

# Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2020 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 Webseite 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 Reischl<sup>1</sup>**  
**Martin Ehenschwender<sup>1</sup>**  
**Andreas Hiergeist<sup>1</sup>**  
**Matthias Maaß<sup>2</sup>**  
**Michael Baier<sup>3</sup>**  
**Dimitrios Frangoulidis<sup>4</sup>**  
**Gregor Grass<sup>4</sup>**  
**Heiner von Buttlar<sup>4</sup>**  
**Holger Scholz<sup>4</sup>**  
**Volker Fingerle<sup>5</sup>**  
**Andreas Sing<sup>5</sup>**  
**Roger Dumke<sup>6</sup>**  
**Ingrid Reiter-Owona<sup>7</sup>**  
**Agnes Anders<sup>8</sup>**

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

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

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

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

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

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

Universitätsklinikum Bonn,  
Deutschland

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

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Nach erfolgreicher Etablierung dieser neuen Ringversuchs-Serie wollen wir hier auch für Kolleginnen und Kollegen, die bisher noch nicht an diesen Ringversuchen teilgenommen haben, die Ergebnisse der aktuellen Ringversuche für den PCR/NAT-gestützten Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *EHEC/STEC*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella enterica* und *Listeria spp.*, *MRSA* bzw. *cMRSA*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Brucella spp.*, *Pneumocystis jirovecii* (vormals *P. carinii*), *Clostridium difficile* (Toxingene), *VRE* (Vancomycin-resistente Enterokokken) und der molekularen Resistenztestung für Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae sowie dem im Mai 2019 neu ins Programm aufgenommenen Multiplex-Panel für Erreger von Urogenitalinfektionen darstellen und kurz diskutieren.

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 Webseite 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 wurde beispielsweise im aktuellen **RV 539 MRSA/cMRSA** eine der vier Proben mit einem **MRSA**-Patienten-

isolat versetzt, das zwar PCR-detektionsrelevante Segmente der *SCCmec*-Genkassette enthielt, aber anstatt des bei *MRSA*-Stämmen „üblichen“ *mecA*-Gens das ebenfalls phänotypisch Methicillin-resistenzvermittelnde **mecC-Gen** enthielt. Erfreulicherweise konnte dieses *mecC*-positive *MRSA*-Isolat in der aktuellen Ringversuchsrunde von nahezu 80% aller Teilnehmer mit ihren *MRSA*-spezifischen PCR-Testsystemen erfasst und korrekt als *MRSA* befundet werden. Im Ringversuch November 2015 wurde ein vergleichbares *MRSA*-Isolat mit *mecC*-Gen lediglich von knapp einem Drittel der damaligen Teilnehmer als *MRSA* erkannt. Die methodischen Limitationen aufgrund der Sequenzvielfalt bei resistenzvermittelnden Genen bestätigen jedoch erneut die Sinnhaftigkeit und auch Notwendigkeit des im Rahmen der PCR/NAT-Ringversuchsdiskussionen bereits mehrfach thematisierten begleitenden kulturellen Nachweises von *MRSA*. Interessant war auch die Ergebniskonstellation des **EHEC/STEC-Panels** im aktuellen **RV 534**. Neben zwei „normalen“ O157-Isolaten wurde auch ein weiteres *EHEC*-Isolat mit der etwas selteneren Shiga-Toxin-Genvariante *stx<sub>2f</sub>* ausgesandt und dabei sogar eine sehr respektable Richtigeitsquote von ca. 60% erzielt. Aufgrund der deutlich von den anderen Shiga-Toxin-Genen abweichenden Gensequenz von *stx<sub>2f</sub>* war bei den üblicherweise zum *EHEC*-Nachweis eingesetzten PCR/NAT-Testsystemen ja auch eine gewisse „diagnostische Lücke“ zu erwarten. In jeweils einer der 4 Einzelproben der aktuellen Ringversuche **RV 530: CT/GO**, **RV 533: Helicobacter pylori** und **RV 560: Pneumocystis jirovecii** befanden sich diesmal relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise bereitete der zuverlässige PCR-gestützte Nachweis dem Großteil unserer Teilnehmer (bzw. den von ihnen eingesetzten Testsystemen) keine nennenswerten Probleme.

