

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2018 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. (<https://www.instand-ev.de>) eingesehen werden. Obwohl die bevorzugte Sprache dieser Dokumente deutsch ist, streben wir an, zumindest eine kurze Diskussion der Ergebnisse sowie die wichtigsten wissenschaftlichen Aspekte in Englisch bereitzustellen und die Tabellen zweisprachig zu gestalten.

Udo Reischl¹
Martin Ehenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Michael Baier³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
Holger Scholz⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Roger Dumke⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Agnes Anders⁸

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

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

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

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

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

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

Universitätsklinikum Bonn,
Deutschland

8 Nationales Referenzzentrum
für Gram-negative
Krankhauserreger,
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*, *Brucella spp.*, *Pneumocystis jirovecii* (vorm. *P. carinii*), *Clostridium difficile* (Toxingene), VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken) und der molekularen Resistenztestung für Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae sowie dem vor kurzem neu ins Programm aufgenommenen Multiplex-Panel für Erreger von Urogenitalinfektionen darstellen und kurz diskutieren.

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

Wie bei allen anderen Ringversuchen erfolgt die Anmeldung zu ausgewählten Teilen der Reihe „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ über die Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in Medizinischen Laboratorien (INSTAND e.V.), Düsseldorf (<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 19 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „Highlights“. So wurden beispielsweise im aktuellen **RV 530 Chlamydia trachomatis & Neisseria gonorrhoeae** zwei Proben mit Mischungen von unterschiedlichen Mengen an *C. trachomatis* und Mengen an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen versandt. Interessanterweise ließ sich auch bei diesen Konstellationen die DNA von *C. trachomatis* im Gemisch mit *N. gonorrhoeae* DNA mit den meisten der kommerziellen und *in-house* PCR-Testsysteme zuverlässig nachweisen. In einer Probe befanden sich dabei relativ geringe Mengen an Gonokokken DNA in komplexer Mischung mit *C. trachomatis* infizierten Zellen. Hier konnten einige kommerzielle und *in-house* PCR-Testsysteme nur die DNA von *C. trachomatis* im Gemisch zuverlässig nachweisen.

In einer der 4 Einzelproben des aktuellen Ringversuchs **RV 532: Bordetella pertussis** befanden sich relativ hohe Mengen eines klinischen *Bordetella holmesii* Isolats, das eine Genkopie des üblicherweise für den *B. pertussis*-Nachweis verwendeten IS481 Insertionselements aufweist. Auch solche Varianten können in unseren Breiten durchaus vorkommen und führten im Rahmen des aktuellen Ringversuchs bei zahlreichen Teilnehmern (bzw. bei den von ihnen eingesetzten Testsystemen) zu falsch-positiven PCR Ergebnissen für *B. pertussis*.

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 oder zu „fraglichen“ MRSA Ergebnissen führte. In der mikrobiologischen Praxis der PCR/NAT-gestützten MRSA Direkt-nachweisverfahren 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 8% 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“ SCCmec Kassettypen (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.

Mit der Auswahl eines etwas breiteren Spektrums von relevanten Carbapenemase-Genen bestätigte sich im Rahmen des Ringversuchs **RV 544 Carbapenemase-Gene** erneut die Vermutung, dass viele der derzeit verwendeten kommerziellen sowie *in-house* Testsysteme zur molekularen Carbapenemase Detektion noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase-Genen aufweisen. Im aktuellen Ringversuch scheint dies insbesondere für Isolate mit dem etwas exotischeren GES-5 zu gelten. Das Isolat aus dem *Citrobacter freundii*-complex mit GES-5 wurde lediglich von 11 der insgesamt 88 Teilnehmer detektiert.

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

Aktueller **Hinweis auf neue Ringversuche**: Aufgrund einiger Anfragen aus dem Teilnehmer- und Kollegenkreis haben wir zwei zusätzliche Ringversuche etabliert, die nach erfolgreichen Probe-Ringversuchsrunden in 2018 im kommenden Jahr nun in das reguläre Portfolio „Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. übernommen werden:

- Der Ringversuch **RV 543: *Francisella tularensis*** wurde in der aktuellen Aussendung bereits optional um den Zielorganismus ***Brucella spp.*** erweitert und wird zukünftig routinemäßig als kombinierter Ringversuch angeboten.
- Für die externe Qualitätssicherung zukünftig kommerziell verfügbarer (und damit wohl auch vermehrt eingesetzten) **PCR/NAT-gestützten Nachweisverfahren für Urogenital-Infektionen** haben wir mit der aktuellen Aussendung bereits einen neuen Ringversuch etabliert, der vom Konzept her jeweils einige der nachfolgenden Erreger in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen innerhalb des 4-er Panels enthält: **RV 547 „Urogenital-Panel“** zum Nachweis von ***Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*** und ggf. ***Treponema pallidum***.

Nach dem großen Interesse innerhalb der Teilnehmer-schaft und dem erfolgreichem Abschluss der beiden Piltringversuchsrunden im Mai und November diesen Jahres wird RV 547 im kommenden Jahr nun ebenfalls in das reguläre Portfolio „Bakterien- und Pilzgenom-nachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. übernommen.

Vorab auch noch eine Anmerkung zu den statistisch ermittelten und in den jeweiligen Tabellen 3 aufgeführten Leistungsdaten von kommerziellen PCR/NAT-Testsystemen. 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 möglichst zuverlässigen Durchführung und standardisierten Ergebnisinterpretation. Die auffällige „Streuung der Performance“ (bzw. das Auftreten einzelner Ausreißer) unterstreicht umso mehr die Bedeutung der aktuell vorgegebenen 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.

Neben den überaus motivierten und engagierten Mitarbeitern der verschiedenen Sollwert-Laboratorien unterstützen uns bei der Konzeption und Auswertung der zahlreichen Ringversuche zum Bakterien- und Pilzgenom-nachweis PCR/NAT noch zahlreiche Kolleginnen und Kollegen aus unserem Hause. Allerherzlichsten Dank für ihre spontane Bereitschaft sowie ihr ehrenamtliches Engagement für unsere gemeinsamen Bemühungen zur externen Qualitätssicherung molekularbiologischer Nachweisverfahren in der infektiologischen Diagnostik.

Untersuchungsergebnisse November 2018

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 # 1825303), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 1825353),

Legionella pneumophila (Probe # 1825364), *Listeria* spp. (Probe # 1825384), *Coxiella burnetii* (Probe # 1825421), *Ureaplasma parvum* (Probe # 1825472) sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1815603).

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. Tabelle 1 (Anhang 1) zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tabelle 2 (Anhang 1) nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen, und in Tabelle 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. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit einer relativ hohen Menge an *C. trachomatis* (# 1825303 $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL), und zwei Proben mit einer 10-fach niedrigeren Menge an *C. trachomatis* (# 1825301 und # 1825304, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL und $\sim 1 \times 10^5$ IFU/mL). Eine der *C. trachomatis*-positiven Proben (# 1825304) war dabei zugleich mit ca. 5×10^5 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* und eine mit einer sehr geringen Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen (# 1825303; $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL) versetzt. Die Probe # 1825302 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Trotz der relativ geringen Erregermenge in einigen der drei unterschiedlich zusammengesetzten positiven Proben und der gleichzeitigen Anwesenheit von *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* DNA 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 CT und GO Befunde.

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

Auch wenn die schwächer positive Probe # 1825301 des aktuellen Ringversuchs nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden waren, fanden sich unter den von insgesamt 250 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* erfreulicherweise keine falsch-negativen Ergebnisse. Bei den beiden ca. 2-fach bzw. 10-fach stärker CT-positiven Proben # 1825304 bzw. # 1825303 des aktuellen Ringversuchs wurde lediglich von je einem der 250 Teilnehmer bei Probe # 1825303 und Probe # 1825304 ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Bei den insgesamt 5 falsch-positiven CT Ergebnissen für Probe # 1825302 handelt es sich vermutlich um Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung der gleichzeitig prozessierten CT-positiven Proben. Den betroffenen Laboratorien sollten diese Ergebnisse Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-DNA Nachweises wurden für die zwei positiven Proben # 1825303 und # 1825304 (*N. gonorrhoeae*; ca. 5×10^2 bzw. 5×10^5 CFU/mL) diesmal von 12 der insgesamt 250 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken DNA mitgeteilt.

Auffällig war die Häufung von falsch-negativen Ergebnissen ($n=10$) bei Probe # 1825303, die neben einer relativ geringen Menge an Gonokokken zugleich signifikante Mengen an *C. trachomatis* infizierten Zellen enthielt. Wie bereits bei einigen früheren Ringversuchsrunden beobachtet, sind offenbar einige der im Teilnehmerkreis eingesetzten kommerziellen und *in-house* PCR/NAT Testsysteme etwas störanfällig was den sensitiven Nachweis von Gonokokken bei gleichzeitiger Anwesenheit von *C. trachomatis* betrifft. Da sich das hier beobachtete „Sensitivitätsproblem“ offenbar weitgehend auf solche NAT-Testsysteme beschränkt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen (s.u.), 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. Aufgrund der relativ geringen Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen in Probe # 1825303 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grauschraffierten Felder in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 1) und Tabelle 6 (Anhang 1, S. 3) gekennzeichnet.

Selbst wenn mit der schwach-positiven Probe # 1825303 die untere Nachweisgrenze der meisten hochsensitiven und standardisierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme zum Nachweis von *N. gonorrhoeae* DNA noch nicht erreicht oder unterschritten wurde, stehen mit den Rückstellproben des Ringversuchs RV 531 November 2018 den Teilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität wieder geeignete Sets zur Überprüfung

und Optimierung ihrer jeweiligen NAT-gestützten Testsysteme zur Verfügung. Auch angesichts der nach wie vor anhaltenden Diskussion um das „Pooling“ von entsprechendem Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

Bei den insgesamt 7 falsch-positiven GO Ergebnissen bei den beiden *N. gonorrhoeae*-negativen Proben # 1825301 und # 1825302 handelt es sich vermutlich nicht um unspezifische Kreuzreaktionen sondern vielmehr um isolierte Kontaminationsereignisse oder Ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“, da von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen hier durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden.

