *B. pertussis*,  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/ml), und eine Probe mit *Bordetella parapertussis* als verwandte Spezies (# 1725322 mit  $5 \times 10^5$  CFU/mL). Die Probe # 1725323 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanem Zellmaterial.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA führte auch diesmal wieder zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten sowohl bei einer der beiden positiven als auch bei den zwei *B. pertussis*-negativen Proben. Lediglich von einem der insgesamt 126 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1725322 (*B. parapertussis*) mitgeteilt und von einem Teilnehmer wurde das Ergebnis als „fraglich“ klassifiziert. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung

handelte. Auch eine mangelnde Spezifität des eingesetzten PCR/NAT-Testsystems ist bei dieser Konstellation denkbar.

Unter den insgesamt 504 mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich zudem 17 falsch-negative für die schwach positive Probe # 1725324 ( $5 \times 10^3$  CFU/mL an *B. pertussis*) und ein als „fraglich“ klassifiziertes Ergebnis für die *B. pertussis*-negative Probe # 1725323. Ein falsch-negatives Ergebnis bei der relativ stark positiven Probe # 1725321 sollte bei dem einen betroffenen Ringversuchsteilnehmer Anlass zur Überprüfung und Optimierung des Konzepts oder des diagnostischen Workflows seines individuellen *Helicobacter pylori*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystems geben.

Im Rahmen der hier üblichen retrospektiven Analyse der Ergebniskonstellation kann natürlich nie ausgeschlossen werden, dass von einzelnen Teilnehmern die Proben bei der analytischen Abarbeitung oder die Ergebnisse bei der Befundung schlichtweg verwechselt wurden. In der simplen Konsequenz wären bei solchen Fällen dann in Tab. 2 (Anhang 1, S. 5) einzelne „vermeindlich“ falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse über die 4 Proben des Sets verteilt zu beobachten. Ohne einzelnen Teilnehmern zu nahe treten zu wollen liegt bei der aktuellen Auswertung des RV 532 diese Vermutung nahe. Daher sei hier nochmals an die sorgfältige Kontrolle bei der Auf- bzw. Abarbeitung der Einzelproben sowie der sorgfältigen Übertragung in das Ergebnisformular appelliert ;-)

Inhibitionskontrollen wurden von 123 der insgesamt 126 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet. Bei einer Menge von  $5 \times 10^3$  CFU/mL an *B. pertussis*-Zielorganismen (entspricht ca.  $5 \times 10^2$  CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100  $\mu$ l) nähert man sich offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1725324 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die durchgehend grau schraffierten Felder in Tab. 2 (Anhang 1, S. 5) gekennzeichnet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 85 Teilnehmern explizit die Verwendung der sehr populären und *B. pertussis*-spezifischen Insertionssequenz IS481, von 11 Teilnehmern die Verwendung von Segmenten innerhalb des Pertussis Toxin Gens und von 2 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Genabschnittes als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID Tests (6x), GeneProof *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit (4x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (3x), Seegene Allplex Respiratory

Panel 1 (3x), Altona diagnostic RealStar *Bordetella* PCR Kit (3x), HAIN Lifescience FluoroType *Bordetella* (3x), fast-track Diagnostics *Bordetella* (1x), Ingenetix Bacto Real *B. pertussis*/*B. parapertussis* (1x), Mikrogen ampliCube (1x), Mikrogen Diagenode *Bordetella* (1x), Attomol *Bordetella* Realtime LT (1x), QUIDEL AmpliVue *Bordetella* Assay (1x), Sacace Biotechnologies *B.pertussis*/*B.parapertussis*/*B.bronchiseptica* Real-TM (1x), BioMerieux ARGENE *Bordetella* R-gene (1x), Meridian Bioscience illumigene *Pertussis* (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 eine positive Probe eines Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1725331;  $5 \times 10^5$  CFU/ml) und eine positive Probe eines Clarithromycin-sensiblen *H. pylori*-Patientenisolats (# 1725333;  $5 \times 10^5$  CFU/ml). Probe # 1725332 enthielt eine Kultursuspension der mit dem Zielorganismus verwandten Spezies *Helicobacter mustelae* ( $\sim 5 \times 10^5$  CFU/ml) und Probe # 1725334 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Wie bereits bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden mehrfach zu beobachten war, führte die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysensysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den beiden positiven Proben # 1725331 und # 1725333 ( $\sim 5 \times 10^5$  bzw.  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL) beim Nachweis von *H. pylori*-DNA zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten.

Lediglich von einem der insgesamt 38 Teilnehmer wurde ein falsch-negatives Ergebnis für die sehr hoch positive Probe # 1725333 und von 2 weiteren Teilnehmern ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1725332 mitgeteilt. Diese Probe enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter mustelae* in signifikanter Menge ( $\sim 5 \times 10^5$  CFU/ml), deren DNA mit den NAT-Testsystemen der übrigen 36 Teilnehmer offensichtlich keine „spezifischen“ Amplifikationsprodukte erzeugte und somit auch korrekt als *H. pylori*-negativ bewertet wurde.

Falsch-positive Ergebnisse bei der Probe # 1725332 des aktuellen Ringversuchs sollten bei den betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung der Speziespezifität ihres jeweiligen *Helicobacter pylori*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystems geben.

Bei der Probe # 1725334, die diesmal lediglich eine Kultursuspension von *E. coli* enthielt, wurden von 36 der insgesamt 38 Teilnehmer korrekt negative Ergebnisse berichtet.

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“ 1 x AmpliSens *H. pylori* 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 36 der insgesamt 38 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines einzigen Teilnehmers waren die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

## RV 534: EHEC/STEC

Wie auch bereits bei den vorhergegangenen Runden dieses Ringversuchs mehrfach diskutiert, besteht die eigentliche Herausforderung bei dem Nukleinsäure-gestützten Nachweis von EHEC/STEC prinzipiell nicht so sehr in dem Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen, sondern vielmehr in der differenzierten Analyse und der Typisierung unterschiedlicher Shiga-Toxin-Genen und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen). Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher drei unterschiedliche EHEC positive Proben: mit ca.  $5 \times 10^4$  CFU/mL (# 1725341: *E. coli*, *stx*<sub>1</sub>-, *stx*<sub>2</sub>-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv und # 1725343: *E. coli*, *stx*<sub>2f</sub>- und *eae*-positiv) und mit ca.  $5 \times 10^3$  CFU/mL (# 1725344: *E. coli*, *stx*<sub>2d</sub>-positiv). Die Probe # 1725342 enthielt diesmal nur einen „normalen“ *E. coli* K12-Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ).

Mit Ausnahme der Probe # 1725344 (mit einer relativ geringen Menge an EHEC Zielorganismen) sowie der Probe # 1725343 (mit einem *stx*<sub>2f</sub>-positiven EHEC-Isolat) führte die Verfügbarkeit von mittlerweile sehr gut etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC bei den restlichen zwei Proben durchweg zu hohen Richtigkeitsquoten – sowohl für positive, als auch für negative Befunde. Von 111 der insgesamt 113 Teilnehmer wurden hier durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet.

Angesichts der Probenkonstellation mit einer vorhergehenden stark positiven Probe könnte es sich bei den 2 falsch-positiven PCR-Resultaten für die negative Probe # 1725342 (mit *eae*- und *hlyA*-negativem *E. coli* K12-Stamm) eventuell um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Aber das bleibt aus Sicht der retrospektiven Ringversuchsauswertung natürlich spekulativ.

Bei einer Menge von  $5 \times 10^3$  CFU/mL an EHEC Zielorganismen (entspricht ca.  $5 \times 10^2$  CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen

von 100 µl) nähert man sich offenbar der unteren Nachweisgrenze von zahlreichen in der Routinediagnostik etablierten PCR/NAT-Testsystemen und den entsprechenden Arbeitsabläufen zur Probenaufarbeitungs- und Template-DNA Präparation an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1725344 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die durchgehend grau schraffierten Felder in Tab. 2 (Anhang 1, S. 7) gekennzeichnet.