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 Inhouse-Testsysteme zur molekularen Carbapenemase-Detektion noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase-Genen aufweisen. Im aktuellen Ringversuch scheint dies insbesondere für die **Carbapenemase IMI-2** zu gelten, die zu den Serin-Carbapenemasen gehört und deren Nachweisrate in den letzten Jahren zugenommen

hat. Das Isolat aus dem *Enterobacter cloacae*-Komplex mit IMI-2-Gen wurde aktuell lediglich von 14 der insgesamt 89 Teilnehmer detektiert und als solches befundet. Im Umfeld der molekularen Testung von Carbapenemase-Genen unterstützt uns Frau Dr. Agnes Anders vom NRZ für gramnegative Krankenhauserreger weiterhin bei der Auswahl von relevanten „interessanten“ klinischen Isolaten.

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

Für die externe Qualitätssicherung der zukünftig kommerziell verfügbaren (und damit wohl auch vermehrt eingesetzten) **PCR/NAT-Multiplex-Nachweisverfahren für Urogenital-Infektionen** haben wir seit Mai 2019 einen neuen Ringversuch routinemäßig etabliert, der vom Konzept her jeweils einige der nachfolgenden Erreger in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen innerhalb des 4er-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 19 Teilnehmern beim Pilotringversuch 2018 und 68 Teilnehmern im November 2019 haben sich diesmal bereits 88 Teilnehmer registriert. Wir werden uns nach Kräften bemühen, der deutlich steigenden Nachfrage auch bei den zukünftigen Ringversuchsrunden mit ausreichenden Mengen an geeignetem Probenmaterial nachkommen zu können.

Vorab 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 denselben kommerziellen, vorkonfektionierten und teilweise auch automatisierten und/oder kartuschenartig geschlossenen Testsystemen.

Die meisten dieser Assays sind zudem auch noch CE- und/oder 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 RiLi-BÄK 2019 (Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen), 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 Ringversuchs-

runden (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 Pilzgenomnachweis 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 Mai 2020

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 einer relativ geringen Menge folgender Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Proben # 2015303 und # 2015304), *Helicobacter pylori* (Probe # 2015334), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 2015352), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 2015403), *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 2015414) sowie *Clostridium difficile* (Probe # 2015451).

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 Realtime-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 bzw. -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 Realtime-PCR-Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR-Testsysteme) auch unter der Internetadresse <http://www.udo-reischl.de>, Unterpunkt „Auswertung der Ringversuche“ und natürlich auch über die Webseite 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 enthält jeweils drei Proben

mit *C. trachomatis*-Organismen: Probe # 2015304 mit  $\sim 5 \times 10^4$  IFU/mL, Probe # 2015303 mit  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/mL und Probe # 2015301 mit  $\sim 5 \times 10^3$  IFU/mL. Diesmal waren ebenfalls 3 der 4 Einzelproben mit unterschiedlichen Mengen an Gonokokken versetzt: Probe # 2015301 mit  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL, Probe # 2015304 mit  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL und Probe # 2015303 mit  $\sim 5 \times 10^2$  CFU/mL *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen.

Der Übersichtlichkeit halber stellen wir bei diesem kombinierten Ringversuch (CT/NG) die Ergebniskonstellation **in 5 getrennten Tabellen** dar (Anhang 1, S. 1–3). Damit wird die diagnostische Performance der jeweiligen Testsysteme beim Nachweis von CT und NG aussagekräftiger (Tabelle 2: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei CT, Tabelle 4: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei NG; jeweils gefolgt von den Richtigkeitsquoten nach aufgeführten Testsystemen in den Tabellen 3 und 5).