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

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

Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchssproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen, wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden, von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden sowohl die *C. trachomatis* Zielorganismen in allen drei CT-positiven Einzelproben als auch die *Neisseria gonorrhoeae* Zielorganismen in der Probe # 1825304 von allen der 8 Teilnehmer mit RNA-basierten

Gen-Probe Testsystemen erfolgreich nachgewiesen und die entsprechenden Zertifikate erlangt.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen der 250 Teilnehmern durchgeführt (bzw. deren regelgerechte Durchführung und Auswertung in Protokollbogen angegeben). Inhibitionsereignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 2) nicht zwischen dem spezifischen Nachweis von Chlamydien und Gonokokken differenziert wurde. Mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme wurden insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Um eine detaillierte Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen, wurden diesmal zusätzlich die Tabellen 4 bis 7 (Anhang 1, S. 2–4) 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: BD Max CT/GC/TV assay (15x), Seegene Allplex STI Essential Assay (5x), Seegene Anyplex™ II STI-7 Detection (4x), QIAGEN artus CT/NG QS-RGQ Kit (4x), GeneProof *N. gonorrhoeae*/*C. trachomatis* PCR Kit (3x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae*/*C. trachomatis* Real-TM (3x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (2x), EUROIMMUN Euroarray STI-11 (2x), BIORON RealLine single und multiplex CT/NG Kits (2x), fast-track Diagnostics Urethritis plus (3x), fast-track Diagnostics Urethritis basic (1x), fast-track Diagnostics Kits (2x), Diagenode *N. gonorrhoeae* (S-DiaGono) (2x), Diagenode (S-Dia CT) (1x), Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (1x), Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (1x), Mikrogen ampliCube STD Panel 1 (2x), AmpliSens *C. trachomatis*-FRT PCR Kit (1x), AmpliSens *N. gonorrhoeae*-screen-FRT PCR Kit (1x), HAIN Lifescience FluoroType CT/NG (1x), Aptima Combo 2 assay CT/GC (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), VIASURE sexually transmitted diseases RT PCR Detection Kit (1x), DiagCor GenoFlow STD array test kit (1x), Autoimmun Diagnostika Kit (1x) und Autoimmun Diagnostika Gen ID RDB2110 STD (1x).

Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems soll in diesem Zusammenhang auch noch einmal darauf

hingewiesen werden, dass in Gegenwart von relativ hohen Mengen an Zielorganismen (bzw. deren Nukleinsäure) die interne Kontrollreaktion aufgrund der „Konkurrenzsituation“ mit der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz durchaus negativ ausfallen kann, obwohl keine Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt.

RV 531: Chlamydia trachomatis

Das Probenet des aktuellen Ringversuchs enthielt diesmal eine Probe mit ca. 5×10^5 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1825313), eine Probe mit ca. 1×10^5 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1825314), eine Probe mit ca. 5×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1825311), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1825312), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 (Anhang 1, S. 5) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den 70 Teilnehmern bei der *C. trachomatis*-negativen Probe # 1825312 nur ein falsch-positives Ergebnis und bei den drei *C. trachomatis*-positiven Proben (# 1825311, # 1825313 und # 1825314) diesmal auch nur ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Das ist doch insgesamt eine sehr erfreuliche Datenlage, die keiner großen Diskussion bedarf.

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.

Inhibitionskontrollen wurden von allen der insgesamt 70 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal von keinem der Teilnehmer beobachtet. 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: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), BD Max CT/GC/TV assay (2x), Seegene Allplex STI Essential Assay (1x), Sansure Biotech *C. trachomatis* DNA Fluorescence Diagnostic Kit (1x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (1x), EUROIMMUN Euroarray STI-11 (1x), Autoimmun Diagnostika GenID RDB2110-STD (1x), Autoimmun Diagnostika Kit (1x), AmpliSens *C. trachomatis*-FRT (1x), BIORON RealLine *C. trachomatis* (1x) und IAB *C. trachomatis* RG detect (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an *B. pertussis* Zielorganismen (# 1825322 mit 5×10^4 CFU/ml), eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella holmesii* (# 1825324 mit 1×10^4 CFU/mL), und eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella parapertussis* (# 1825323 mit 1×10^5 CFU/mL) als „verwandte“ Spezies. Die Probe # 1825321 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

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

Der spezifische Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in der Probe # 1825322 bereitete den insgesamt 146 Teilnehmern offenbar keine allzu großen Schwierigkeiten. Lediglich von 2 Teilnehmern wurde hier ein falsch-negatives Ergebnis berichtet und ein Teilnehmer klassifizierte seinen Befund als „fraglich“. Für die Probe # 1825323 des aktuellen Sets mit einer hohen Menge von $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *Bordetella parapertussis* wurden ebenfalls überwiegend korrekt negative Ergebnisse mitgeteilt. Vier der insgesamt 146 Teilnehmer beobachteten mit ihren *B. pertussis*-spezifischen PCR/NAT Testsystemen hier jedoch ein falsch-positives Ergebnis.

Im RV 532 befand sich diesmal wieder ein IS481-positives *Bordetella holmesii*-Isolat, das (Methoden- bzw. Zielsequenz-bedingt) mit vielen der *B. pertussis*-spezifischen NAT-Testsysteme kreuzreagierte. Diese Problematik spiegelt sich beispielsweise in einer Veröffentlichung aus Frankreich wider [2].

Insgesamt betrachtet scheint aber der Vorteil einer hochsensitiven Detektion von *B. pertussis* und *B. holmesii* über die Verwendung der repetitiven IS481-Zielsequenz die Nachteile einer (eher aus akademischer Sicht wünschenswerten) Differenzierungsmöglichkeit zwischen den beiden Spezies in der PCR-Routinediagnostik mehr als aufzuwiegen. Zudem scheint in unseren Breiten *B. holmesii* eher selten aufzutreten (siehe [3]) und Infektionen mit beiden Spezies scheinen eine gleichermaßen „behandlungsbedürftige“ Symptomatik hervorzurufen. Eine Abgrenzung zu den übrigen (IS481-negativen) *Bordetella*-Spezies muß jedoch aus diagnostischer Sicht stets gewährleistet sein. Angesichts der sehr hohen Richtigkeitsquote für die *B. pertussis*-positive Probe # 1825322 und der technisch bzw. methodisch bei der Verwendung der IS481-Zielsequenz zu erwartenden Kreuzreaktion mit dem aktuellen *B. holmesii* Isolat in Probe # 1825324 hat sich der Ringversuchsleiter (in enger Abstimmung mit dem Sollwertlabor) dazu entschlossen, bei der Erteilung der Zertifikate die falsch-positiven Ergebnisse bei *B. holmesii* nicht als falsch zu bewerten.

Die 4 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der *B. parapertussis*-positiven Probe # 1825323 sollten jedoch intensiv daran arbeiten, die Kontaminationssicher-

heit und/oder die analytische Spezifität ihrer jeweiligen Testsysteme zu verbessern.

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

Inhibitionskontrollen wurden von 144 der insgesamt 146 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden bei dem aktuellen Probenstet bei keinem der Teilnehmer innerhalb der jeweils ausgesandten vier Einzelproben beobachtet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete ungefähr die Hälfte der Teilnehmer ($n=46$) selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifizierte kommerzielle Testkits ($n=52$) mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 44 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 6 Teilnehmern die Verwendung der *pertussis* Toxin Gen und von 2 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType *Bordetella* (7x), HAIN Lifescience Genoquick *Bordetella* (1x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Altona diagnostic RealStar *Bordetella* PCR Kit (4x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (3x), Meridian Bioscience illumigene *Pertussis* (2x), Mikrogen ampliCube RB Panel 2 (2x), fast-track Diagnostics *Bordetella* (1x), AmpliSens *Bordetella* multi FRT PCR Kit (1x), Ingenetix Bacto Real *B. pertussis/B. parapertussis* (1x), DiaSorin Simplexa *Bordetella* direct Kit (1x), BioGX *Bordetella* PCR Kit (1x), QUIDEL Solana *Bordetella* Complete Assay (1x), QUIDEL AmpliVue *Bordetella* Assay (1x), Sacace Biotechnologies *B.pertussis/B.parapertussis/B.bronchiseptica* Real-TM (1x), ARGENE *Bordetella* r-gene (1x), Biomerieux Kit (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x) und Gerbion diarella *Bordetella* PCR Kit (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 7) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit einer sehr hohen Menge an Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* (# 1825333; $\sim 10^6$ CFU/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1825331; $\sim 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1825332, $\sim 10^4$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1825334), die nur humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analyzesysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in zwei der drei positiven Proben (#1825333 mit $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL und # 1825331 mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) führte beim Nachweis von *H. pylori*-DNA im aktuellen Ringversuch erfreulicherweise zu Richtigkeitsquoten von 100%. Lediglich bei der Probe mit der geringsten Menge an Zielorganismen (#1825332 mit $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) wurde von einem der insgesamt 47 Teilnehmer ein falsch-negatives PCR/NAT Ergebnis für *H. pylori*-DNA berichtet. Auch wenn diesmal keine „non-pylori“ *Helicobacter*-Spezies in einzelnen Proben des 4-er Sets versandt wurden, deutet die Ergebniskonstellation dennoch auf eine gute analytische Spezifität und analytische Sensitivität der eingesetzten PCR-Testsysteme hin. Sowohl die kommerziellen, als auch die eigenentwickelten Testsysteme schnitten im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab.

Neben den 30 Teilnehmern mit spezifizierten kommerziellen Testsystemen und 15 Teilnehmer mit selbstentwickelten, sog. *in-house* Testsystemen zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* DNA wurden im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: 2 x LightMix *Helicobacter* Kit von TIB Molbiol und 1 x AmpliSens *H. pylori*.

Inhibitionskontrollen wurden von allen der insgesamt 47 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionseignisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

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 45 der insgesamt 47 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines einzigen Teilnehmers waren die mitgeteilten (Clarithromycin-sensiblen bzw. „Wildtyp-“) Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

RV 534: EHEC/STEC

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei unterschiedliche, aber relativ stark EHEC positive Proben mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1825341: *E. coli*,

*stx*₁-positiv) und mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1825342: *E. coli*, *stx*₁-, *stx*₂- und O157-positiv) sowie eine Probe mit 1×10^4 CFU/ml eines ST- und LT-positiven ETEC Isolats (# 1825344). Probe # 1825343 enthielt einen *E. coli* Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ).