Erfahrungsgemäß sind bei den üblicherweise eingesetzten PCR/NAT-Testsystemen auch gewisse „diagnostische Lücken“ aufgrund der mehr oder weniger stark ausgeprägten Sequenzheterogenität innerhalb der bisher bekannten Shiga-Toxin-Genvarianten zu erwarten. Dies wurde im aktuellen Ringversuch wieder einmal mit der Probe # 1725343 und dem darin enthaltenen *stx*<sub>2f</sub>-positiven EHEC-Isolat bestätigt. Hier wurde lediglich von 55 der insgesamt 113 Teilnehmer ein positives Ergebnis für die Anwesenheit von Shiga-Toxin-Genen berichtet. Bei genauerer Analyse der mitgeteilten Test-Daten war auffällig, dass alle 30 Teilnehmer mit dem „r-biopharm RIDAGENE EHEC“ Testkit die *stx*<sub>2f</sub>-positive Probe # 1725343 problemlos nachweisen konnten während alle Anwender des „Hain Lifescience GenoType EHEC“ Kits hier ein negatives Ergebnis berichteten. Andererseits gelang wiederum allen 20 Teilnehmern mit dem „Hain Lifescience GenoType EHEC“ Kit der erfolgreiche EHEC-Nachweis in der Probe # 1725344 (mit einer relativ geringen Menge an *stx*<sub>2d</sub> EHEC-Zielorganismen) wogegen lediglich 13 der insgesamt 30 „r-biopharm RIDAGENE EHEC“ Testkit Anwender hier ein korrekt positives Ergebnis beobachten konnten. Auch wenn die humanpathogene Relevanz von *stx*<sub>2f</sub>-positiven EHEC-Isolaten in der Fachwelt nach wie vor umstritten ist, soll hier an einem Beispiel aus der mikrobiologischen PCR-Routinediagnostik wieder einmal die überraschende Vielfalt an möglichen Genkonstellationen im Umfeld von EHEC-Isolaten aufgezeigt werden. Der bisher einzige Nachweis eines *stx*<sub>2f</sub>-positiven EHEC-Isolates in unserem Hause erfolgte aus einer Lebensmittelprobe, als im Zuge des EHEC-Ausbruchsgeschehens im Jahre 2011 umfangreiche Screeninguntersuchungen aus Stuhl-, Umwelt- und Lebensmittelproben durchgeführt wurden. In diesem Fall passte der *stx*<sub>2f</sub>-Nachweis übrigens „anamnestisch“ hervorragend zu den bekannten Übertragungsrouten (Blattsalat aus Gewächshaus, das aus ökologischen Gründen mit Regenwasser aus der Dachrinne bewässert wurde; das Dach dieses Gewächshauses war ein beliebter Rastplatz für die Bewohner von umliegenden Taubenkobel...). Zur Thematik der „*stx*<sub>2f</sub>-positiven *E. coli*-Isolate“ sind inzwischen auch zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht worden. Exemplarisch sei hier auf eine Publikation von Mitarbeitern des RKI in Wernigerode aus dem Jahre 2009 verwiesen [2].

Anmerkung an die Teilnehmer des aktuellen Ringversuchs: bitte keine Angst um die Zertifikate, denn diese Probe wurde ebenfalls als „edukative Probe“ deklariert und die entsprechenden Ergebnisse daher bei der offi-

ellen Bewertung zur Erteilung von Ringversuchszertifikaten außen vor gelassen.

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 der stark ansteigenden Zahl an „Hain Lifescience GenoType EHEC“- und „r-biopharm RIDAGENE EHEC“-Anwendern gab die Mehrzahl der Teilnehmer nach wie vor die Verwendung von selbstentwickelten oder „anderen“ kommerziellen Testsystemen mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC an, und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Zudem wurden von 92 der insgesamt 113 Teilnehmer die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämölysin (*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.

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* (7x), BD Max Enteric Bacterial Panel (4x), Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Assays (2x), Sacace Biotechnologies EHEC Real-TM (1x), Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), fast-track Diagnostics (1x), Biomerieux BioFire (1x) und Mikrogen ampliCube (1x).

## RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

Daher wurden bei der Konzeption des Ringversuchs diesmal zwei *B. burgdorferi* und eine Rückfallfieber-Borrelie-Spezies an die Teilnehmer versandt. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit ca.  $5 \times 10^4$  Organismen/mL an *Borrelia spielmanii* (# 1725352), eine Probe mit ca.  $1 \times 10^5$  Organismen/mL an *Borrelia afzelii* (# 1725354), eine Probe mit ca.  $5 \times 10^4$  Organismen/mL der Rückfallfieber-Borrelie *Borrelia miyamotoi* (# 1725353), sowie eine Probe mit ca.  $5 \times 10^2$  Organismen/mL an *Borrelia afzelii* (# 1725351).

Nochmals eine **kurze Rekapitulation**: Schon die 21 verschiedenen, dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörigen Spezies können erhebliche Problem für den

PCR-/NAT-gestützten Nachweis darstellen. Mit **B. miyamotoi** wird die Gesamtsituation noch weiter kompliziert: Diese erst vor Kurzem als humanpathogen beschriebene Borrelienspezies wurde bereits 1994 in *Ixodes persulcatus*-Zecken aus Japan entdeckt. *B. miyamotoi* gehört zu den Rückfallfieber-Borrelien – nicht zu *B. burgdorferi* s.l. –, wird aber interessanterweise durch dieselben Schildzeckenspezies wie *B. burgdorferi* übertragen, während Rückfallfieber-Borrelien normalerweise Lederzecken oder Läuse als Vektor benutzen. Wirte für *B. miyamotoi* sind wahrscheinlich Kleinsäuger und Vögel. Erkrankungen des Menschen durch *B. miyamotoi* wurden erstmals 2011 in Russland beschrieben, im Gefolge auch in den USA, Europa und Japan. Symptome der Erkrankung umfassen insbesondere Fieber, Schüttelfrost, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie Schwindel. Bei insgesamt unspezifischer Symptomatik wird die Diagnose akut mittels gefärbtem Blutaussstrich oder PCR gestellt. Weitere diagnostische Methoden umfassen Antikörpernachweis, Anzucht und Mäuse-Inokulationsversuche. Therapiert wird mit Doxycyclin oder, in schwereren Fällen, mit Ceftriaxon oder Penizillin G. Bei insgesamt noch sehr geringen Fallzahlen dürfen die Angaben noch als vorläufig und wenig substantiiert betrachtet werden. **Allerdings ist zu betonen, dass speziell in Ixodes-Zecken B. miyamotoi in vielen Regionen Europas mittels PCR regelhaft nachweisbar sind. In Deutschland u.a. in Sachsen, im Siebengebirge, im Rheintal und in verschiedenen Regionen in Bayern.**

Nun zu den aktuellen Ringversuchsergebnissen: die Detektion von *Borrelia afzelii* in der Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1725353 mit  $\sim 5 \times 10^5$  Organismen/mL) bereitete diesmal erfreulicherweise keinem der insgesamt 93 Teilnehmer Probleme.

*Borrelia spielmanii* in der positiven Probe # 1725353 ( $\sim 5 \times 10^4$  Organismen/mL) wurden bei 90 (96%) der insgesamt 93 Teilnehmer von den jeweils eingesetzten Borrelien-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen erfasst und korrekterweise als positiv befundet, lediglich 3 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Die relativ schwach positive Probe # 1725351 mit ca.  $5 \times 10^2$  *B. afzelii* Zielorganismen pro mL wurde lediglich noch von 54 (58%) der Teilnehmer als richtig positiv erkannt, 34 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis und von 5 Teilnehmern wurde das Ergebnis als „fraglich“ klassifiziert. Bei einer Menge von  $5 \times 10^2$  Borrelien-Zielorganismen/mL werden offenbar bereits die individuellen unteren Nachweisgrenzen von zahlreichen in der Routinediagnostik etablierten PCR/NAT-Testsystemen und den entsprechenden Arbeitsabläufen zur Probenaufarbeitungs- und Template-DNA-Präparation berührt bzw. unterschritten. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen wurden die mitgeteilten Ergebnisse bei dieser Einzelprobe diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist durch die durchgehend grau schraffierten Felder in Tab.2 (Anhang 1, S. 8) gekennzeichnet.

Etwas komplex gestaltete sich auch die Ergebniskonstellation bei Probe # 1725353 mit ca.  $5 \times 10^4$  *B. miyamo-*

*toi*-Zielorganismen/mL. Immerhin noch 24 (25%) der Teilnehmer identifizierten diese Probe als richtig negativ, während 68 Teilnehmer diese Probe mit der in klinischem Material nur sehr selten anzutreffenden Borrelien-Spezies, die auch nicht zum *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex gehört, strenggenommen fälschlicherweise als positiv beurteilten und ein Teilnehmer sein Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifizierte. **Dieses Ergebnis unterstreicht einmal mehr die Vorstellung, dass positive PCR-Ergebnisse sinnvollerweise bis auf Speziesebene identifiziert werden sollten.**

Aufgrund der genetischen Verwandtschaft zwischen *B. miyamotoi* und „echten“ Mitgliedern des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr wahrscheinlich. Laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung sind natürlich ebenfalls möglich und sollten ggf. kontrolliert und korrigiert werden. Aber das bleibt aus Sicht der retrospektiven Ringversuchsauswertung natürlich spekulativ. Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von allen 93 Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse der PCR-Reaktion wurden im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem Teilnehmer beobachtet. Wie bei den vorhergehenden Ringversuchsrunden haben auch diesmal wieder ungefähr knapp die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet, kommerzielle Testsysteme wurden von 49 der 93 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den 34 Teilnehmern, die ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe # 1725351 mit relativ geringer Erregerlast berichteten, fünf davon durch *in-house* Testsysteme generiert wurden. Gegebenenfalls sollte also die Sensitivität der hauseigenen Testsysteme überprüft werden.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (11x), HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (5x), BIORON RealLine Borrelien Kit (2x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (1x), Attomol *B. burgdorferi* Realtime LT (1x) und VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit (1x).