Auch wenn die etwas schwächer positive Probe # 2015301 des aktuellen Ringversuchs nur mit ca.  $5 \times 10^3$  IFU/mL an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 269 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* diesmal nahezu durchwegs richtig-positive Ergebnisse. Bei den beiden ca. 2- und 10-fach stärker CT-positiven Proben # 2015303 und # 2015304 des aktuellen Probensets wurden ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern richtig-positive Ergebnisse beobachtet. Lediglich zwei Teilnehmer berichteten bei der Probe # 2015303 falsch-negative Ergebnisse und ein Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis für die Probe # 2015301 als „fraglich“. Für die *C. trachomatis*-negative Probe # 2015302 wurden aus dem gesamten Teilnehmerfeld ebenfalls nur 2 falsch-positive Ergebnisse berichtet. Da in der aktuellen Ringversuchsrunde von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den zwei falsch-negativen und den zwei falsch-positiven Ergebnissen vermutlich um ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die drei positiven Proben # 2015301, # 2015303 und # 2015304 (*N. gonorrhoeae*; ca.  $5 \times 10^4$ , ca.  $5 \times 10^2$  und ca.  $1 \times 10^3$  CFU/mL) diesmal von den insgesamt 267 Teilnehmern 29 falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA bei den relativ schwach positiven Proben # 2015303 und # 2015304 sowie 5 falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA bei der deutlich stärker positiven Probe # 2015301 mitgeteilt. Bei der GO-negativen Probe # 2015302 wurden jedoch von 6 der insgesamt 267 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse berichtet. Dieser im Vergleich zu früheren Ringversuchsrunden doch überraschend hohe Anteil an falsch-positiven Ergebnissen deutet auf Kontaminationseignisse oder wie auch immer geartete Template-Nukleinsäure-Verschleppungen bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung hin; vor allem, weil im aktuellen 4er-Set die GO-negativ Probe # 2015302 bei sequenzieller Abarbeitung unmittelbar auf eine der GO-positiven Proben folgte. Den betroffenen Laboratorien sollten diese Ergebnisse Anlass geben, ihren

individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Angesichts der mit  $5 \times 10^2$  CFU/mL bzw.  $1 \times 10^3$  CFU/mL doch relativ geringen Mengen an Zielorganismen wurden die negativen PCR-/NAT-Ergebnisse bei den beiden Proben # 2015303 und # 2015304 bei der Erstellung der Zertifikate diesmal nicht als „falsch-negativ“ gewertet.

In der GO-positiven Probe # 2015301 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlass zur Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsysteme geben.

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

Auch wenn mit ca.  $5 \times 10^2$  CFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial der Probe # 2015303 die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht erreicht oder unterschritten sein sollte, stehen mit den Rückstellproben des Ringversuchs RV 530 vom Mai 2020 den Teilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität wieder geeignete Sets zur Überprüfung und Optimierung ihrer jeweiligen NAT-gestützten Testsysteme zur Verfügung.

Wir glauben, 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 Ringversuchsprobenmaterial für bestimmte Testsysteme bereitstellen können.

Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der Hologic APTIMA COMBO 2 Testkits hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequen-

zen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA, Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden.

Aktuell wurden die *C. trachomatis*-Zielorganismen von allen 9 Teilnehmern mit RNA-basierten Hologic-Testsystemen in den drei CT-positiven Proben erfolgreich nachgewiesen. Auch in der stärker GO-positiven Probe # 2015301 gelang nahezu allen Teilnehmern mit RNA-basierten Hologic-Testsystemen der erfolgreiche Nachweis der *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen. Nur bei den beiden sehr schwach GO-positiven Proben # 2015303 und # 2015304 (in der zusätzlich noch relativ hohe Mengen an *C. trachomatis* enthalten waren) versagte der Nachweis bei Teilnehmern mit RNA-basierten Testsystemen. Da bei der Erteilung der Zertifikate ja bekanntermaßen ein falsches Ergebnis innerhalb der bewerteten Ergebnisse toleriert wird, werden auch diesmal allen 9 Teilnehmern die entsprechenden Zertifikate erteilt.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen der insgesamt 269 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit den GenProbe CT/NG, Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen in den entsprechenden Tabellen 3 und 5 (Anhang 1, S. 2–3) aufgeführten Testsystemen wird erneut eindrucksvoll deutlich, dass mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet werden konnten.