In diesem Ringversuch waren keine „exotischen“ Shiga-Toxin-Genen vertreten, sodass, begründet auf die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC, bei allen Proben durchwegs hohe Richtigkeitsquoten – sowohl für positive, als auch für negative Befunde – verzeichnet werden konnten. Die beiden EHEC-positiven Proben # 1825341 und # 1825342 wurden von 133 bzw. 134 der insgesamt 134 Teilnehmer als richtig-positiv berichtet. Eine naheliegende Erklärung für das eine isolierte falsch-negative Ergebnis bei der *stx*₁-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1825341 gibt es aus Sicht der Ringversuchsauswertung nicht. Einzelne, sporadisch beobachtete falsche Ergebnisse sind aber im Rahmen dieser umfangreichen Ringversuchsserien mit hunderten von Teilnehmern nichts wirklich Aussergewöhnliches. Die Probe # 1825343 (*E. coli* K12 Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde diesmal von allen der insgesamt 134 Teilnehmer korrekterweise als negativ befundet. Probe # 1825344, welche in der aktuellen Ringversuchsrunde ca. 1×10^4 CFU/ml eines ST- und LT-positiven ETEC Isolats enthielt, wurde erfreulicherweise ebenfalls von nahezu allen der insgesamt 134 Teilnehmer korrekt als negativ für EHEC/STEC befundet. Lediglich einer der Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis hier als „fraglich“.

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

Neben *in-house* Testsystemen werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle Assays eingesetzt. In den Richtigkeitsquoten zeigte sich keine Über- bzw. Unterlegenheit eines Systems, was für die breite Etablierung PCR-/NAT-gestützter Testsysteme spricht. Inhibitionskontrollen wurden von 132 der 134 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionseignisse wurden in keinem Fall beobachtet. Zudem wurden von 115 Teilnehmern die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt. Lediglich ein Teilnehmer berichtete hier falsche Ergebnisse.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: BD Max Enteric Bacterial Panel (5x), Seegene Allplex Gastrointestinal

Panel Bacteria II Assay (4x), TIB Molbiol LightMix modular stx-1/stx-2/eae (4x), TIB Molbiol EHEC Toxin Gene stx1 und stx2 (1x), Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (2x), Biomerieux BioFire GI Panel (2x), Amplex eazplex EHEC complete (2x), Amplex Vanplex (1x), Sacace Biotechnologies EHEC Real-TM (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), fast-track Diagnostics (1x), Mikrogen ampliCube GB2 (1x) und VIASURE E.coli Real Time PCR Detection Kit (1x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Nachdem die Probenauswahl des letzten Ringversuchs mehr auf die analytische Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzielte, wollen wir im aktuellen Ringversuch auch wieder einmal die analytische Sensitivität abprüfen. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher eine Probe mit einer relativ hohen Menge (# 1825354, $\sim 5 \times 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 1825351, $\sim 5 \times 10^4$ Organismen/mL) und eine Probe mit relativ geringer Menge (# 1825353, $\sim 5 \times 10^3$ Organismen/mL) an *Borrelia bavariensis*. Probe # 1825352 wurde diesmal lediglich mit einer signifikanten Menge an *Treponema phagedenis* ($\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL) versetzt.

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

Nun aber zu den eigentlichen Ringversuchsergebnissen: die Detektion von *Borrelia bavariensis* Zielorganismen in den Proben mit relativ hoher Erregerlast (#1825354 mit $\sim 5 \times 10^5$ Organismen/mL bzw. # 1825351 mit $\sim 5 \times 10^4$ Organismen/mL) bereitete lediglich je einem der insgesamt 97 Teilnehmer gewisse Probleme, sodass für beide Proben erfreulich hohe Quoten richtig-positiver Ergebnisse erreicht werden konnten. Bei einer erneut ca. zehnfach geringeren Erregerlast von $\sim 5 \times 10^3$ *Borrelia bavariensis* Organismen/mL (Probe 1825353) wurde bereits von 3 der insgesamt 97 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis berichtet. Bei der „negativen“ Probe # 1825352,

die diesmal lediglich eine nennenswerte Menge an *Treponema phagedenis* als „non-Borrelia Spirochäten“ neben humanem Zellmaterial enthielt, beobachteten nur 2 der insgesamt 97 Teilnehmer mit ihren Borrelien-spezifischen PCR/NAT Testsystemen ein positives Ergebnis. Hier könnte es sich eventuell um eine Verschleppung von Borrelien-positivem Material aus der positiven Probe „1“ während der Aufarbeitung und DNA-Isolierung handeln. Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von allen 97 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 50 der 97 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 98%) zu beobachten. Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (3x), BIORON RealLine Borrelien Kit (3x), Demeditec GenFlow *Borrelia* plus PCR (2x), Autoimmun Diagnostika Tick Screening RDB 2225 (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), Mikrogen alphaCube *Borrelia* (1x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (1x), Attomol *B. burgdorferi* Realtime LT (1x), Attomol *Borrelia* PCR Kit (1x) und VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

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

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 10) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1825361 mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), und Probe # 1825364 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL). Probe # 1825362 und # 1825363 enthielten ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Die beiden negativen Einzelproben # 1825362 und # 1825363 aus dem aktuellen Set wurden erfreulicherweise von 118 bzw. 119 der insgesamt 120 Teilnehmer korrekterweise als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Insgesamt 3 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-positives Ergebnis. Da diese Probe lediglich *E. coli*-Zellen enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich. Vermutlich sind die falsch-positiven *L. pneumophila* Befunde hier durch laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung bedingt.

Die relativ stark positive Probe # 1825361 mit ca. 5×10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG2 wurde von allen 120 Teilnehmern korrekterweise als positiv befundet. Die etwa 100-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 1825364 (ca. 5×10^3 CFU/mL) konnte immerhin noch von 85 Teilnehmern als positiv identifiziert werden, allerdings wurden hier bereits schon 35 falsch-negative Ergebnisse berichtet. Da wir ja bereits aus früheren Ringversuchsrunden um die unteren Grenzen der analytischen Sensitivität von durchschnittlich sensitiven PCR/NAT Testsystemen für *L. pneumophila* von ca. 5×10^2 CFU/mL an Zielorganismen wissen, haben wir diese Probe als „edukativ“ betrachtet und die Ergebnisse bei der Erteilung der Zertifikate hier nicht als „falsch-negativ“ gewertet. Allerdings sollte der aktuelle Ringversuch und insbesondere falsch-positive Ergebnisse bei den Proben # 1825362 und # 1825363 zum Anlass genommen werden, die diagnostische Sicherheit bezüglich einer Kontaminations- bzw. Amplikonverschleppungs-Problematik der verwendeten Testsysteme kritisch zu hinterfragen und gegebenenfalls zu optimieren. Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 81 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Im handschriftlichen Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *L. pneumophila* PCR Kit (5x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (5x), Seegene Anyplex II RB5 Detection (1x), ARGENE Kits (4x), fast-track Diagnostics Kits (3x), Mikrogen Diagenode Legionella (3x), Mikrogen ampliCube Respiratory Panel 1(3x), Mikrogen FTD Atypical CAP (1x), r-Biopharm RIDAGENE CAP BAC (1x), Biologio ReadyMax B-CAP Assay (1x), Biologio Atypical Pneumonia-1 Assay (1x), Biologio Kit (1x), BioGX Atypical

Pneumonia (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), Vircell Speed-oligo *Legionella* (1x), Eurobio Respiratory multiplex Panel RV4 (1x), Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (1x), BioMerieux real-time PCR R-gene Kit (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 enteritidis (# 1825372 mit $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe mit *Salmonella enterica* Serovar typhi (# 1825374 mit $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe mit EHEC stx_1 -positiv (# 1825371 mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und eine Probe ohne Zielorganismen (# 1825373), 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 je ein falsch-positives PCR/NAT Ergebnis bei den beiden *Salmonella* DNA negativen Proben # 1825371 und # 1825373 zu beobachten. Bei den beiden positiven Proben innerhalb des aktuellen Sets, # 1825372 und # 1825374, wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 25 Teilnehmern durchwegs korrekt positive Ergebnisse berichtet. Im direkten Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden deutet dies auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: BD Max Enteric Bacterial Panel (3x), TIB Molbiol LightMix Modular (1x), fast-track Diagnostics (1x), Mikrogen ampliCube Gastroenteritis Bacteria Panel I (1x) und Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Bacteria Assay (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 genauen unteren Nachweisgrenzen für den NAT-gestützten Salmonellen-Nachweis festgelegt wurden.

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden in zukünftigen Ringversuchsrunden auch wieder andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein. Probe # 1825382 des aktuellen Sets enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 5×10^4 CFU/mL), die erfreulicherweise von allen der insgesamt 40 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1825384 enthielt mit ca. 1×10^3 CFU/mL eine etwa fünfzigfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Lediglich 4 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis und einer der Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis als „fraglich bzw. grenzwertig“. Aufgrund der geringen Menge an Zielorganismen haben wir Probe # 1825384 diesmal als „edukativ“ betrachtet und die Ergebnisse bei der Erteilung der Zertifikate hier nicht als falsch-negativ bewertet.

Erfreulicherweise wurden auch die beiden negativen Proben des aktuellen Sets #1825381 und #1825383, welche ausschließlich humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielten, von allen Laboratorien als „negativ“ befundet, was erneut für eine sehr gute Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden Laboratorien spricht.

Wie bereits in vorangegangenen Ringversuchsrunden wurden von den Teilnehmern ganz überwiegend *Listeria monocytogenes*-spezifische Testsysteme eingesetzt (n=34). 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 Inhibitionsereignisse 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), VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *E. coli* Real Time PCR Detection (1x), Biologio Meningitis Panel-1 (1x), Progenie RealCycler *Listeria* spp. (1x), AmpliSens *L. monocytogenes* PCR Kit (1x) und QIAGEN mericon *Listeria* spp Kit (1x).