## RV 536: Legionella pneumophila

Vorab ein kurzer Hinweis: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Men-

gen an *Legionella pneumophila* aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Er ist daher NICHT für die Abprüfung von immunologischen Direktnachweisverfahren wie *L. pneumophila* SG1 Urin-Antigen Testen o.ä. geeignet. Einzelne Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets können daher typischerweise auch relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine sehr stark positive Probe # 1725362, die mit einer Menge von ca.  $5 \times 10^5$  CFU/mL an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 2 versetzt war, sowie eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1725361, ca.  $5 \times 10^3$  CFU/mL) an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 2. Die Probe # 1725363 des aktuellen Sets enthielt ca.  $5 \times 10^4$  CFU/mL an *Legionella londiniensis*. Die zweite „negative“ Probe # 1725364 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*.

Die relativ stark positive Probe # 1725362 mit ca.  $5 \times 10^5$  CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG2 wurde dabei von nahezu allen der insgesamt 98 Teilnehmern korrekterweise als positiv befundet.

Auch die „richtig negative“ Probe # 1725364 (nur *E. coli*) wurde diesmal erfreulicherweise von 97 der insgesamt 98 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Lediglich ein Teilnehmer berichtete bei dieser Probe ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila*. Hier sollten mögliche laborinterne Kontaminationsergebnisse bzw. Kreuzkontaminationen während der individuellen Probenextraktion und -abarbeitung ggf. kontrolliert und bestmöglich korrigiert werden. Im Umkehrschluss sollte der eine Teilnehmer, der die relativ stark positive Probe # 1725362 fälschlicherweise als negativ befundet hat (sofern es sich hier nicht um einen banalen „Ergebnisverdrehen“ mit Probe # 1725361 gehandelt hat), die analytische Sensitivität seines *L. pneumophila*-spezifischen PCR/NAT-Testsystems und die entsprechenden Arbeitsabläufe zur Probenaufarbeitungs- und Template-DNA Präparation überprüfen.

Die vierte Probe des ausgesandten Sets, die diesmal mit einer relativ hohen Menge an *Legionella londiniensis* ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) versetzt war, wurde ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren *L. pneumophila*-spezifischen PCR-/NAT-Testsystemen korrekt als negativ befundet. Auch hier berichtete nur einer der insgesamt 98 Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila* DNA, was auf eine Kreuzreaktion bzw. mangelnde Spezifität der Zielsequenz zurückzuführen sein dürfte. Vor allem *in-house real-time* PCR Protokolle mit ribosomalen Zielsequenzen zeigten in der Vergangenheit immer wieder Probleme bei der Spezifität.

Und hier noch eine kurze Anmerkung zu *Legionella londiniensis*: diese non-pneumophila Legionellen-Spezies wird

überwiegend im Rahmen von Wasseruntersuchungen isoliert und bis auf einen einzelnen Fallbericht [3] gibt es bisher keine Hinweise auf eine pathogene Relevanz oder einen diagnostischen Nachweis aus klinischem Untersuchungsmaterial.

Geeignete Inhibitionskontrollen wurden von 97 der 98 Teilnehmer durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden offenbar nicht beobachtet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 78 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Signifikante Unterschiede bezüglich der analytischen Sensitivität zwischen kommerziellen und selbstentwickelten Testsystemen (von 42 Teilnehmern verwendet) fanden sich nicht.

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 (5x), Autoimmun Diagnostika RDB2135 CAP Bakterien (1x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x), Mikrogen Diagenode Lpn-050 Kit (4x), Mikrogen ampliCube (1x), fast-track Diagnostics FTD Atypical CAP (3x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (3x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE detection (2x), ARGENE Legio pneumo/Cc r-gene (1x), ARGENE Amp-Mix (1x), Gerbion diarella Legionella real time PCR Kit LC und TM (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), GeneProof *Legionella pneumophila* PCR Kit (1x), Vircell Speed-oligo *Legionella* (1x), Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (1x), AnDiatec Quidel *L. pneumophila* (1x) und VIASURE *L. pneumophila* Real Time PCR Detection (1x).

## RV 537: Salmonella enterica

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (# 1725373 mit  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), eine Probe mit *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis (# 1725371 mit  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) und zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1725372 und # 1725374), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte erfreulicherweise bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Insgesamt war lediglich ein falsch-negatives Ergebnis bei der positiven Probe # 1725373 zu beobachten. Bei den übrigen 3 Proben innerhalb des aktuellen Sets, # 1725371, # 1725372 und # 1725374, wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 23 Teilnehmern durchwegs korrekt negative bzw. positive Ergebnisse berichtet. Im direkten Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden deutet dies auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsergebnissen während der indivi-

duellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

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 Bacterial Panel (3x), TIB Molbiol LightMix Salmonella (1x), fast-track Diagnostics (1x) und Mikrogen ampliCube (1x).

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

## RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden, wie in dieser Ringversuchsrunde, auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein.

Probe # 1725384 des aktuellen Sets enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL), die erfreulicherweise von allen der insgesamt 32 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1725381 enthielt mit ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Lediglich zwei Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Erfreulicherweise wurde auch die Probe # 1725383, 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.

Zur Abprüfung von möglichen Kreuzreaktivitäten wurde in der aktuellen Ringversuchsrunde auch eine der 4 Proben (# 1725382) mit einer nennenswerten Menge an *Neisseria meningitidis* versetzt. Auch hier zeigten sich erfreulicherweise bei keinem der Teilnehmer Kreuzreak-

tionen mit den eingesetzten *Listeria* spp. oder *L. monocytogenes*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen.

Wie bereits in vorangegangenen Ringversuchsrunden wurden von den Teilnehmern ganz überwiegend *Listeria monocytogenes*-spezifische Testsysteme eingesetzt (n=29). Auch wenn dieser Ringversuch ja von seiner Bezeichnung her formell auf die Abprüfung von *Listeria* spp.-spezifischen PCR/NAT-Testverfahren abzielt, besteht hier die explizite 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 32 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: DYNEX Real Time PCR MeningoPlex (1x), Liferiver *L. monocytogenes* Real Time PCR Kit (1x) und VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *E. coli* Real Time PCR Detection (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 erfolversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von MRSA etabliert haben bzw. im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie an dieser Stelle bereits mehrfach thematisiert basieren einige der derzeit etablierten eigenentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum Direktnachweis von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern, Staphylokokkenspezies-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen in der entsprechenden Nukleinsäurepräparation. Da sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken das *mecA*-Gen für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Aussagekraft dieser PCR-gestützten

Testsysteme für den Direktnachweis von MRSA aus nativem Patientenmaterial eingeschränkt, wenn beim Patienten eine gleichzeitige Besiedelung mit *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. SCCmec-basierte PCR-Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCCmec-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCCmec-Kassette im *S. aureus* Genom als Zielsequenz verwenden.

Dass aber auch die SCCmec-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCCmec-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCCmec-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCCmec-Kassette vorhandene *mecA*-Gens versandt. Da wir uns im Rahmen dieser Ringversuchsserie zum Ziel gesetzt haben, primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzuprüfen, befanden sich im aktuellen Ringversuch neben einem klassischen und vermeintlich unkomplizierten cMRSA-Isolat ein „gewöhnliches“ MSSA-Isolat sowie wieder einmal eine Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (eine Konstellation, die in der täglichen Praxis ja nicht gerade selten beobachtet wird...).

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1725394 diesmal ein Gemisch aus einem *S. aureus*-Isolat (MSSA, PVL-negativ,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; *mecA*-positiv,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL), die Probe # 1725391 ein Methicillin-sensibles *Staphylococcus aureus*-Isolat (MSSA; *mecA*-negativ, PVL-negativ;  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) und Probe # 1725392 eine relativ hohe Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (cMRSA; PVL-positiv; spa: t310;  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL). Die letzte der 4 Proben, # 1725393, enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der relativ stark positiven cMRSA-Probe # 1725392 nahezu von allen der 272 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt und die entsprechende Richtigkeitsquote von über 98% kann man durchaus als respektabel bezeichnen. Der technische oder methodische Hintergrund der 4 falsch-negativen Ergebnisse bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden von diesen 4 Teilnehmern selbstentwickelte (*in-house*) PCR-Testsysteme mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt oder es ging während der Probenaufarbeitung ein gewisser Anteil der Template-DNA bei der DNA-Isolierung oder der Komplettierung der PCR-Ansätze verloren. Angesichts der mit  $5 \times 10^5$  CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden

Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1725392 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Die Probe # 1725391 mit nennenswerten Mengen eines Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolats (MSSA) Isolats wurde ebenfalls von dem Großteil der 272 Teilnehmer richtig negativ für MRSA befundet. Bei den 8 falsch-positiven Ergebnissen für diese Probe könnte eventuell über laborspezifische Kontaminationsprobleme oder auch an eine simple Proben- bzw. Ergebnisverwechslung nachgedacht werden.