**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 Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: GenProbe CT/NG (3x), BD ProbeTec (4x), Abbott Alinty m (1x), AB Analytica (1x), BIORON (2x), HOLOGIC Panther (2x), Diagenode S-DiaCTNG/S-DiaCT/S-DiaGono (4x), Qiagen artus (3x), GenID STD (1x), EUROIMMUN EUROArray STI (4x), aprimeo Vivalytic STI (1x), VERSANT kPCR CTGC (1x), AID RDB 2111 (1x), AID Urethritis Panel (1x), Goffin Presto CT/NG Assay (1x), MIKROGEN ampliCube STD Panel 1 (6x), Anatolia Gene works (1x), eazyplex STD complete (1x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis*/N. gonor-

rhoeae Real-TM (7x), Immundiagnostik MutaPLEX (1x), AmpliSens C. trachomatis/N. gonorrhoeae-screen-FRT (2x), Fast Track DIAGNOSTICS FTD Urethritis panel (1x) und Stratagene Mx3005p (1x).

Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems soll in diesem Zusammenhang auch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in Gegenwart von relativ hohen Mengen an Zielorganismen (bzw. deren Nukleinsäure) die interne Kontrollreaktion aufgrund der „Konkurrenzsituation“ mit der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz durchaus negativ ausfallen kann, obwohl keine Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt. Bei **kombinierten Testsystemen** (Stichwort: Multiplex-PCR) kann ja bekanntlich auch die Gegenwart des einen Erregers oder Zielorganismus in hoher Menge die Nachweisempfindlichkeit für den gleichzeitigen Nachweis des/der anderen Erreger oder Zielorganismen im Multiplex-Reaktionsansatz negativ beeinflussen. Bei bestimmten suboptimal abgestimmten PCR/NAT-Testsystemen könnte die kombinierte Zusammensetzung der positiven Proben des aktuellen Ringversuchs eine solche Problemkonstellation repräsentieren und in der Konsequenz die etwas schlechteren Richtigkeitsquoten für den Gonokokken-DNA-Nachweis erklären.

## RV 531: Chlamydia trachomatis

Das Probenet des aktuellen Ringversuchs enthielt diesmal eine Probe mit ca.  $5 \times 10^4$  IFU/mL an *C. trachomatis* (# 2015312), eine Probe mit ca.  $1 \times 10^4$  IFU/mL an *C. trachomatis* (# 2015314), eine Probe mit ca.  $5 \times 10^3$  IFU/mL an *C. trachomatis* (# 2015311), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2015313), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt. Wie Tabelle 2 (Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den insgesamt 59 Teilnehmern bei zwei der drei positiven Proben (#2015311 und # 2015312) diesmal durchwegs korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Bei der dritten positiven Probe # 2015314, die im Vergleich zu den anderen beiden positiven Proben vergleichbare Mengen an *C. trachomatis* enthielt, wurden jedoch von zwei der insgesamt 59 Teilnehmer falsch-negative Resultate beobachtet. Bei der *C. trachomatis*-negativen Probe # 2015313 wurden diesmal von 3 der Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse berichtet.

Die markante Übereinstimmung der aktuellen Ergebniskonstellation mit den Beobachtungen und hervorragenden Richtigkeitsquoten vorhergegangener Ringversuche mit ähnlicher Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen kann erneut als Beleg für eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz der eingesetzten Testsysteme sowie der aktuellen Kits und automatisierten Testplattformen zur Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Prozessierung angesehen werden.

Auch wenn mit ca.  $5 \times 10^3$  IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht erreicht oder unterschritten sein sollte, sollten

bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität generell sowohl falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Angesichts der nach wie vor anhaltenden Diskussion um das „Pooling“ von entsprechendem Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

Inhibitionskontrollen wurden von 57 der insgesamt 59 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen 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 Inhouse-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf erfreulich hohem Niveau.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurden unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die folgenden Testkits aufgeführt: Roche COBAS CT (2x), Qiagen artus CT (1x), Abbott RealTime CT (1x), Sacace Biotechnologies C. trachomatis Real-TM (1x), Seegene Allplex STI Essential (1x), EUROIMMUN EUROArray STI (1x), Diagenode S-DiaCT (1x), HOLOGIC Aptima Combo 2 assay CT (1x), GenID STD (1x), Sansure Biotech (1x), AmpliSens C. trachomatis (1x), Meridian Bioscience (1x), Clonit C. trachomatis (1x) und Nuclear Laser Medicine C. trachomatis Real Time (1x).