RV 539: MRSA

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

Wie an dieser Stelle bereits mehrfach thematisiert basieren einige der derzeit etablierten eigenentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum Direktnachweis von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern, Staphylokokkenspezies-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen in der entsprechenden Nukleinsäurepräparation. Da sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken das *mecA*-Gen für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Aussagekraft dieser PCR-gestützten Testsysteme für den Direktnachweis von MRSA aus nativem Patientenmaterial eingeschränkt, wenn beim Patienten eine gleichzeitige Besiedelung mit *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. SCC*mec*-basierte PCR-Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCC*mec*-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCC*mec*-Kassette im *S. aureus*-Genom als Zielsequenz verwenden. Dass aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCC*mec*-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCC*mec*-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCC*mec*-Kassette vorhandene *mecA*-Gens versandt. Da wir diesmal, abgesehen von einer Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-

negativen Staphylokokkenspezies (eine Konstellation die in der täglichen Praxis nicht gerade selten beobachtet wird), keine „interessanten“, „schwierigen“ oder komplexen Probenkonstellationen versandt haben, wurden von den insgesamt 294 Teilnehmern mit ihren unterschiedlichsten NAT-gestützten Testsystemen nahezu durchweg korrekte PCR Ergebnisse für 3 der insgesamt 4 Proben des aktuellen Panels berichtet.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 13) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1825391 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 # 1825394 eine nennenswerte Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (MRSA; PVL-positiv; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), die Probe # 1825392 eine deutlich höhere Menge eines weiteren Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (MRSA; PVL-positiv; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), und die Probe # 1825393 ein „ganz gewöhnliches“ *mecA*-negatives *Staphylococcus epidermidis* Isolat ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml).

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der relativ stark positiven MRSA Probe # 1825392 von 292 der insgesamt 294 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Auch wenn sich in der zweiten MRSA-positiven Probe 1825394 eine etwa 50-fach geringere Menge an entsprechenden Zielorganismen befand, so kann die dabei beobachtete Richtigkeitsquote von 96% noch als durchaus zufriedenstellend betrachtet werden. Für diese Probe wurden von 283 Teilnehmern korrekt positive Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 11 falsch-negativen Ergebnisse bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden von diesen beiden 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 1×10^4 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1825394 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Wenn man sich die relativen Richtigkeitsquoten der Testsysteme in der Tabelle 3 (Anhang 1, S. 14) etwas genauer betrachtet und die zumeist streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen aus der täglichen Routine kennt, so bleibt es jedes Mal aufs Neue verwunderlich, dass ein nennenswerter Anteil der teilnehmenden Laboratorien mit den betroffenen Testsystemen erfolgreich die vorgegebenen Zielwerte erreicht und manche Teilnehmer leider nicht... Diese Konstellation deutet 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.

Im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit vergleichbarer Probenkonstellation wurde bei Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies in Probe # 1825391 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 272 der insgesamt 294 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere 7 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von 5 dieser 7 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. Damit 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.

Anmerkung des Ringversuchsleiters: bei der Mitteilung von fraglichen Ergebnissen werden die entsprechenden Zertifikate in der Regel nur dann erteilt, wenn diese Teilnehmer bei den übrigen 3 Proben des Ringversuchs korrekte Ergebnisse angeben haben.

Die restlichen 15 Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Den betreffenden Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 1825391 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 15 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 # 1825391 in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 14) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird schnell ersichtlich dass alle der derzeit etablierten SCC*mec*-basierten Testsysteme bei diesem Gemisch korrekterweise MRSA-negative Befunde liefern (da das *S. aureus*-Genom der MSSA-Komponente ja *de facto* keine integrierte SCC*mec* Kassette aufweist).

Bei der Probe ohne MRSA Zielorganismen (# 1825393), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an einem „ordinären“ *mecA*-negativen *Staphylococcus epidermidis* Patientenisolat enthielt, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs von 11 der

294 Teilnehmer ein falsch-positives MRSA Ergebnis beobachtet. Dabei liegt das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontaminationsereignisses oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe. Solche „Ausreißer“ sind bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion. Bei 3 dieser 11 Teilnehmer liegt diesmal übrigens eine Probenverwechslung nahe (Probe „3“ als positiv und gleichzeitig Probe „4“ als negativ für MRSA befundet). Leider können wir solche augenscheinlichen Verwechslungsereignisse bei der Erteilung der Zertifikate nicht berücksichtigen oder mitgeteilte Ergebnisse seitens der Ringversuchsleitung nachträglich wohlwollend ausbessern. Ich hoffe diese Vorgehensweise ist selbst aus Sicht der betroffenen Teilnehmer weitgehend nachvollziehbar.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der erfreulich große Anteil von richtig-positiven Ergebnissen, bei der einen positiven Probe und die überwiegend richtig-negativen Befunde bei den 2 MRSA-negativen Proben, erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. labor-spezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht.

Abgesehen von der zuletzt diskutierten Probe 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 55 der insgesamt 294 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diesmal die negativen Ergebnisse aller Proben für die molekularbiologische PVL-Testung durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise bei Linde et al. [4] oder Witte et al. [5]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in Reischl et al. [6].

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Amplex eazplex MRSA (3x), HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (2x), VELA diagnostics Sentosa SA Direct MRSA Test (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA combi (1x), Immundiagnostik MutaPLEX MRSA (1x) und Diarella MRSA real time PCR Kit TM von Gerbion (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit einer relativ hohen Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1825401; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL) und eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1825403; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL), eine Probe mit ca. $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL an *Mycoplasma pneumoniae* (# 1825402), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1825404), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Wie bereits in den vorhergegangenen Ringversuchen zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die hervorragende analytische Sensitivität und Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tabelle 2 (Anhang 1, S. 15) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch alle bis auf 3 Teilnehmer die Zielorganismen in der etwas schwächer positiven Probe # 1825403 (ca. 5×10^4 IFU/mL) noch sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Mit ca. 5×10^5 IFU/mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1825401 diesmal eine relativ hohe Menge an *C. pneumoniae*-Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde letztere Probe ebenfalls von 119 der insgesamt 120 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet.

Angesichts der mit 5×10^5 bzw. 5×10^4 IFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei beiden Proben # 1825401 und # 1825403 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung seines entsprechenden NAT-gestützten Testsystems geben.

Erfreulicherweise wurden für die beiden Proben ohne Zielorganismen # 1825402 (*Mycoplasma pneumoniae*) von allen 120 Teilnehmern und # 1825404 (humanes Zellmaterial und nennenswerte Menge an *E. coli*) ebenfalls von 116 der insgesamt 120 Teilnehmer richtig negative Ergebnisse berichtet. Dies unterstreicht wieder einmal aufs Neue die hohe analytische Spezifität der eingesetz-

ten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA. Bei den drei isoliert falsch-positiven Ergebnissen könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung gehandelt haben. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von Mykoplasmen oder *E. coli* erscheinen eher als unwahrscheinlich.

Die Teilnehmer haben alle entweder kommerzielle oder selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *C. pneumoniae* DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion bei den vier versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs wurde dabei von keinem der Teilnehmer beobachtet. 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 15 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 7 Teilnehmern der Diagenode MP/CP Kit, von 6 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit und von 5 Teilnehmern der AID CAP Bacteria Kit angegeben. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (6x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (6x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (5x), Mikrogen ampliCube Resp. Bact. Panel 1 (3x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae* (3x), fast-track Diagnostics Atypical CAP Kit (2x), fast-track Bacterial pneumonia CAP (1x), fast-track Diagnostics Kit (1x), r-Biopharm RIDAGENE CAP BAC (2x), Biologio ReadyMax B-CAP Assay (2x), BioGX Atypical Pneumonia (1x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (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 klinischen Untersuchungsgut, wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial, konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Dieses Mal waren jedoch keine Proben mit geringen Mengen an Zielorganismen im ausgesandten Probenstet vertreten.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 16) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal nur eine positive Probe (# 1825412) mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL). Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielt Probe # 1825413 (*Mycoplasma hominis*; $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) diesmal nennenswerte Mengen an einer zu dem Zielorganismus verwandten Mykoplasmen-Spezies. Proben # 1825411 und # 1825414 enthielten ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*. Mit drei Ausnahmen konnten die 138 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1825412 nachweisen, zusätzlich wurde ein fragliches Ergebnis berichtet. Für die beiden, negativen, *E. coli*-haltigen Proben (# 1825411 und # 1825414) wurden 1 bzw. 2 falsch-positive Ergebnisse eingereicht, bei der dritten *M. hominis*-haltigen Probe (# 1825413) waren es sogar 4. Bei den falsch-positiven Ergebnissen könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Eventuelle Kreuzreaktivitäten der *M. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von anderen Mykoplasmen-Spezies sollten von den betroffenen Teilnehmern abgeprüft und die entsprechenden Testkonzepte ggf. nachgebessert werden. Insgesamt jedoch zeigte die Ergebniskonstellation in einem breiten Teilnehmerfeld mit unterschiedlichsten Testsystemen und PCR-Protokollen eine relativ hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA. Inhibitionskontrollen wurden von 137 der 138 Teilnehmer mitgeführt, für keine der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsereignisse berichtet. Selbstentwickelte PCR-/NAT-Testsysteme kamen bei 38 Teilnehmern zum Einsatz, während in den anderen Laboratorien kommerzielle Testsysteme verwendet wurden. Die Richtigkeitsquoten lagen bei *in-house* und vorkonfektionierten Assays auf vergleichbarem Niveau.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 99 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits (siehe Tabelle 3 Anhang 1, S. 17) oder „andere kommerzielle Testsysteme“ angegeben. Teilnehmer mit 5 von 6 der namentlich aufgeführten kommerziellen Testkits konnten damit durchwegs Richtigkeitsquoten von 100%, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Diagnostics Kits (9x), ARGENE Ch/Myco. *pneumoniae* r-gene Kit (6x), ARGENE Ch/Myco. *pneumoniae* (1x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (4x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae*-FRP PCR Kit (3x), Mikrogen ampliCube Respiratory Bacterial Panel 1 (3x), Mikrogen FTD Atypical CAP (1x), Biologio mit BD Max (3x), BioGX Atypical Pneumonia (1x), r-Biopharm RIDAGENE CAP BAC (1x), Sartorius Microsart ATMP Mycoplasma (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), Meri-

dian Bioscience illumigene Mycoplasma (1x), Eurobio Respiratory Panel Allplex RV4 (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 4-er Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tabelle 1, Anhang 1, S. 17) enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *C. burnetii* ($\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1825423 und $\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1825421), zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Bacillus anthracis* UR-1 Isolat DNA ($\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1825422 und $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1825421), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1825424), 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. 17) sowie für *B. anthracis* in Tabellen 4 und 5 (Anhang 1, S. 18).