Im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit vergleichbarer Probenkonstellation wurde bei Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies in Probe # 1725394 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 245 der insgesamt 272 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere 9 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von 7 dieser 9 Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruht. Da mit dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA*-Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall „fraglich“ auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis.

Die restlichen Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Diesen 18 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 1725394 ist dringend anzuraten, ihre Testsysteme zu überprüfen bzw. die methodische Eignung ihres jeweiligen Testkonzepts zu hinterfragen. In der mikrobiologischen Praxis wird relativ häufig die gleichzeitige Anwesenheit einer Methicillin-resistenten (also *mecA*-positiven) Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies und eines Methicillin-empfindlichen (also *mecA*-negativen) *S. aureus*-Isolates in dem entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. In diesem Fall würden die Testsysteme der letztgenannten 18 Teilnehmer vermutlich fälschlicherweise einen Hinweis auf das Vorliegen einer MRSA-Infektion bzw. -Besiedelung anzeigen (mit allen hinlänglich bekannten Konsequenzen für den betroffenen Patienten!).

Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 1725394 in Tab. 3 (Anhang 1, S. 12) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird schnell ersichtlich dass alle der derzeit etablierten SCCmec-basierten Testsysteme bei diesem Gemisch korrekterweise MRSA-negative Befunde liefern (da das *S. aureus*-Genom

der MSSA-Komponente ja *de facto* keine integrierte SCCmec-Kassette aufweist).

Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1725393), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von 5 der 272 Teilnehmer ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beobachtet. Dabei liegt das Auftreten von sporadischen laborinternen Kontaminationsereignissen oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe. Solche „Ausreißer“ sind bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 200 Teilnehmern nichts Ungeöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion, denn signifikante technische oder methodische Kreuzreaktionen von Staphylokokken- oder MRSA-spezifischen PCR/NAT-Protokollen mit *E. coli*-DNA sind meines Wissens bisher noch nicht berichtet worden. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der erfreulich große Anteil von richtig-positiven Ergebnissen bei der positiven Probe sowie die überwiegend richtig-negativen Befunde bei den übrigen 3 MRSA-negativen Proben erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht.

Abgesehen von dem „Problemkind“ mit der Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies spricht die Ergebnislage dieses Ringversuchs erneut für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine-Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 46 der insgesamt 272 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diesmal sowohl die negativen, als auch die positiven Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der nach wie vor hochaktuellen und in einzelnen klinischen Konstellationen bisweilen auch lebensbedrohlichen cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise in [4] oder [5]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in [6]. Mittlerweile sind auch schon einige kommerzielle *real-time* PCR-Testsysteme für den zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis von PVL-Genen bei MRSA- und MSSA-Isolaten verfügbar (z.B. von r-biopharm oder von TIB Molbiol).

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Life-

science Genotype MRSA (5x), HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (2x), Amplex easyplex MRSA (4x), VIASURE Methicillin Resistent *S. aureus* Real Time PCR Detection Kit (1x), VELA diagnostics Sentosa SA Direct MRSA Test (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 eine Probe mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1725403; *Chlamydia pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^6$  IFU/ml) und eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1725402; *Chlamydia pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/ml), eine Probe mit ca.  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL an *Haemophilus influenzae* (# 1725401), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1725404), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Aus den in der Tab. 2 (Anhang 1, S. 13) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch nahezu alle der insgesamt 109 Teilnehmer die Zielorganismen in der sehr stark positiven Probe # 1725403 (ca.  $10^6$  IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Die Probe # 1725402 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (ca.  $10^4$  IFU/mL) wurde erfreulicherweise ebenfalls mit lediglich zwei Ausnahmen als richtig positiv für *C. pneumoniae*-DNA befundet.

Da in vorausgegangenen Ringversuchen auch noch etwa zehnfach geringere Erregerlasten (ca.  $10^3$  IFU/mL) zuverlässig detektiert werden konnten, sollte ein falsch-negatives Ergebnis der *C. pneumoniae*-haltigen Proben sicherlich zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und ggfs. auch die Prozessabläufe bei der Präanalytik und der Probenaufarbeitung sorgfältig zu hinterfragen. Für die Proben ohne *C. pneumoniae*-Zielorganismen # 1725401 (*Haemophilus influenzae*) und # 1725404 (*Escherichia coli*) ist im Vergleich zu den vorhergegangenen Ringversuchen die Anzahl falsch-positiver Befunde wieder etwas zurückgegangen. Bei beiden negativen Proben fand sich jeweils ein Teilnehmer, der diese fälschlicherweise als positiv bewertet hat. Hierbei dürfte es sich am ehesten um laborinterne

Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Kreuzreaktivitäten der mittlerweile gut etablierten und evaluierten *C. pneumoniae*-spezifischen PCR/NAT-Testsysteme mit DNA von *E. coli* oder *H. influenzae* erscheinen eher als unwahrscheinlich.

Diesmal wiesen nahezu alle der von den Teilnehmern eingesetzten Testsysteme oder PCR/NAT-Protokolle die im Rahmen der regulatorischen Vorgaben geforderten Inhibitionskontrollen auf, eine nennenswerte Inhibition wurde aktuell von keinem der Teilnehmer berichtet.

Selbstentwickelte *in-house* NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 45 Labors eingesetzt, kommerzielle Assays wurden von 64 Teilnehmern verwendet.

Aufgrund des leider noch relativ geringen Anteils und der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 14 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 5 Teilnehmern der Diagenode MP/CP Kit und von 5 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit angegeben.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Kits (7x), fast-track Diagnostics Kits (7x), Seegene Kits (5x), GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (4x), Biologig ReadyMax B-CAP Assay (4x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (1x), Mikrogen ampliCube (1x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae* (1x), VIASURE *C. pneumoniae, M. pneumoniae, L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit (1x), Sacace Biotechnologies *C. pneumoniae* Real-TM (1x) und PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x).

## RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive

Proben: Probe # 1725413 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL) und Probe # 1725411 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL). Proben # 1725412 und # 1725414 enthielten ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*. Mit 6 bzw. 3 Ausnahmen konnten die 122 Teilnehmer die DNA von *M. pneumoniae* in den Proben # 1725411 und # 1725413 nachweisen. Für die „negativen“, mit *E. coli* versetzten Proben (# 1725412 und # 1725414) wurden lediglich 2 falsch-positive Ergebnisse berichtet. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, für keine der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsergebnisse berichtet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 30 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt: LightMix *M. pneumoniae* [n=15], Minerva Biolabs Venor Mp [n=2], AmpliGnost MP PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe [n=4], Diagenode MP/CP [n=5] und r-Biopharm RIDAGENE Mp [n=4], sowie „andere kommerzielle Testsysteme“ [n=44]. 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 (5x), Autoimmun Diagnostika CAP Bacterial Kit (5x), Autoimmun Diagnostika RDB2135 CAP Bakterien (1x), Biologig ReadyMax B-CAP Assay (4x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (3x), Seegene Anyplex RB5 detection (1x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (1x), Mikrogen ampliCube (1x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae*-FRP PCR Kit (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), VIASURE *C. pneumoniae, M. pneumoniae, L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit (1x) und Ingenetix Bacto Real *Mycoplasma pneumoniae* (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 # 1725424 und  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL in Probe # 1725422), zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Bacillus anthracis* UR-1 Isolat-DNA ( $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL in Probe # 1725421 und  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL in Probe # 1725422), sowie eine Probe ohne

Zielorganismen (# 1725423), 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 (1x) und VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit (1x).

**Coxiella burnetii:** Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich. Die etwas stärker positive Probe # 1725422 (mit ca.  $1 \times 10^5$  Genomkopien *C. burnetii*/mL) wurde von 30 der insgesamt 31 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Das berichtete falsch-negative Ergebnis 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 zweite positive Probe # 1725424 des Probesets (ca.  $1 \times 10^4$  Genomkopien/mL von *C. burnetii*) wurde von allen Labors korrekt berichtet. 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 15 Teilnehmer konnten die beiden Proben mit Zielorganismen (# 1725421 und # 1725422) sowie eine der beiden Proben ohne Zielorganismen (# 1725424) korrekt bewerten. Für die zweite „negative“ (# 1725423) hingegen wurde ein fragliches Ergebnis berichtet, alle anderen Teilnehmer klassifizierten diese Probe korrekt als „negativ“.

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 (udo.reischl@ukr.de) 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 rela-

tiv geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen in einem Hintergrund aus humaner und Nicht-Zielorganismen enthalten.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, p. 17) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1725434 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *tularensis*,  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL), Probe # 1725433 mit ca.  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL an *F. tularensis* spp. *tularensis* und Probe # 1725432 mit ca.  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL an *F. tularensis* spp. *novicida*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1725431), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier alle der 18 Teilnehmer die relativ stark positiven Proben # 1725434 (*F. tularensis* spp. *tularensis*,  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL) und # 1725433 (*F. tularensis* spp. *tularensis*,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) als positiv identifiziert. Drei Teilnehmer berichteten die Probe mit der geringsten Menge des Zielorganismus (# 1725432, *F. tularensis* spp. *novicida*,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) fälschlich als negativ. Die drei falsch-negativen Bewertungen sollten Anlass geben, die individuelle Art der Probenaufarbeitung und das verwendete Testsystem bezüglich Sensitivität zu evaluieren und gegebenenfalls zu optimieren, denn die hier verwendete Menge des Zielorganismus in einer klinischen Probe mit nicht-Ziel DNA-Hintergrund sollte trotzdem sicher detektiert werden können.