## RV 532: Bordetella pertussis

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei positive Proben mit einer sehr hohen und einer etwa 10-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 2015323 mit  $10^5$  CFU/mL und # 2015321 mit  $10^5$  CFU/mL an *B. pertussis*), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 2015322 und # 2015324), die lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielten.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA führte auch diesmal wieder zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben. Lediglich von 2 der insgesamt 153 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 2015322 und von 4 Teilnehmern für die negative Probe # 2015324 mitgeteilt. Hierbei handelt es sich offensichtlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Da diese Probe lediglich *E. coli*-Zellen enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des eingesetzten PCR/NAT-Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich.

Überraschenderweise wurden diesmal auch zwei falsch-negative PCR/NAT-Ergebnisse für die doch relativ stark positive Probe # 2015323 ( $10^6$  CFU/mL an *B. pertussis*) mitgeteilt. Wie bereits bei den vorhergegangenen Ringversuchsauswertungen bei solchen Konstellationen erwähnt, sollten diese Ergebnisse den betroffenen Laboratorien Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Inhibitionskontrollen wurden von allen der insgesamt 153 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem 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 Inhouse-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 unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: MIKROGEN ampliCube Respiratory Bacterial Panel 2 (7x), Meridian Bioscience Alethia (4x), Hologic Panther Fusion Bordetella Assay (3x), Bio-Evolution RT PCR kit *B. pert./parapert.* (2x), Altona diagnostics RealStar Anthrax (3x), AmpliSens *B. pert./parapert./bronch* (2x), QUIDEL Solana Bordetella Complete Assay (2x), Ingenetix BactoReal *B. pert./parapert.* (2x), ARGENE Bordetella *r-gene* (2x), Sacace Biotechnologies *B. pert./parapert./bronch. Real-TM* (1x), AID RDB 2200 *B. pertussis* (1x), DiaSorin Liaison MDX (1x), BioFire FILMARRAY (1x), Luminex ARIES Bordetella Assay (1x), AusDiagnostics Respiratory Pathogens B (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), Attomol Bordetella Realtime LT (1x), FOCUS Simplexa Bordetella Direct (1x), BD Max DNA MMK (1x), VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit (1x) und Bio-Speedy Real-Time PCR Detection 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-resistenten *H. pylori* (# 2015332;  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 2015331;  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 2015334,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2015333), die nur humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden *H. pylori*-positiven Proben mit höherer Menge an Zielorganismen

(# 2015331 und # 2015332) sowie die negative Probe # 2015333 von allen der insgesamt 51 Teilnehmer ausnahmslos korrekt befundet.

Lediglich bei der *H. pylori*-positiven Probe # 2015334 mit deutlich geringerer Menge an Zielorganismen zeigten sich 8 falsch-negative und ein als „fraglich“ klassifizierter Befund. Bei einer Menge von  $1 \times 10^3$  CFU/mL an *H. pylori*-Zielorganismen (entspricht ca.  $1 \times 10^2$  CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100  $\mu$ l) nähert man sich offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an.

Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 2015334 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die drei grau schraffierten Felder in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 7) gekennzeichnet.

Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysensysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Für das aktuelle Probenet wurden bei keinem der Teilnehmer, abgesehen von den Sensitivitätsproblemen einiger der verwendeten PCR/NAT-Assays, falsch-positive PCR/NAT-Ergebnisse durch Kreuzreaktionen o.ä. beobachtet. Inhibitionskontrollen wurden von allen 51 Teilnehmern durchgeführt, und von keinem Teilnehmer wurden Inhibitionsergebnisse bei den 4 Einzelproben beobachtet. Sowohl die kommerziellen als auch die eigenentwickelten Testsysteme schnitten im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab. So erreichten die Inhouse-Testsysteme wie auch die kommerziellen Assays bei den bewerteten drei Einzelproben eine Richtigkeitsquote von 100%. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: See-gene Allplex *H. pylori* & ClariR Assay (3x), MOBIDIAG Amplidiag *H. pylori* + ClariR (2x), TIB Molbiol LightMix Helicobacter 23S Kit (3x), Sacace Biotechnologies *H. pylori* Real-TM (1x) und VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin Real TM PCR kit (1x).