Coxiella burnetii: Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage zufriedenstellend. Die etwas stärker positive Probe # 1825423 (mit ca. 1×10^5 Genomkopien *C. burnetii*/mL) wurde von 33 der insgesamt 36 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen detektiert. Die zweite positive Probe # 1825421 des Probesets (ca. 1×10^3 Genomkopien/mL von *C. burnetii*) wurde ebenfalls von 33 Laboren korrekt berichtet, auch hier sind drei falsch-negative Ergebnisse zu registrieren. Dies sollte in den betroffenen Laboren zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems zu hinterfragen und die Prozesse der Probenaufarbeitung ggfs. zu optimieren.

Die beiden Proben ohne Zielorganismus (# 1825422 und # 1825424) wurden von jeweils 3 bzw. 2 Teilnehmern fälschlicherweise als ‚positiv‘ klassifiziert, im Vergleich zu vorausgehenden Ringversuchsrunden bedeutet das einen Anstieg der falsch-positiven Ergebnisse. 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.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Sacace Biotechnologies *C. burnetii* Real-TM (1x), Progenie RealCycler *Coxiella burnetii* (1x), Mikrogen alphaCube Q-Fiebers (1x) und ThermoFisher VetMAXCox (1x).

Bacillus anthracis: Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis* DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Alle 19 Teilnehmer konnten die stärker positive Probe # 1825422 richtig klassifizieren. Die etwas schwächer positive Probe # 1825421 wurde ebenfalls von allen Laboren richtig bewertet. Im Gegensatz zu vorausgehenden Ringversuchsrunden wurden erfreulicherweise in der aktuellen Aussendung keine falsch-positiven Ergebnisse für die ‚negativen‘ Proben (# 1825423 und # 1825424) berichtet. Im Hinblick auf die Konsequenzen solcher Ergebnisse für die Therapie und das Management von Patienten (und die Auswirkungen auf das Umfeld!), ist dies sicherlich lobenswert.

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

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Altona diagnostics RealStar Anthrax PCR Kit (3x) und Mikrogen alphaCube Q-Fiebers (1x).

RV 543: Francisella tularensis & Brucella spp.

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

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 19) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben für *F. tularensis*: Probe # 1825431 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1825432 mit ca. $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL an *F. tularensis* spp. *novicida*; zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Brucella melitensis* DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in Probe # 1825434 und $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in Probe # 1825432), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1825433), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Francisella tularensis: Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier alle der 21 Teilnehmer die relativ stark positive Probe # 1825431 (*F. tularensis* spp. *tularensis*, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) korrekt bewertet. Für die Probe mit fünffach niedrigerer Erregermenge # 1825432 (*F. tularensis* spp. *novicida*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) erreichten uns neben 16 richtig ‚positiven‘ Ergebnissen auch 4 falsch-negative sowie eine fragliche Klassifizierung. Die betroffenen Teilnehmer sollten dies zum Anlass nehmen, die Sensitivität der verwendeten Testsysteme sowie ggfs. die Prozesse der Probenaufarbeitung zu evaluieren. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *F. tularensis*-DNA der Teilnehmer enthielten alle eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Brucella spp: 16 bzw. 19 der 19 teilnehmenden Labore berichteten für die ‚positiven‘ Proben # 1825432 und # 1825434 korrekte Ergebnisse. Leider traten für die beiden Proben ohne Zielorganismen (#1825431 und # 1825433) insgesamt zwei falsch- positive Nachweise auf. Falsch-negative, -positive oder fragliche Ergebnisse sollten zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und die laborinternen Prozesse der Probenaufarbeitung zu überprüfen. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Applied Biosystems Brucella spp Kit (1x).

Da in der aktuellen Ringversuchsrunde die falsch negativen Ergebnisse bei der Probe mit der geringer Erregerkonzentration sowohl für *F. tularensis* als auch für *Brucella* sp. von den gleichen Laboren gemeldet wurden, sollte bei diesen wohl gezielt die Aufarbeitung der DNA aus dem Probenmaterial einer kritischen Überprüfung und ggf. Verbesserung unterzogen werden.

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 Spektrum der derzeit häufigsten Carbapenemase-Gene bei *Enterobacteriaceae* beschränken: KPC, VIM, OXA-48 ähnliche Gene, GES-Carbapenemasen, NDM, IMP und GIM. Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 21) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe

1825441 enthielt *Escherichia coli* Zielorganismen mit dem OXA-244 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL), Probe # 1825442 enthielt *Klebsiella pneumoniae* Zielorganismen mit den Genen für NDM-1 und OXA-48 (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL) und Probe # 1825444 enthielt *Citrobacter freundii*-complex Zielorganismen mit dem GES-5 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL). Die dritte Probe # 1825443 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

86 der 88 Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in der Probe # 1825441 fest. Für die Probe mit NDM-1 und OXA-48 positiver *Klebsiella pneumoniae* (# 1825442) wurden mit drei Ausnahmen korrekte Ergebnisse berichtet. Hoch lag die Richtigkeitsquote auch für die Probe # 1815443, hier berichteten 86 Teilnehmer die Probe als korrekt als „Carbapenemase-negativ“. Schwächen zeigten sich bei der Detektion der GES-5-positiven *Citrobacter freundii* in Probe # 1825444, die 76 Teilnehmern ‚durchrutschte‘. Grund hierfür ist möglicherweise, dass das GES-5 Gen gerade in vielen ‚Multiplex‘ Testformaten nicht enthalten ist.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Direktnachweis von Carbapenemase-Genen Teilnehmer enthielten durchwegs eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Seegene Allplex Entero-DR Assay (3x), Amplex eazyplex SuperBug complete A (1x) und Autoimmun Diagnostika RDB 2290 Carbapenemase (1x).

RV 545: Clostridium difficile

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Clostridium difficile*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an Clostridium difficile-DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 23) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1825451 mit einer hohen Menge an *Clostridium difficile* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1825454 mit ca. zehnfach geringerer Menge ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1825452 und # 1825453), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden „positiven“ *Clostridium difficile* Proben # 1825451 und # 1825454 wurden erfreulicherweise mit lediglich einer Ausnahme von den teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ klassifiziert. Die vereinzelt berichteten ‚fraglichen‘ oder ‚positiven‘ Ergebnisse

für die Proben ohne Zielorganismen (# 1825452 und # 1825453) sollten 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.

Wie in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 23) angegeben, verwendete der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Meridian Bioscience illumigene *C. difficile* (6x), r-Biopharm RIDAGENE CD Toxin A/B (6x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (3x), Altona diagnostic RealStar *C. difficile* PCR Kit (5x), TIB Molbiol Modular Dx Kit (3x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (2x), HAIN Lifescience GenoType CDiff (3x), HAIN Lifescience FluoroType CDiff (2x), Seegene Allplex GI Panel 2 (1x), fast-track Diagnostics *C. difficile* (1x), Amplex eazyplex *C. difficile* complete Assay (1x), Abacus Diagnostica GenomEra *C. difficile* (1x), QUIDEL AmpliVue *C. difficile* Assay (1x) und QUIDEL Solana *C. difficile* Assay (1x).

Aktuelle Anmerkung des Ringversuchsleiters: Anfang kommenden Jahres planen die Kolleginnen und Kollegen des dreigeteilten NRZ *C. difficile* (UK Münster, UK Homburg und KH Coesfeld) eine kleine Umfrage zu der aktuell routinemäßig verwendeten diagnostischen Methodik. Um ihn bei diesem Vorhaben bestmöglich zu unterstützen, würden wir ihnen gerne zu gegebener Zeit den Link zu seinem Fragebogen zukommen lassen. Bitte geben Sie Herrn Prof. Dr. Alexander Mellmann (Alexander.Mellmann@ukmuenster.de) doch kurz Bescheid falls sie an dieser Umfrage interessiert sind. In diesem Zusammenhang bereits im voraus herzlichen Dank für ihre Unterstützung. Nach Abschluß dieser interessanten Erhebung läßt sich die Auswertung dann sicherlich in einer der kommenden *C. difficile* Ringversuchsauswertungen in Kurzform präsentieren.

RV 546: VRE

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

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 24) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1825461 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecalis* van A resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1825463 mit ca. gleiche Menge (*Enterococcus faecium* van B resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1825464 mit ca.

$\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL an *Enterococcus faecalis*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1825462), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden positiven Proben # 1825461 und # 1825463 (je ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) mit vanA bzw. vanB tragenden Enterokokken mit lediglich einer Ausnahme von allen Teilnehmern als „VRE-positiv“ klassifiziert. Besonders erfreulich ist, dass (ebenfalls mit nur einer Ausnahme) alle eingereichten Ergebnisse der vanA/vanB Differenzierungen korrekt waren. Auch unter den von den insgesamt 55 Teilnehmern mitgeteilten Ergebnissen für die beiden VRE negativen Proben # 1825462 (*E. coli*) und # 1825464 (*E. faecalis*) befand sich nur ein einziger falsch-positiver Befund.

Bei solchen Ergebniskonstellationen würde man bei den falsch-positiven Befunden eigentlich sporadische Kontaminationsereignisse oder (Kreuz-)Kontaminationen vermuten. Da im aktuellen Fall aber beide falschen Ergebnisse von dem selben Teilnehmer stammen, liegt eine Probenverwechslung nahe (Probe „2“ als positiv und gleichzeitig Probe „3“ als negativ für VRE befundet). Leider können wir solche augenscheinlichen Verwechslungsereignisse bei der Erteilung der Zertifikate nicht berücksichtigen oder mitgeteilte Ergebnisse seitens der Ringversuchsleitung nachträglich wohlwollend ausbessern.