Die *F. tularensis*-negative Probe # 1725431 wurde diesmal erfreulicherweise von allen Teilnehmern korrekt als „negativ“ klassifiziert. Die Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorherigen Ringversuchen und spricht erneut für ein gutes Funktionieren der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *F. tularensis*-DNA der Teilnehmer enthielten durchwegs eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

## 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, p. 18) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1725441 enthielt *Citrobacter freundii*-complex-Zielorganismen mit den Genen für KPC-3 und VIM-4 (ca.  $1 \times 10^7$  Genomkopien/mL), Probe # 1725442 enthielt *Serratia marcescens*-Zielorganismen mit dem OXA-48-Gen (ca.  $1 \times 10^6$  Genomkopien/mL) und Probe # 1725443 enthielt *Enterobacter cloacae*-complex Zielorganismen mit dem NDM-7 Gen (ca.  $1 \times 10^6$  Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 1725444 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

Alle 62 Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in den Proben # 1725441 und # 1725442 fest. Allerdings wurde dem KPC-3- und VIM-4-positiven *Citrobacter freundii*-complex (# 1725441) von einem Teilnehmer fälschlicherweise eine OXA-48-like Carbapenemase nachgesagt. Für die Probe mit NDM-7 positiven *Enterobacter cloacae*-complex (# 1725444) wurden 58 korrekte Ergebnisse berichtet. Hier heißt es aufpassen, 4 Teilnehmern gelang der Carbapenemase-Nachweis in dieser Probe nicht! Auch der Teilnehmer mit dem falsch-positiven Ergebnis für die „negative“ Probe # 1725444 sollte die Prozesse im Labor und die Performance des verwendeten Tests nochmals genau evaluieren, man bedenke die klinischen Konsequenzen eines fälschlicherweise Carbapenemase-positiv berichteten *Enterobacteriaceae*-Isolats!

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Direktnachweis von Carbapenemase-Genen 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: AmpliGnost Carbapenemase PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Amplex eazplex SuperBug complete A (1x), VIASURE CPE Carbapenemase *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit (1x) und Autoimmun Diagnostika RDB 2290 Carbapenemase (1x).

## RV 545: *Clostridium difficile*

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

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 19) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben drei positive Proben: Probe # 1725453 mit einer relativ hohen Menge an

*Clostridium difficile*, ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), Probe # 1725451 mit ca. zehnfach geringerer Menge ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) und Probe # 1725452 mit ca.  $5 \times 10^3$  CFU/mL an *Clostridium difficile*; sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1725454), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt. Die beiden „hochpositiven“ *Clostridium difficile*-Proben # 1725451 und # 1725453 wurden erfreulicherweise von allen bzw. 101 der 102 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ klassifiziert. Falsch-negative Ergebnisse sollten auch hier zum Anlass genommen werden, das verwendete Testsystem bzgl. analytischer Sensitivität und Spezifität zu evaluieren und auch die laborinternen Prozesse der Probenaufbereitung und -abarbeitung kritisch zu hinterfragen. Letzteres gilt insbesondere für den Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis für die lediglich *E. coli*-enthaltende Probe # 1725454. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich.

Probe # 1725452 enthielt mit  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL die geringste Menge des Zielorganismus und wurde von 93 Teilnehmern korrekt als positiv berichtet, leider wurden auch 8 falsch-negative Ergebnisse sowie ein „fragliches“ Ergebnis eingereicht. Hier sollte ggfs. die analytische Sensitivität des Testsystems hinterfragt werden. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden für keine der Proben berichtet. Wie in Tab. 3 (Anhang 1, S. 19) angegeben, verwendeten der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme, während selbstentwickelte Testkonzepte in 11 Laboratorien zum Einsatz kam. In dieser Ringversuchsrunde zeigten sich (vergleichbar mit der vorausgegangenen) zwischen den kommerziellen Testsystemen und den Eigenentwicklungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: r-Biopharm RIDAGENE CD Toxin A/B (4x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (3x), Altona diagnostic RealStar *C. difficile* PCR Kit (3x), HAIN Lifescience GenoType CDiff (4x), HAIN Lifescience FluoroType CDiff (1x), Meridian Bioscience illumigene *C. difficile* (3x), Seegene Allplex GI Bacteria Assay (2x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), fast-track Diagnostics *C. difficile* (1x), eazplex *C. difficile* complete Assay (1x), Congen SureFast *C. difficile* 3Plex (1x) und QUIDEL AmpliVue *C. difficile* Assay (1x).

## RV 546: VRE

Der ins Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Vancomycin-resistente Enterokokken“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an DNA Vancomycin-resistenter Enterokokken** aus geeignetem klinischem

Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 20) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1725463 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecium* mit van B-Gen,  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL) und Probe # 1725462 mit ca. hundertfach geringerer Menge an *Enterococcus faecium* mit van A-Gen ( $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL). Im Ringversuchsprobenset befanden sich zudem zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1725461 und # 1725464), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielten. Erfreulicherweise wurden die positiven Proben # 1725462 (*Enterococcus faecium* mit van A-Gen,  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL) und # 1725463 (*E. faecium* mit van B-Gen,  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL) von 37 der 38 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „VRE-positiv“ berichtet. Wie bereits im vorangegangenen Ringversuch waren alle eingereichten vanA/vanB-Differenzierungen korrekt. Der Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis für die *E. coli*-enthaltende Probe # 1725461 sollte die Prozesse der Probenaufbereitung und -analyse kritisch hinterfragen. Bei den eingesetzten Testsystemen hielten sich kommerziell erhältliche, vorkonfektionierte Systeme und Eigenentwicklungen in etwa die Waage. Bezüglich analytischer Sensitivität und Spezifität waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen, wenngleich einschränkend angemerkt werden muss, dass für eine verlässlichere Beurteilung weitere Ringversuchsrunden abgewartet werden sollten.

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 (1x), Amplex easyplex VRE (1x) und VIASURE Vancomycin Resistente Real Time PCR Detection Kit (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. 21)): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1725602; *Pneumocystis jirovecii*, ca.  $1 \times 10^5$  Zielorganismen/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 1725604; *Pneumocystis jirovecii*, ca.  $5 \times 10^3$  Zielorganismen/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1725601 und # 1725603), die lediglich nennenswerte Mengen an *E. coli* in einer Suspension aus humanen Zellen enthielten.

Der Nachweis des Zielorganismus aus der stärker positiven Probe (# 1725602, ca.  $1 \times 10^5$  Zielorganismen bzw. Genomkopien /mL) gelang nahezu allen Teilnehmern. Probe # 1725603 mit einer ca. zwanzigfach geringeren

Erregermenge wurde noch von 85 der insgesamt 87 Teilnehmer korrekt als „positiv“ identifiziert. Für die Teilnehmer mit falsch-negativen Befunden in dieser Ringversuchsrunde bleibt unser Appell unverändert bestehen, die Sensitivität der verwendeten Testsysteme zu hinterfragen, da aus der Sicht der molekulardiagnostischen Praxis eine Erregermenge von  $5 \times 10^3$  und vor allem  $1 \times 10^5$  Zielorganismen pro mL (wie in der Probe # 1725602) nicht als „äußerst gering“ einzuschätzen ist.

Bei den Proben ohne Zielorganismen (# 1725601 und # 1725603), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs lediglich von einem Teilnehmer bei der ersten Probe ein falsch-positives Ergebnis berichtet (Tab. 2 (Anhang 1, S. 21)). 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. Diesmal wiesen alle eingesetzten Testsysteme oder PCR/NAT-Protokolle der Teilnehmer die im Rahmen der regulatorischen Vorgaben geforderten Inhibitionskontrollen auf, eine nennenswerte Inhibition wurde von keinem der Teilnehmer berichtet. Bei den verwendeten Testsystemen lagen *in-house* Assays zahlenmäßig fast gleichauf mit kommerziellen Testsystemen. Unterschiede in Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit waren nicht zu erkennen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Diagnostics *Pneumocystis jirovecii* (4x), Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (4x), Biologig ReadyMax AP-1 Assay (2x), AmpliSens *Pneumocystis jirovecii* FRT (1x), SureFast *P. jirovecii* PLUS (1x) und VIASURE *P. jirovecii* Real Time PCR Detection (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, Obereschleißheim, 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/2018-9/lab000029.shtml>

1. Anhang1\_lab000029.pdf (353 KB)  
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ November 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. Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschäpe H. Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol*. 2009 Jun;299(5):343-53. DOI: 10.1016/j.ijmm.2008.10.008
3. Stallworth C, Steed L, Fisher MA, Nolte FS. Legionnaires' disease caused by Legionella londiniensis. *J Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):4178-9. DOI: 10.1128/JCM.02182-12
4. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem Staphylococcus aureus: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant Staphylococcus aureus: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583 Externer Link
5. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
6. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive Staphylococcus aureus by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