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 51 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme von zwei Teilnehmern waren die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

## RV 534: EHEC/STEC

Wie auch bereits bei den vorhergegangenen Runden dieses Ringversuchs mehrfach diskutiert, besteht die eigentliche Herausforderung bei dem Nukleinsäure-

gestützten Nachweis von EHEC/STEC prinzipiell nicht so sehr im Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen, sondern vielmehr in der differenzierten Analyse und der Typisierung unterschiedlicher Shiga-Toxin-Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen). Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher drei unterschiedliche EHEC-positive Proben: mit ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL (# 2015341: *E. coli*, *stx*<sub>1</sub>-, *stx*<sub>2</sub>-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv und # 2015344: *E. coli*, *stx*<sub>1</sub>-positiv) und mit ca.  $5 \times 10^4$  CFU/mL (# 2015343: *E. coli*, *stx*<sub>2</sub>- und *eae*-positiv). Die Probe # 2015342 enthielt diesmal nur einen „normalen“ *E. coli* K12-Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ).

Mit Ausnahme der Probe # 2015343 (*stx*<sub>2</sub>-positives EHEC-Isolat) führte die Verfügbarkeit von mittlerweile sehr gut etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC bei den restlichen drei Proben durchweg zu hohen Richtigkeitsquoten – sowohl für positive als auch für negative Befunde. Von 130 bzw. 131 der insgesamt 132 Teilnehmer wurden hier durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet. Angesichts der Probenkonstellation mit einer vorhergehenden stark positiven Probe könnte es sich bei den 2 falsch-positiven PCR-Resultaten für die negative Probe # 2015342 (mit *eae*- und *hlyA*-negativem *E. coli* K12-Stamm) eventuell um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung gehandelt haben. Aber das bleibt aus Sicht der retrospektiven Ringversuchsauswertung natürlich spekulativ.

Erfahrungsgemäß sind bei den üblicherweise eingesetzten PCR/NAT-Testsystemen auch gewisse „diagnostische Lücken“ aufgrund der mehr oder weniger stark ausgeprägten Sequenzheterogenität innerhalb der bisher bekannten Shiga-Toxin-Genvarianten zu erwarten. Dies wurde im aktuellen Ringversuch wieder einmal mit der Probe # 2015343 und dem darin enthaltenen *stx*<sub>2</sub>-positiven EHEC-Isolat bestätigt. Hier wurde lediglich von 79 der insgesamt 132 Teilnehmer ein positives Ergebnis für die Anwesenheit von Shiga-Toxin-Genen berichtet. Bei genauere Analyse der mitgeteilten Test-Daten war auffällig, dass aus der Reihe von kommerziellen Testsystemen nicht alle Testkits die *stx*<sub>2</sub>-positive Probe # 2015343 problemlos nachweisen konnten. Anwender des TIB MolBio Modular Kits und des r-Biopharm RIDAGENE EHEC Kits berichteten dagegen durchweg richtig positive EHEC-Ergebnisse für diese Probe.

Auch wenn die humanpathogene Relevanz von *stx*<sub>2</sub>-positiven EHEC-Isolaten in der Fachwelt nach wie vor umstritten ist, soll hier an einem Beispiel aus der mikrobiologischen PCR-Routinediagnostik wieder einmal die überraschende Vielfalt an möglichen Genkonstellationen im Umfeld von EHEC-Isolaten aufgezeigt werden. Der bisher einzige Nachweis eines *stx*<sub>2</sub>-positiven EHEC-Isolates in unserem Hause erfolgte aus einer Lebensmittelprobe, als im Zuge des EHEC-Ausbruchsgeschehens im Jahre 2011 umfangreiche Screeninguntersuchungen aus Stuhl-, Umwelt- und Lebensmittelproben durchgeführt wurden.