Gerade der Nachweis von VRE verkompliziert das Management und ggfs. eine erforderliche antibiotische Therapie erheblich, sodass „Laborenten“ unbedingt vermieden werden müssen. Bei den eingesetzten Testsystemen hielten sich kommerziell erhältliche, vorkonfektionierte Systeme und Eigenentwicklungen in etwa die Waage. Bezüglich analytischer Sensitivität und Spezifität waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen, wenngleich einschränkend angemerkt werden muss, dass für eine verlässlichere Beurteilung weitere Ringversuchsrunden abgewartet werden sollten. Insgesamt war die Ergebnislage dieser ersten Probenaussendung jedoch sehr erfreulich.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: BioGX auf BD Max (1x), Amplex eazyplex VRE (1x), AusDiagnostics Kit (1x), AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz differenz. von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x) und Seegene Allplex Entero-DR Assay (1x).

RV 547: Urogenital panel

Nach intensiven Vorarbeiten zum Proben-Design und zur praktischen Umsetzung wird der aktuell als sogenannter „Pilot“ organisierte Ringversuch RV 547 „Urogenital-Panel“ in der aktuellen Ringversuchsrunde zum zweiten Mal durchgeführt und die Ergebniskonstellation hier diskutiert. Nicht zuletzt durch das überaus heterogene Spektrum an eingesetzten Multiparameter- bzw. Multiplex-Testsystemen wird die strukturierte Auswertung der auf den Report-Formularen mitgeteilten Ergebnisse erschwert.

Daher haben wir die Tabelle 2 (Anhang 1, S. 25) etwas modifiziert. Dort ist der Übersicht halber nun die Anzahl an positiven und negativen Ergebnissen für die in den jeweiligen Proben anwesende Pathogene aufgeführt. Mit dieser Lösung sollte man eine einigermaßen informative Darstellung über das erfasste Erregerspektrum und über die Leistungsdaten einzelner Testsysteme erhalten. Im Großen und Ganzen haben die 19 aktuell registrierten Teilnehmer die Erreger in den 34 Einzelproben entsprechend den methodischen Möglichkeiten ihrer Testsysteme zufriedenstellend nachweisen können. Dies bestätigt zum einen für die Praktikabilität unseres innovativen Multiplex-Ringversuchskonzepts und zum anderen für die zuverlässige Erfassung der Zielorganismen innerhalb der jeweils testspezifisch abgedeckten Erregerspektren der eingesetzten kommerziellen oder eigenentwickelten PCR/NAT Verfahren.

Mit der aktuellen Aussendung des RV 547 haben wir erstmals ein einfaches Schema in Form einer 7-stelligen Zahlenkombination eingeführt, über das die einzelnen Teilnehmer das erfasste Erregerspektrum ihrer individuellen Testsysteme und Multiplex-Assays auf dem Report-Formular vorab mitteilen können. Für die Erteilung von Zertifikaten macht es nachvollziehbarerweise nur Sinn diejenigen Parameter aus dem gesamten Panel zu bewerten und zu testen, die von den Teilnehmern im Rahmen ihrer diagnostischen Möglichkeiten und der individuellen PCR/NAT Workflows prinzipiell auch als positiv bzw. negativ erfasst werden können. Nachdem uns beim aktuellen Ringversuch (erfreulicherweise) von nahezu allen Teilnehmern deren entsprechender 7-stellige Binärcode auf dem Report Formular mitgeteilt wurde, können nun die Zertifikate individualisiert ausgestellt werden. Ich hoffe diese etwas kompliziertere aber dafür „gerechte“ Vorgehensweise trifft auch bei zukünftigen Ringversuchsrunden auf breite Akzeptanz.

Der Ringversuchsleiter ist natürlich stets für weitere konstruktive Kommentare und Vorschläge aus dem Teilnehmerkreis dankbar. Trotz des relativ vielfältigen Spektrums an unterschiedlichen Testsystemen und -konzepten werden wir uns nach Kräften bemühen, die unterschiedlichen Multiparameter- bzw. Multiplex-Testsysteme der Teilnehmer auch bei den zukünftigen Ringversuchsrunden (also nach der hiermit abgeschlossenen Pilotphase) mit interessanten Probenkonstellationen versorgen zu können.

Unter Code [20] „Multiplex Kit“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: fast-track Diagnostics FTD Urethritis plus (5x), fast-track Diagnostics STD9 (1x), Seegene Allplex STI Essential Assay (3x), Seegene Allplex STI/BV Panel Assays (2x), Seegene Allplex Genital ulcer Assay (1x), Seegene Anyplex STI-7 Detection (1x), Seegene Anyplex II STI-5 Detection (1x), Autoimmun Diagnostika STI (1x) und BioGX *Mycoplasma/Ureaplasma* (1x).

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: r-Biopharm RIDAGENE STI Mycoplasma panel (5x), r-Biopharm

RIDAGENE *T. vaginalis* RT PCR Kit (2x), TIB Molbiol Kits (2x), Amplex eazyplex STD complete (1x), BIORON RealLine single und multiplex Kits (1x), AmpliGnost Kits von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x) und Sacace Biotechnologies Kits (1x).

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Dieser im Jahr 2013 in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch RV 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis** von *Pneumocystis jirovecii*-DNA in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set zwei positive Proben (siehe Tabelle 1, Anhang 1, S. 26): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1825602; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^5 Organismen/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 1825604; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^4 Organismen/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1825601 und # 1825603) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Die beiden negativen Proben # 1825601 und # 1825603 wurden erfreulicherweise mit einer Ausnahme von allen Teilnehmern korrekt klassifiziert. Im Vergleich zu den vorausgegangenen Ringversuchsrunden hat sich die Rate an falsch-positiven Ergebnissen somit reduziert. Bei den positiven Proben wurde Probe # 1825602 mit $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL diesmal von allen der insgesamt 104 Teilnehmer richtig klassifiziert. Etwas schlechter war die Ergebnislage für die ca. zehnfach schwächere positive Probe # 1825604 (ca. 1×10^4 Organismen/mL). Immerhin 99 teilnehmende Laboratorien berichteten hier ein korrektes, positives Ergebnis, daneben wurden 4 falsch-negative Resultate auf den Ergebnisbögen protokolliert. Angesichts der mit mehr als 10^4 Organismen/mL nicht gerade als "äußerst gering" zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten diese falsch-negative Ergebnisse den betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben. Inhibitionskontrollen wurden von allen 104 Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse waren diesmal nicht zu beobachten.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (7x), Fast-track Diagnostics *P. jirovecii* PCR Kit (6x), Biologig Atypical Pneumonia-1 Assay (2x) und BioGX *P. jirovecii* (1x).

Anhänge

Verfügbar unter

<https://www.egms.de/de/journals/lab/2019-10/lab000033.shtml>

1. Anhang1_lab000033.pdf (366 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ November 2018

Literatur

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologe*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11
3. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51.
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
5. Witte W, Bräulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with 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, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2018 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2019;10:Doc02. DOI: 10.3205/lab000033, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000332

Artikel online frei zugänglich unter

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2019-10/lab000033.shtml>

Veröffentlicht: 07.10.2019

Copyright

©2019 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 2018 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 schemes (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>). Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least a brief discussion of the results and some key issues in English and keep the tables in a bilingual style.

Udo Reischl¹
Martin Ehenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Michael Baier³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
Holger Scholz⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Roger Dumke⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Agnes Anders⁸

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

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

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

4 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

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

6 Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Technical University 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 2018

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

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

The current set of QC samples contained three samples with different amounts of *C. trachomatis* (~ 5×10^5 IFU/mL in sample # 1825303, ~ 1×10^5 IFU/mL in sample # 1825304 and 5×10^4 IFU/mL in sample # 1825301) and two samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms: ~ 5×10^5 CFU/mL in sample # 1825304 and ~ 5×10^2 CFU/mL in sample # 1825303. Sample # 1825302 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

Despite the relatively low amounts of *C. trachomatis* target organisms in the positive sample # 1825301, all of the 250 participants reported correct positive CT results. For the two samples with a two- or tenfold higher amount of *C. trachomatis* (#1825304 and 1825303), only one false-negative results for each sample was observed in the current distribution. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by only 1 of the 250 participants for sample # 1825304, and by 10 participants for sample # 1825303 which contained a relatively low number of *N. gonorrhoeae* target organisms (5×10^2 CFU/mL) next to a high amount of *C. trachomatis* (1×10^5 IU/mL). Also 7 false-positive results for the GO-negative samples # 1825301 and # 1825302 were reported by the participants. Think that we are all aware of the fact that contamination issues are a perman-

ent threat within the workup or the workflow of highly-sensitive PCR/NAT procedures. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, contamination events of the GO-negative samples "1" and "2" by target organism or PCR products of the positive samples "3" and/or the very high positive sample "4" is not really likely 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. With a target organism load around 5×10^2 CFU/mL of *N. gonorrhoeae* the lower limit of detection of appropriate test systems is obviously reached and so the results for the GO-positive sample # 1825303 were not considered in the course of issuing the certificates. Inhibition controls were included or at least indicated 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 250 participants.

Tables 4 to 7 (Attachment 1, p. 2–4) 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: # 1825313 with ~ 5×10^5 IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, # 1825314 with ~ 1×10^5 IFU/mL and # 1825311 with ~ 5×10^4 IFU/mL. Sample # 1825312 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in table 2 (Attachment 1, p. 5), the reported results were generally correct for the three positive samples.

One false-negative result was reported for the *C. trachomatis*-positive sample # 1825314 and for the *C. trachomatis*-negative sample # 1825312, containing only non-infectious human cells and *E. coli*, one false-positive result was observed among the 70 participants. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the

current set, a contamination event of the “negative” sample “2” by target organism or PCR product carry-over from the positive sample “1” might have occurred within the sample prep and amplification workflow of these laboratories. So false positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system.

This pleasant match of the current results with observations and accuracy rates in the last years can be considered as an evidence for a high reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing. Run controls were performed by all of the 70 participants and inhibition events were not observed this time. In this context, it should be noted, that we have not added putative inhibitory substances into the samples of the current distribution.

Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity were observed for the *C. trachomatis*-specific NAT assays used by the 70 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1825322; 5×10^4 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella parapertussis* (# 1825323; 1×10^5 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella holmesii* (# 1825324 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL; IS481-positive strain!), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1825321).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only two of the 146 participants reported false-negative results for the sample # 1825322 (*B. pertussis*, 5×10^4 CFU/mL) and one participant has classified his result as “questionable”. By the way, an amount of 5×10^4 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms is significantly above the previously observed lower limit of detection for the corresponding PCR assays or test systems. Sample # 1825321 which contained only *E. coli*, were classified as false-positive by 2 of the participating laboratories. These sporadically observed false-positive results are most likely due to contamination events in the course of sample preparation or the PCR/NAT amplification and detection workflow.

The *B. parapertussis* sample was tested false-positive by 4 participants whereas the *B. holmesii* sample was tested false-positive by 52 of the 146 participants. Since it is well known that *B. holmesii* strains may contain copies of the most popular *B. pertussis*-target gene IS 481, the high rate of false-positives is not really surprising for the latter sample. Considering that the detection rate of the *B. pertussis* sample # 1825322 was very high (indicating a good performance of the *B. pertussis*-specific PCR/NAT assays), and IS481 is still one of the most practical and sensitive target genes, we have not scored those (false)

positive results for the *B. holmesii* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. For colleagues who are interested in the IS481 topic, there is an informative paper [2].

However, for participants who have observed false-positive *B. pertussis* results with *Bordetella parapertussis* in sample # 1825323, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity of their assay concepts. However, it is good to see that most of the remaining results reported by the 146 participants were correct. Run controls were performed by 144 participants and inhibition events were not observed among the samples of the current distribution.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained three samples with a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain in a kind of dilution series. Sample # 1825333 contained approximately 1×10^6 CFU/mL, sample # 1825331 approximately 1×10^5 CFU/mL and sample # 1825332 approximately 1×10^4 CFU/mL of the respective target organisms.

The availability of well evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in two of three positive samples (#1825333: $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL and # 1825331: $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) led to consistently correct results (positive predictive values of 100%) in the current distribution. Only one false-negative result was observed for the weaker positive sample #1825332 by one of the 47 participants.

As noted in the test 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 were communicated by 45 of the 47 participants and the results for molecular susceptibility testing were also correct (wild-type), apart from one report of a mutation in one of the *H. pylori* strains.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed previously, the challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenic factors (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin).

The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1825341 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-, *eae*-, *hlyA*- and O157-positive) and # 1825342 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- and O157-positive). The other two EHEC-negative samples contained an ETEC strain (sample

1825344; 1×10^4 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1825343).

All of the 134 participants correctly reported EHEC-negative results for sample # 1825343, containing only *E. coli* K12. The other “EHEC-negative” sample (# 1825344), containing a significant amount of an LT- and ST-positive ETEC isolate was also reported PCR-negative by all but one of the participants. For the EHEC/STEC positive samples # 1825341 and 1825342, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in consistently high accuracy rates. Sample # 1825341 was correctly reported positive by 134 of the 135 participants and all of the participants detected the target organisms in the EHEC/STEC-positive sample # 1825343 correctly. Since the amount of target organisms in the EHEC-positive sample # 1825341 could not be considered as “extremely low”, false negative results should encourage the participants to review and optimize the workflow and concept of their individual EHEC/STEC-specific PCR/NAT assays.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 104 of the 134 participating laboratories. With one exception, the reported results were correct. None of the participants observed significant inhibition of the NAT-reaction.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Due to numerous requests, here a short note for our participants outside Europe: as this proficiency testing panel is designed for a specific and sensitive detection of *B. burgdorferi* sensu lato DNA, the positive samples **do not necessarily** contain suspensions of “prototype” isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto and in many of the bi-annual rounds of our external quality assessment (EQAS) scheme also other ***B. burgdorferi* genotypes or genospecies will be present** in individual samples. Short recapitulation: So far more than 21 different species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato complex were described, that naturally present genetic differences in commonly used target genes. Of special interest – since of proven human pathogenicity and widely distributed in Europe – are *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. bavariensis*. *B. spielmanii*, a further species with proven pathogenicity for humans, seems to be rare and was so far only recovered from skin manifestations of Lyme borreliosis. *B. bissettiae* and *B. lusitanae* are considered as potential human pathogens while for *B. valaisiana* evidence for human pathogenicity is missing. Regarding *OspA*, especially *B. garinii* shows a striking

heterogeneity with at least 5 genetic distinguishable “genotypes” in Europe.

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *B. bavariensis* organisms in our proprietary matrix: sample # 1825354 (5×10^5 CFU/ml), sample # 1825351 (5×10^4 CFU/ml) and sample # 1825353 (5×10^3 CFU/ml). Sample # 1825352 contained no *Borrelia* organisms but a strain of *Treponema phagedenis*.

With the exception of 3 false-negative results for sample # 1825353 (containing the lowest amount of the *B. bavariensis* target organism), one false-negative result for sample # 1825351 and only one false-negative results for sample # 1825354 (containing the highest amount of the target organism) all of the remaining participants reported correctly results for the *B. bavariensis*-containing samples. The couple of false-negative results should prompt re-evaluation of the assay sensitivity. The “negative” sample # 1825352 was classified false-positive by only one laboratory. Potentially, this may be due to a contamination event from the positive sample # 1825351 during sample preparation or PCR/NAT analysis. Therefore, the workflow should be optimized to minimize clinically misleading false-positive results.

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

RV 536: *Legionella pneumophila*

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

The current set of QC samples contained two positive ones with *Legionella pneumophila* serogroup 2: sample # 1825361 (5×10^5 CFU/ml) and sample # 1825364 (5×10^3 CFU/ml). Samples # 1825362 and # 1825363 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive sample # 1825361 ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) was correctly tested positive by all of the 120 participating laboratories. For the second positive sample within the current distribution, # 1825364 which contained a significantly lower amount of *L. pneumo-*

phila-target organisms ($\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), only 85 of the 120 participants reported a correctly positive result. With a target organism load of around 5×10^3 CFU/mL of *L. pneumophila*, the lower limit of detection of appropriate test systems is obviously reached and so the results for the latter sample were not considered in the course of issuing the certificates.

Samples # 1825362 and # 1825363 which contained only *E. coli*, were classified as false-positive by 2 and 1 of the participating laboratories, respectively. These sporadically observed false-positive results are probably due to contamination events in the course of sample preparation or the PCR/NAT amplification and detection workflow. All but one of the participants have included inhibition controls in their test systems and no significant inhibitions of the PCR/NAT-reactions were observed or reported this time.

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 # 1825372 (*Salmonella enterica* serovar Enteritidis, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ mL) and a similar amount was present in sample # 1825374 (*Salmonella enterica* serovar Typhi, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ mL). Sample # 1825371 contained an EHEC strain (clinical isolate, 1×10^5 CFU/mL). No target organisms but only *E. coli* cells were present in sample # 1825373.

Only one false-negative result was reported for the positive sample # 1825374, which contained a significant number of *Salmonella enterica* serovar typhi target organisms. One false-positive result was reported for the *Salmonella* negative sample # 1825371, which contained an EHEC strain. One false-positive result was reported for the *Salmonella* negative sample # 1825373, which contained only the matrix and a significant number of *E. coli* K12 cells. For the remaining sample, only correct positive PCR/NAT results were reported among all of the 25 participating laboratories.

This indicates again a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays and improved procedures with respect to the effective 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 two samples without the corresponding target organisms (# 1825381 and # 1825383; only *E. coli* cells), and two samples positive for *L. monocytogenes* (# 1825382, and # 1825384). The *Listeria monocytogenes*-containing sample # 1825382 with 5×10^4 CFU/mL of *L. monocytogenes* was correctly reported positive by all of the 40 participants.

The *Listeria monocytogenes* weak-positive sample # 1825384, containing about 1×10^3 CFU/mL of *L. monocytogenes*, was tested positive by only 35 of the 40 participating laboratories.

In addition, the two *L. monocytogenes* negative samples of the current distribution (samples # 1825381 and # 1825383) were reported correctly negative by all of our participants. Most of them have obviously used very sensitive *Listeria monocytogenes*-specific PCR/NAT assays, which is reflected by the high portion of correctly positive results for sample # 1825384, containing only 1×10^3 CFU/mL of *L. monocytogenes*. It should be noted that participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT-assays may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. In this case, (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species do not negatively affect issuing the corresponding QC certificates. In sum, the current results indicate a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA DNA in typical clinical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs, so the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a background of human cells and other components. It is therefore important to note that NAT assays designed mainly for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set. Except of one sample containing an MSSA isolate together with almost equal amounts of a methicillin-resistant *mecA*-positive coagulase negative *Staphylococcus* species, no "difficult" or "interesting" *Staphylococcal* strains were included into the current panel.

Sample # 1825391 of the current distribution 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).

Sample # 1825392 contained a MRSA isolate (MRSA, PVL-negative; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 292 participating laboratories.

Sample # 1825394 contained a MRSA isolate (MRSA, PVL-negative; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 283 participating laboratories. One sample of the current set (# 1825393) contained no MRSA target organisms but only a clinical isolate of an oxacillin-sensible CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-negative, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL).

The MRSA negative sample # 1825393 was tested correctly negative by 280 of 294 participants with their PCR-based MRSA-specific test systems, so only 11 participants

reported a false positive result for sample # 1825393, which may have probably been caused by contamination with MRSA DNA during the sample preparation, amplification or detection. Fortunately, for the relatively strong positive MRSA sample # 1825392, positive results were reported by almost all participants. Even when sample # 1825394 contained a slightly lower amount of MRSA target organisms (1×10^4 CFU/mL), correct positive results were still reported by 283 participants, leading to positive predictive values of above 96%. The 11 false negative results are probably due to an insufficient analytical specificity of the used *in-house* (or LDT-) PCR/NAT test systems or problems during the sample workup or experimental workflow of commercial PCR/NAT test systems. Considering the assay-specific percentage of true positive and true negative results given in table 3 (Attachment 1, p. 14), no serious problems can be seen for individual commercial assay concepts. So any “problems” are obviously due to the technical or manual workflow of individual operators.