### 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, 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 November 2017 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab*. 2018;9:Doc01. DOI: 10.3205/lab000029, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000292

### Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2018-9/lab000029.shtml>

Veröffentlicht: 04.01.2018

### Copyright

©2018 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 November 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. (<https://www.instand-ev.de/en.html>). 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 Reischl<sup>1</sup>**  
**Martin Ehrenschwender<sup>1</sup>**  
**Andreas Hiergeist<sup>1</sup>**  
**Matthias Maaß<sup>2</sup>**  
**Michael Baier<sup>3</sup>**  
**Dimitrios Frangoulidis<sup>4</sup>**  
**Gregor Grass<sup>4</sup>**  
**Heiner von Buttlar<sup>4</sup>**  
**Holger Scholz<sup>4</sup>**  
**Volker Fingerle<sup>5</sup>**  
**Andreas Sing<sup>5</sup>**  
**Enno Jacobs<sup>6</sup>**  
**Ingrid Reiter-Owona<sup>7</sup>**  
**Agnes Anders<sup>8</sup>**

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

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

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

4 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

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

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

7 Institute for Medical Microbiology, Immunology and Parasitology (IMMIP), University of Bonn, Germany

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

## Brief discussion of the current results

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

## Examination results November 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* ( $\sim 5 \times 10^5$  IFU/mL in sample # 1725302,  $\sim 1 \times 10^5$  IFU/mL in sample # 1725303 and  $5 \times 10^4$  IFU/mL in sample # 1725304) and three samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms:  $\sim 5 \times 10^6$  CFU/mL in sample # 1725303,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL in sample # 1725301 and  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL in sample # 1725304.

Despite the relatively low amounts of *C. trachomatis* target organisms in the positive sample # 1725304, all but one of the 191 participants reported correct positive CT results. For the two samples with a five- or tenfold higher amount of *C. trachomatis* (# 1725303 and # 1725302), only 1 false-negative result for each sample was observed in the current distribution. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by only 7 of the 190 participants for sample # 1725304, which contained a relatively low number of *N. gonorrhoeae* target organisms ( $5 \times 10^3$  CFU/mL) next to a high amount of *C. trachomatis* ( $5 \times 10^4$  IU/mL). Also 3 false-positive results for the GO-negative sample # 1725302 were reported by the participants. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set,

contamination events of the GO-negative sample “2” by target organism or PCR products of the positive samples “1” and/or the very high positive sample “3” is by far not unlikely in the current sample constellation. As a consequence, 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 # 1725301 and # 1725304 could not be considered as “extremely low”, false negative results should also encourage the corresponding participants to carefully investigate 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 of the participants and no inhibitoric 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 191 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: # 1725314 with  $\sim 1 \times 10^5$  IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, # 1725311 with  $\sim 5 \times 10^4$  IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, and sample # 1725312 with  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Sample # 1725313 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), the majority of the results reported for the negative sample # 1725313 and the three CT-positive samples # 1725311, # 1725312 and # 1725314 were correct. Also for the *C. trachomatis*-positive sample # 1725312, containing the lowest amount of target organisms within the current distribution, no false-negative result was ob-

served among the 74 participants. This striking match of the current results with observations and accuracy rates over the last couple of 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 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 various *C. trachomatis*-specific NAT assays.

## RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of EQA samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1725321;  $5 \times 10^4$  CFU/mL), one sample with an approximately tenfold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1725324;  $5 \times 10^3$  CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella parapertussis* (# 1725322 with  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL), as well as one sample containing only human cells and *Escherichia coli* (# 1725323).

The availability of well-established commercial or in-house NAT assays has led to a high portion of correct results. Only 1 of the 126 participants reported a false-positive result for the *B. parapertussis* sample # 1725322 and one participant classified this sample as “questionable”. The false-positivity issue is probably due to contamination events in the course of sample preparation or low specificity of the used PCR/NAT test system. For sample # 1725324 ( $5 \times 10^3$  CFU/mL of *B. pertussis*) 17 false-negative results were observed. With an amount of slightly above  $10^3$  CFU/mL of *B. pertussis* target organisms, the lower limit of detection of appropriate PCR/NAT test systems is obviously reached or at least touched to a certain extent. Therefore we have not scored those (false) negative results for the weak-positive *B. pertussis* sample in the course of issuing the corresponding EQAS certificates. This is also characterized by the three gray-shaded boxes for sample # 1725324 in Tab. 2 (Attachment 1, p. 5).

However, for participants who have reported false-negative *B. pertussis* results with sample # 1725321 or questionable *B. pertussis* results with the negative sample # 1725323, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity of their assay concepts. Except the sporadic false-positive or false-negative results briefly discussed above, all of the remaining results reported by the 126 participants were correct.

For the specific and sensitive detection of *B. pertussis*, most participants used self-developed (in-house) PCR/NAT test systems with inhibition and/or positive controls. In the submitted report forms 85 participating laboratories indicated the IS481 insertion sequence as target, 11 the pertussis toxin coding gene and 2 participants are targeting ribosomal genes. Run controls were performed by

123 participants and inhibition events were not observed among the samples of the current distribution.

## RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of EQA samples contained two samples with a relatively high amount of target organisms. Sample # 1725333 contained approximately  $5 \times 10^6$  CFU/mL of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain, and sample # 1725331 contained approximately  $5 \times 10^5$  CFU/mL of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study. Only one of the 38 participants reported a false-negative result for sample # 1725333, while no false-negative results were reported for sample # 1725331. Only two false-positive PCR/NAT results were reported for sample # 1725332 of the current distribution, which contained a culture suspension of the related species *Helicobacter mustelae* ( $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL). Sample # 1725334, which contained only *E. coli* culture suspension, was correctly reported as “negative” by all but two of the participants.

As noted in the description of RV 533, clarithromycin resistance testing in the examined *H. pylori* isolates could be performed by participants on a voluntary basis. This molecular resistance testing is usually based on amplification and sequencing of characteristic regions within the *H. pylori* 23 S rDNA or the use of hybridization probes based qPCR assays. Results for clarithromycin resistance were reported by 36 of the 38 participants and all but one of the reported results of molecular susceptibility testing were correct.

## RV 534: EHEC/STEC

As discussed before, the main challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but rather the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenicity (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of EQA samples contained three samples positive for EHEC: # 1725341 (*E. coli*,  $5 \times 10^4$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>-</sup>, *eae*<sup>-</sup>, *hlyA*<sup>-</sup> and O157-positive), # 1725343 (*E. coli*,  $5 \times 10^4$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup>-positive and *eae*-positive), and # 1725344 (*E. coli*,  $5 \times 10^3$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>2d</sub><sup>-</sup>-positive). The other EHEC-negative sample contained an *eae*<sup>-</sup> and *hlyA*<sup>-</sup> negative *E. coli* K12 strain (# 1725342).

With the exception of samples # 1725344 (*stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup>-positive EHEC isolate) and # 1725344 (containing a relatively low amount of an *stx*<sub>2d</sub><sup>-</sup>-positive EHEC isolate) the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in high accuracy rates for the two remaining samples. Consistently correct results were reported by 111 of 113 participants.

With an amount of slightly above  $10^3$  CFU/mL of *stx*<sup>-</sup>-positive EHEC target organisms, the lower limit of detection of appropriate PCR/NAT test systems is obviously reached

or at least touched to a certain extent for the weak-positive sample # 1725344.

The reason for the 49 false-negative results for the *stx<sub>2f</sub>*-positive EHEC isolate (# 1725343) is probably the missing coverage of “rare” Shiga toxin subtypes by the common spectrum of routinely applied PCR/NAT assays or commercial EHEC PCR test kits among the participating laboratories. It is well-known that the *stx<sub>2f</sub>* encoding gene shows little if any homology to other shiga toxin gene sequences. This is impressively demonstrated by the inclusion of the *stx<sub>2f</sub>*-positive sample # 1725343 where only 88 of the 113 participants reported positive results for the presence of genes coding for shiga toxins.

Even if the relevance or the pathogenic potential of *stx<sub>2f</sub>*-positive EHEC isolates is still under dispute, their inclusion in the current EQA distribution could be classified as educational but not mandatory. With an amount of slightly above  $10^3$  CFU/mL of *stx*-positive EHEC target organisms, the lower limit of detection of appropriate PCR/NAT test systems is obviously reached or at least touched to a certain extent for sample # 1725344. Therefore we have not scored those (false) negative results for the *stx<sub>2f</sub>*-positive sample and for the weak-positive EHEC sample # 1725344 in the course of issuing the corresponding EQAS certificates. This is characterized by the three gray-shaded boxes for both samples in Tab. 2 (Attachment 1, p. 7).