For the sample # 1825391, which contained a MSSA isolate together with a Methicillin resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species, 272 of 294 participants reported their results correctly as “MRSA-negative” and 7 participants classified the results as “questionable”. Five of these 7 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 this separate detection assays, the origin of the *mecA* target gene cannot 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 or multiplex 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 15 participants reported false-positive results for MRSA for sample # 1825391, containing a mixture of a MSSA isolate and a methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococcus* species. These participants are encouraged to analyse the appropriateness of PCR/NAT their 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 swabs. On the other hand, almost all participants, who used SCC*mec* based test concepts, reported correct MRSA-negative results for sample # 1825391.

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. Moreover, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor **PVL (Panton-Valentine Leukocidin)** or its coding gene *lukF/S-PV* is possible in this EQAS scheme. Corresponding results were reported by 55 of the total 294 participating laboratories

and within the current distribution the (negative) results for molecular PVL testing were correct in all but one case. Additional information can be found at Linde et al. [4] or Witte et al. [5]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at Reischl et al. [6]. In addition, 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 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 materials. 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 # 1825401 was spiked with $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL of *C. pneumoniae* whereas sample # 1825403 contained an approximately tenfold lower number of *C. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL). Sample # 1825402 contained significant numbers ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL) of *Mycoplasma pneumoniae* organisms to assess analytical specificity. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1825404.

As depicted in table 2 (Attachment 1, p. 15), all but one of the 120 participants reported correct results for the strong positive sample # 1825401, 117 of the 120 participants reported correctly positive results for the slightly weaker positive sample # 1825403, which still contained a relatively high concentration of *C. pneumoniae* target organisms (5×10^4 IFU/mL). Participants who missed to detect *C. pneumoniae* DNA in these two samples are encouraged to analyse and optimize their NAT-based assays. Three participants reported false-positive results for the negative sample # 1825404 (only *E. coli* and non-infected human cells), which could probably be due to cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps.

Moreover, it is good to see that no false-positive results were reported for the *C. pneumoniae* negative sample # 1825402 (*Mycoplasma pneumoniae*). Overall there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

The current set of QC samples contained only one positive sample with a relatively high amount of *M. pneumoniae* (# 1825412; $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL). Sample # 1825413 was designed to monitor assay specificity: it contained a considerable amount of *M. hominis* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) as a related species to the target organism. The set was completed by samples # 1825411 and # 1825414, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. Similar to the result constellations observed with past distributions of our external quality assessment schemes for *M. pneumoniae* PCR/NAT detection, the availability of well-established commercial or in-house PCR/NAT-assays has led to a high percentage of correct results. The *M. pneumoniae* containing sample (#1825412) was correctly reported by 134 of the 138 participants, respectively. The *E. coli*-containing samples (# 1825411 and # 1825414) were correctly reported by 136 and 135 participants, respectively. Sample # 1825413 contained *M. hominis* ($\sim 10^5$ genome copies/mL), and was erroneously reported positive by four laboratories. This may indicate lacking species-specificity of the test systems and trigger further investigations.

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

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

The current set of QC samples (table 1, Attachment 1, p. 17) contained two samples with different amounts of

C. burnetii DNA ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL in sample # 1825421 and $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 1825423) and two samples with different amounts of *B. anthracis* strain UR-1 DNA ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1825421 and $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 1825422). Sample # 1825424 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. 17) for the *C. burnetii*-specific results and tables 4 and 5 (Attachment 1, p. 18) for the *B. anthracis*-specific results.

***Coxiella burnetii*:** With the exception of three laboratories, all participants correctly reported 'positive' results for the *C. burnetii*-containing samples # 1825421 (1×10^3 genome copies/mL) and # 1825423 (1×10^5 genome copies/mL). The two "negative" samples (# 1825422 contained only *B. anthracis* and # 1825424 contained only *E. coli*) were correctly reported as negative by 33 and 34 of the 36 participants, respectively. These false negative and positive results should be noticed by the affected participants to control preparation and handling protocols and the applied detection configuration.

***Bacillus anthracis*:** All participants correctly reported negative results for the samples # 1825423 and # 1825424 which did not contain the target organism. The "positive" sample # 1825421 containing $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL *B. anthracis* strain "UR-1" was correctly reported by all 19 participants. The second positive sample # 1825422 ($\sim 1 \times 10^5$ 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* & *Brucella* spp.

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 and *Brucella* spp. 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 (table 1, Attachment 1, p. 19) contained two positive samples: $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *tularensis* was present in sample # 1825431 and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *Francisella*

tularensis spp. *novicida* was present in sample # 1825432, two samples with different amounts of *Brucella melitensis* DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 1825434 and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 1825432). Sample # 1825433 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Francisella tularensis: Similar to QC samples from past distributions, the positive samples # 1825431 ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *tularensis*) and # 1825432 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *novicida*) were correctly tested positive by 21 and 16 of the 21 participating laboratories, respectively. All laboratories reported correct results for the 'negative' samples # 1825433 and # 1825434.

Brucella spp.: The positive samples # 1825432 and # 1825434 were correctly reported by 16 and 19 laboratories, respectively. In both samples without target organism (# 1825432 and # 1825433), a total of 2 'false-positive' results were reported. None of the participants observed an inhibition of the nucleic acid amplification. Since the two samples with low amounts of *F. tularensis* as well as *Brucella* spp. DNA were missed by the same two laboratories, a targeted inspection and improvement of the individual DNA preparation procedures is strongly recommended.

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 table 1 (Attachment 1, p. 21), the current set contained four samples with different carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1825441 contained a *Escherichia coli* with a OXA-244 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), sample # 1825442 contained an *Klebsiella pneumoniae* isolate with two carbapenemase genes: NDM-1 and OXA-48 ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL) and sample # 1825444 contained a *Citrobacter freundii*-complex isolate with a GES-5 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL). The fourth sample # 1825443 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes. 86 of the 88 participating laboratories reported sample # 1825441 (*E. coli* carrying a OXA-244 carbapenemase) as "carbapenemase positive". Notably, all but 3 participants were able to detect carbapenemase genes in sample # 1825442 (*K. pneumoniae* carrying NDM-1 and OXA-48). The third "positive" sample # 1815444 (containing *C. freundii* with a GES-5 gene) was not correctly

reported by 76 of the 88 participants. Apparently, most test systems used were not able to detect GES-5. The *E. coli*-containing sample # 1825443 was correctly identified as 'carbapenemase-negative' by 86 laboratories.

RV 545: Clostridium difficile

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of C. difficile DNA in typical sample material**. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. The lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained two *Clostridium difficile* positive samples: sample # 1825451 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL, and sample # 1825454 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL. Samples # 1825452 and # 1825453 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. The "positive" samples # 1825451 and # 1815454 were correctly reported as "positive" by all but one participating laboratory. For the two 'negative' samples # 1825452 and # 1825453, 1 'questionable' and 1 false-positive result were reported, respectively. 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 # 1825461 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecalis* vanA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1825463 contained a similar amount of *Enterococcus faecium* vanB ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1825464 contained *Enterococcus faecalis* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and sample # 1825462 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. Of the 55 participating laboratories, 55 and 54 correctly reported positive results for the samples # 1825461 and 1825463, respectively. Of note, 44 participants reported dedicated vanA/vanB identification for these two samples, of which 43 were correct. We were pleased to see that also for the "negative" samples # 1825462 and # 1825464, all but one participant

reported correct results. A false-positive result in the analysis of these samples should once again prompt evaluation of the test system and/or the workflow in the laboratory. This is especially important when considering the impact of molecular VRE detection on the clinical management of patient. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitoric events were not reported.

RV 547: Urogenital panel

The concept of this novel EQAS-panel for the detection of the most prominent urogenital pathogens was recently established to meet the demands of current and future multiplex PCR/NAT assay concepts. As the current and the forthcoming distribution (November 2018) are classified as “pilot studies”, we are still in the learning phase to optimize the informative and intuitive depiction of the complex result constellations as well as developing a rational scheme for issuing individual certificates for the participants. The results reported by the 34 registered participants are depicted in table 2 (Attachment 1, p. 25) and a good overall correlation between the expected results (table 1, Attachment 1, p. 25) and the reported results was observed.

The current report form (and also the forthcoming ones) of RV 547 distributions contain an extra field for a simple 7-digit code, where participants can specify the theoretical pathogen spectrum of their individual assay concepts. This will help to fairly consider the broad spectrum of different commercial and *in-house* PCR/NAT assays regarding species coverage, differentiation and multiplex capabilities. Hence the resulting certificates will be individually adapted and tailored to the covered species portfolio and/or detection capabilities of the participant's individual assay concept.

RV 560: Pneumocystis jirovecii

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

The latest set of QC samples contained two positive specimens (see table 1, Attachment 1, p. 26). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) was present in sample # 1825602 and an approximately tenfold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL) was present in sample # 1825604. The set was completed by *P. jirovecii*-negative samples # 1825601 and # 1825603, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli*

organisms next to the lyophilization matrix. Sample # 1825602, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) and sample # 1825604 with a twenty-fold lower concentration of *P. jirovecii*, were classified as “positive” by 103 and 99 of the 104 participating laboratories, respectively. Although this could be due to a loss of template DNA during pre-analytical sample preparation procedures or other reasons, observation of false-negative results should encourage the affected laboratories to check the diagnostic workflow, consider improving the sensitivity and/or analysing the species coverage of the individual assay concept. Only one laboratory reported a false-positive result for sample # 1825603, containing only *E. coli*. The second *P. jirovecii*-negative sample # 1825601 was correctly reported “negative” by all of the 104 participants.

The yet limited number of participants in the trials RV 542 to RV 546 and RV 560, together with an incomplete reporting of the assays and manufacturers applied, do not allow a serious evaluation of the quality of either commercial tests or the very heterogeneous *in house* PCR/NAT assays in regard to analytical sensitivity, analytical specificity, susceptibility to contamination, or simply the “overall performance”. In this regard we would like to encourage the participants to supply some details of their *P. jirovecii*-specific PCR/NAT assays or names of commercial kits.

Attachments

Available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2019-10/lab000033.shtml>

1. Anhang1_lab000033.pdf (366 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)”
November 2018

References

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11
3. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51.

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
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

Please cite as

Reischl U, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttlar H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2018 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab. 2019;10:Doc02. DOI: 10.3205/lab000033, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000332

This article is freely available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2019-10/lab000033.shtml>

Published: 2019-10-07

Copyright

©2019 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/>.

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