Except two false-positive results with the “negative” sample # 1725342 (containing an *eae*- and *hly*-negative *E.coli* K12 strain), which are presumably due to carry-over from the strong positive sample # 1725341, all of the remaining results reported by the 113 participants were correct.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained. Partial or complete shiga toxin subtyping, *eae*, and *hlyA* detection techniques were performed by 106 of the 113 participating laboratories. With three 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 scheme (EQAS) also **other *B. burgdorferi* genotypes or genospecies will be present** in individual samples.

Short recapitulation: So far 21 different species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato complex were described,

that naturally present genetic differences in commonly used target genes. For specificity testing, ***B. miyamotoi*** was included. This species was first described in 1994 from Japan, belongs to the relapsing fever group spirochetes but is transmitted by the same hard ticks as *B. burgdorferi* s.l. *B. miyamotoi* meanwhile was detected from *Ixodes* ticks from the USA, Asia and Europe. In 2011 first human cases were described from Russia, later on from the USA, Japan and Europe. Symptoms comprise fever, chills, headache, muscleache, arthralgias and nausea. Diagnosis relies on stained blood smears and PCR. For therapy doxycyclin is recommended, in more severe cases ceftriaxone or penicillin G.

The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia spielmanii* (# 1725352;  $\sim 5 \times 10^4$  organisms/mL), one sample with *Borrelia miyamotoi* (sample # 1725353;  $\sim 5 \times 10^4$  organisms/mL) and one sample with *Borrelia afzelii* (sample # 1725354;  $\sim 1 \times 10^5$  organisms/mL). Sample # 1725351 contained a low number of *Borrelia afzelii* ( $\sim 5 \times 10^2$  organisms/mL).

With the exception of 3 false-negative results for sample # 1725352 ( $\sim 5 \times 10^4$  *B. spielmanii* organisms/mL) and 34 false-negative results as well as 5 results classified as “questionable” for sample # 1725351 (containing a very low amount of *Borrelia* target organisms), all participants reported correct results for the 3 positive samples. The three false-negative results for sample # 1725352 should prompt serious re-evaluation of the assay sensitivity.

The *B. burgdorferi* sensu lato complex “negative” sample # 1725353 containing  $\sim 5 \times 10^4$  organisms/mL of *Borrelia miyamotoi* was classified false-positive by 68 and “questionable” by one of the 93 participating laboratories. Potentially, this is either due to cross-reactivity with this genetically very closely related spirochete or due to contamination events during sample preparation or analysis. Approximately half of the participating laboratories used self-developed (in-house) tests with inhibition and/or positive controls. None of the participants noted significant inhibition of the NAT reaction. There were also no significant differences in test performance between commercially available kits and in-house assays for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

## RV 536: *Legionella pneumophila*

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

The current set of QC samples contained two positive samples with *Legionella pneumophila* serogroup 2 (# 1725362;  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL and # 1725361;  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL) next to one sample containing *Legionella londiniensis* (# 1725363;  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL). Sample # 1725364 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive sample # 1725362 was correctly tested positive by 97 of the 98 participating laboratories. Sample # 1725362, which contained a relative low amount of *L. pneumophila* target organisms in the current distribution, was reported positive by only 54 of the 98 participating laboratories. Although sample # 1725362 was not considered in the course of issuing the corresponding EQA certificates, laboratories with negative results should consider to investigate and to improve the analytical sensitivity of their individual PCR/NAT assay concepts.

Sample # 1425362, which contained  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL of *Legionella londiniensis*, was classified false-positive by one of the participating laboratories. Observing false-positive *L. pneumophila* PCR results for non-pneumophila *Legionella* spp. should encourage the corresponding participants to review and optimize the analytical specificity of their "*L. pneumophila*-specific" assays and/or PCR protocols. Briefly, *L. londiniensis* has been frequently isolated from aqueous environments but not from clinical specimens. A single case of Legionnaires' disease in a hematopoietic stem cell transplant recipient caused by this organism is described, which confirms that *L. londiniensis* can be an opportunistic pathogen [3].

All but one of the 98 participants indicated the use of internal or external inhibition controls in their assay concepts and none of the investigated samples showed inhibition.

## RV 537: Salmonella enterica

The current set of QC samples contained two positive samples with *Salmonella enterica*. A relatively high amount of the corresponding target organism was present in sample # 1725371 (*Salmonella enterica* serovar Enteritidis,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) and a similar amount was present in sample # 1725373 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL). No target organisms but only *E. coli* cells were present in samples # 1725372 and # 1725374.

Only one false-negative result was reported for the positive sample # 1725373, which contained a significant number of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium target organisms. For the remaining three samples, only correct negative or positive PCR/NAT results were reported among all of the 23 participating laboratories.

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.

## RV 538: Listeria spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1725383; only *E. coli* cells), two samples positive for *L. monocytogenes* (# 1725384 with  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL and # 1725381 with  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) and one sample with *Neisseria meningitidis* (# 1725382) as a *Listeria* species other than *L. monocytogenes*.

The *Listeria monocytogenes*-containing samples (# 1725381 and # 1725384) were correctly reported positive by all but two participants. In addition, the "negative" *E. coli*-containing sample # 1725383 as well as the "negative" *N. meningitidis* sample # 1725382 were correctly identified as negative by all of our participating laboratories. Thirty-one of the 32 participants indicated the use of *Listeria monocytogenes*-specific PCR/NAT assays. Although this particular EQA scheme is formally focussed on *Listeria* spp., and may therefore contain non-*Listeria monocytogenes* species from time to time, it is noted in the report form that participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT assays may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. In this case, (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species do not negatively affect issuing the corresponding QC certificates. In sum, the current results indicate a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

## RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA and/or community acquired (CA)-MRSA DNA in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs. So the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components. Here it is important to note that NAT assays designed for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the EQA panels. Despite of one sample containing an MSSA isolate together with a methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species, no "difficult" or "interesting" sample was included into the current panel. Sample # 1725392 contained a cMRSA or CA-MRSA isolate (MRSA, PVL-positive, spa:t 310;  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 268 of the 272 participating laboratories. The 4 false-negative results for this sample could be due to an insufficient analytical sensitivity of the used in-house or commercial PCR/NAT test systems or certain problems in the preanalytical or analytical sample workup.

The MRSA-negative sample # 1725393, which contained no target organisms but only *E. coli* cells, was correctly

tested negative by 267 of 272 participants with their PCR-based MRSA-specific test systems.

The other one of the remaining MRSA-negative samples of the current set (# 1725394), contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) and a CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-positive,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL), and was correctly tested negative by only 264 of the 272 participants. It should be noted that the *S. aureus* strain in the latter sample does not contain any residual segments of SCC*mec* cassettes or one of these well-known *mecA* deletions.

So the 5 participants who observed a false positive result for sample # 1725393 and the 8 participants who observed a false positive result for sample # 1725391 should carefully investigate their PCR/NAT assay concepts and workflows for potential contamination events with MRSA DNA or residual amplicon carry-over from previous rounds of PCR analysis during sample preparation, amplification or detection. Think that we are all aware about clinical consequences of reporting false-positive MRSA results....

For the sample # 1725394 of the current distribution, which contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) and a Methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species (*S. epidermidis*; *mecA*-positive,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), 245 of 272 participants reported correct MRSA-negative results and 9 participants classified the results as “questionable”. Six of these 9 participants indicated the use of test systems, which are based on a separate detection of the *mecA* gene and *S. aureus*-specific target genes. With the separate detection of *mecA* and *S. aureus* target sequences, the origin of the *mecA* target gene can not definitively be correlated with the *S. aureus* or the coagulase-negative *Staphylococcus* species. Regarding this aspect, “questionable” is the scientifically correct result in the case when using duplex PCR/NAT assays, which are correlating quantitative results and using a kind of software algorithm for confirming or ruling out the presence of *mecA*-positive *S. aureus* organisms in the investigated sample. The remaining 18 participants, who reported false-positive MRSA results for sample # 1725394, are strongly encouraged to analyse the appropriateness of their PCR/NAT test systems or assay concepts – since the simultaneous presence of MSSA and *mecA*-positive CoNS organisms is a relatively common scenario for microbiological routine diagnostics of nasal, skin or wound swabs. On the other hand, all participants, who used SCC*mec*-based PCR test systems, reported correct MRSA-negative results for sample # 1725394.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported correct results for all 4 samples of the current EQAS distribution. This indicates excellent sample workup functioning of laboratory-specific prevention measures to avoid the risk of contamination and carry-over events.

Also, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor **PVL (Panton-Valentine Leukocidin)** or its coding gene *lukF/S-PV* was possible in the concept of our

EQA scheme for MRSA/cMRSA. Corresponding results were reported by 57 of the 272 participating laboratories and within the current distribution the results for the molecular PVL testing were correct in all but two cases. Additional information can be found in [4] or [5]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found in [6].

In addition, commercial real-time PCR assays reliably targeting PVL genes in MRSA and MSSA isolates are available from a number of diagnostic companies in the meantime (e.g., r-biopharm or TIB Molbiol).

## RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. pneumoniae* in typical (clinical) sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we intended to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory specimens. So the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components. As a consequence, diagnostic assays designed for *C. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *C. pneumoniae*-infected cells in individual samples of the QC set. The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1725403 was spiked with  $\sim 1 \times 10^6$  IFU/mL of *C. pneumoniae*, whereas sample # 1725402 contained an approximately hundred fold lower amount of *C. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^4$  IFU/mL). Sample # 1725401 contained significant numbers of *Haemophilus influenzae* ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL). Only *E. coli* and human cells were present in sample # 1725404.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 13), with one exception all of the 109 current participants reported correct results for the very strong *C. pneumoniae*-positive sample # 1725403 ( $1 \times 10^6$  IFU/mL !). For sample # 1725402, which contained an approximately hundred-fold lower number of target organisms, two false-negative results were reported among the 109 participants. For both of the *C. pneumoniae*-negative samples in the current distribution, # 1725404 and # 1725401 (which contained *Haemophilus influenzae* as a kind of assay specificity challenge), all but one laboratories reports correct negative results. The two sporadically observed false-positive results could be due to simple (cross-)contamination events in the course of sample processing and extraction, as a molecular or technical cross-reactivity of *C. pneumoniae*-specific NAT/PCR assays with *E. coli* or *H. influenzae* DNA is unlikely. Certainly, a false-positive result should prompt investigations and improvement of the preanalytical workup, assay concepts and/or the diagnostic workflow.

## RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

The current set of QC samples contained two positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL) was present in sample # 1725413. An approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL) was present in sample # 1725411. The set was completed by samples # 1725412 and # 1725414, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli*. With the exception of 3 laboratories, all participants correctly reported the sample # 1725413 as positive. The second "positive" sample with a ten-fold lower amount of the target organism (# 1725411) was correctly identified by 116 participants. The *E. coli*-containing "negative" samples were correctly reported by 119 and 122 laboratories.

## 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* DNA ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL in sample # 1725424 and  $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL in sample # 1725422) and two samples with different amounts of *B. anthracis* strain UR-1 DNA ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL in sample # 1725421 and  $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL in sample # 1725422). Sample # 1725423 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 ( $1 \times 10^5$  genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1725422 was correctly reported by 30 of the 31 participants. The participant reporting a false-negative result should reassess the performance of the test system used and evaluate processes of sample work-up and analysis. The ten-fold lower concentration of the pathogen in sample # 1725424 was correctly identified by all participating laboratories. The two "negative" samples (# 1715422 contained only *E. coli* and # 1715421 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*:** With the exception of one "questionable" result, all participants correctly reported negative results for the samples # 1725423 and # 1725424 which did not contain the target organism. The "positive" sample # 1725421 containing  $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL *B. anthracis* strain "UR-1" was correctly reported by all 15 participants. The second positive sample # 1725422 ( $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL of *B. anthracis* strain "UR-1") was also correctly reported by all participants. 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 (udo.reischl@ukr.de).

## RV 543: *Francisella tularensis*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *F. tularensis* DNA in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples (Tab. 1: Attachment 1, p. 17) contained three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis* spp. *tularensis* ( $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL) was present in sample # 1725434, an approximately ten lower amount ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) was present in sample # 1725433, and  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *novicida* was present in sample # 1725432.

Both samples with the highest amount of target organism (# 1725433 and # 1725434) were correctly identified as "positive" by all participants (Tables 2 and 3: Attachment 1, p. 17). Even with pathogen amounts of  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL (sample # 1725432) 15 out of 18 labs were

able to detect *Francisella* DNA. No false-positive results were observed for the “negative” sample # 1725431. Overall, these results corroborate the lower limits of detection observed in our previous EQAS distributions. Although the number of participating laboratories is still not very high, the results of the present distribution indicate that the lower limit of detection is about or slightly below  $10^4$  organisms/mL when using currently employed and well evaluated PCR/NAT-based assay concepts for the detection of *F. tularensis* DNA in a sample harbouring even non-target DNA as it is given in clinical specimens.

## RV 544: Carbapenemase genes

The concept of this novel EQAS panel for the detection of carbapenemase genes is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for molecular resistance testing or the direct detection of carbapenemase genes from DNA preparations of *Enterobacteriaceae* culture isolates. Because of the methodologically challenging design of EQAs for the molecular resistance testing of the wide range of known carbapenemase-coding genes in different bacteria, the panel is narrowed down to a small selection of the currently most common carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae*: KPC, VIM, OXA-48 like genes, GES carbapenemases, NDM, IMP, and GIM. As shown in Tab. 1 (Attachment 1, p. 18), the current set contained three samples with different carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1725441 contained an *Citrobacter freundii* complex isolate with two carbapenemase genes: KPC-3 and VIM-4 ( $\sim 1 \times 10^7$  genome copies/mL), sample # 1725442 contained an *Serratia marcescens* isolate with a OXA-48 gene ( $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL) and sample # 1725443 contained an *Enterobacter cloacae* complex isolate with a NDM-7 gene ( $\sim 1 \times 10^6$  genome copies/mL). The fourth sample # 1725444 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes. All 62 participating laboratories reported sample # 1725441 (*Citrobacter freundii* complex carrying a KPC-3 and VIM-4 carbapenemase) as “carbapenemase-positive”. Notably, all participants were also able to detect carbapenemase genes in sample # 1725442 (*S. marcescens* carrying OXA-48). The third “positive” sample # 1725443 (containing *Enterobacter cloacae* complex with a NDM-7 gene) was correctly reported by 58 of the 62 participants, 4 laboratories missed the NDM-7 gene. 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 # 1725453 with  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL, sample # 1725451 with  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL, and sample # 1725452 with  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL. Sample # 1725454 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

The samples # 1725451 and # 1725453 containing relatively high amounts of *C. difficile* ( $1 \times 10^4$  CFU/mL and  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) were with one exception correctly reported as “positive”. False-negative results should prompt a thorough evaluation of the test system and the workflow. The latter is definitely warranted for the participant reporting a false-positive result for sample # 1725454, containing only *E. coli*, but no target organism. As cross-reaction of the applied test system with *E. coli* DNA is unlikely, probably cross-contamination during the process of sample preparation and analysis is causative. Sample # 1725452 with the lowest amount of target organism ( $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL) was correctly identified as positive by 93 participants. Again a false-negative result should prompt re-assessment of the sensitivity of the used test system. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

## RV 546: VRE

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

Sample # 1725463 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecium* vanB ( $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL) and sample # 1725462 contained an approximately hundred lower amount *Enterococcus faecium* vanA ( $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL). Samples # 1725461 and # 1725464 contained no target organisms but only human cells and *E. coli*. Of the 38 participating laboratories, 37 correctly reported positive results for the samples # 1725462 and 1725463. Of note, the reported dedicated vanA/vanB identifications for these two samples were all correct. All laboratories correctly reported sample # 1725464 as “negative”. The false-positive result for sample # 1725461 should prompt investigations of the laboratory processes regarding sample processing. 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. 21)). A relatively high concentration of *Pneumocystis jirovecii* ( $\sim 1 \times 10^5$  organisms/mL) was present in sample # 1725602, whereas in sample # 1725604 *Pneumocystis jirovecii* ( $\sim 5 \times 10^3$  organisms/mL) was present at an approximately ten-fold lower concentration. The set was completed by samples # 1725601 and # 1725603 which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Sample # 1725602, which contained *P. jirovecii* target organisms ( $\sim 1 \times 10^5$  organisms/mL) at highest concentration and sample # 1725604 with a twenty-fold lower concentration of *P. jirovecii*, were both reported “positive” by 86 and 85 of the 87 participating laboratories, respectively. Although this could be due to a loss of template DNA during pre-analytical sample preparation procedures or other reasons like an insufficient lysis procedure of the almost intact target organisms in the lyophilized sample material, observation of false-negative results should certainly trigger reassessment of the diagnostic workflow, sensitivity and/or specificity of the individual assay concept. The *Pneumocystis*-negative samples (# 1725601 and # 1725603, containing only *E. coli* and a suspension of human cells) were correctly classified “negative” by all but one participant, respectively. In general, observing false-positive or questionable results for negative samples within our EQAS panels should definitely prompt investigations regarding all processes involved in sample preparation and analysis in order to optimize the applied PCR/NAT workflows, test kits or assay protocols.

## Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2018-9/lab000029.shtml>

1. Anhang1\_lab000029.pdf (353 KB)  
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)”  
November 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. Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschäpe H. Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol*. 2009 Jun;299(5):343-53. DOI: 10.1016/j.ijmm.2008.10.008
3. Stallworth C, Steed L, Fisher MA, Nolte FS. Legionnaires' disease caused by *Legionella londiniensis*. *J Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):4178-9. DOI: 10.1128/JCM.02182-12
4. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583 Externer Link
5. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
6. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

### 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, 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 November 2017 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab*. 2018;9:Doc01. DOI: 10.3205/lab000029, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000292

### This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2018-9/lab000029.shtml>

Published: 2018-01-04

### Copyright

©2018 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/>.