In diesem Fall passte der *stx*<sub>2</sub>-Nachweis übrigens „anamnestisch“ hervorragend zu den bekannten Übertragungsrouten (Blattsalat aus Gewächshaus, das aus ökologischen Gründen mit Regenwasser aus der Dachrinne bewässert wurde; das Dach dieses Gewächshauses war ein beliebter Rastplatz für die Bewohner von umliegenden Taubenkobel...). Zur Thematik der „*stx*<sub>2</sub>-positiven *E. coli*-Isolate“ sind inzwischen auch zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht worden. Exemplarisch sei hier auf eine Publikation des RKI in Wernigerode aus dem Jahre 2009 verwiesen [1].

Anmerkung an die Teilnehmer des aktuellen Ringversuchs: bitte keine Angst um die Zertifikate, denn diese Probe wurde natürlich als „edukative Probe“ deklariert und die entsprechenden Ergebnisse daher bei der offiziellen Bewertung zur Erteilung von Ringversuchszertifikaten außen vor gelassen.

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

Neben der erfreulicherweise stark ansteigenden Zahl an kommerziellen Testsystemen mit guter „Performance“ gab ein Drittel der Teilnehmer nach wie vor die Verwendung von selbstentwickelten oder „anderen“ kommerziellen Testsystemen mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC an, und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Zudem wurden von 115 der insgesamt 132 Teilnehmer 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 im mitgeteilten Umfang, großteils korrekt. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (3x), Amplex eazyplex EHEC complete (2x), BioMerieux BioFire GI Panel (3x), Seegene Allplex GI-EB Screening (1x), Amplex eazyplex EHEC classic plus und eazyplex EHEC basic (1x), MIKROGEN ampliCube Gastrointestinal Bacterial Panel 2 (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit (1x), Fast Track Diagnostics (1x), Mast Group Mast Isoplex VTEC-Kit (1x) und OptiGene Isothermal Master Mix (1x).

## RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

Sensitivität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt somit eine Probe mit einer relativ hohen Menge an *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (# 2015351,  $\sim 5 \times 10^5$  Organismen/mL), eine Probe mit einer etwa zehnfach geringeren Menge (# 2015353,  $\sim 5 \times 10^4$  Organismen/mL), eine Probe mit einer etwa hundertfach geringeren Menge (# 2015352,  $\sim 5 \times 10^3$  Organismen/mL) an *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, sowie eine Probe ohne Zielorganismen, die einen *E.coli* K12-Stamm enthielt (# 2015354).

Die Detektion von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in den beiden Proben mit relativ hoher Erregerlast (# 2015351 und # 2015353) bereitete dem Großteil der Teilnehmer keinerlei Probleme, sodass für beide Proben durchwegs richtig-positive Ergebnisse beobachtet wurden. Wie zu erwarten und auch im Rahmen der vorhergehenden Ringversuche stets zu beobachten war, werden mit abnehmender Erregerlast deutlich mehr falsch-negative Ergebnisse beobachtet. So konnten diesmal 3 der insgesamt 114 Teilnehmer bei der relativ schwach positiven Probe # 2015352 ( $\sim 5 \times 10^3$  Organismen/mL an *Borrelia burgdorferi* sensu stricto) mit ihren PCR/NAT-Testsystemen keine Borrelien-DNA mehr nachweisen.

Hier nur kurz zum Vergleich: bei einer ähnlichen Probenkombination wurden in der Ringversuchsrunde November 2015 bei der Probe mit einer Erregerlast von  $\sim 5 \times 10^3$  Organismen/mL noch von ca. 10% der Teilnehmer falsch-negative PCR/NAT-Ergebnisse berichtet. Erfreulicherweise scheint sich die analytische Sensitivität der Borrelien-spezifischen PCR/NAT-Testsysteme über die Jahre also deutlich verbessert zu haben.

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von allen 114 Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionseignisse 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 (Inhouse-)Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet; kommerzielle Testsysteme wurden von 69 der 114 Teilnehmer eingesetzt.

Nicht zuletzt aufgrund der hohen Richtigkeitsquote waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und der – zumindest aus methodischer Sicht – relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (Inhouse-)Testsystemen zu beobachten.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Ingenetix BactoReal B. burgdorferi (3x), Gerbion Diarella Borrelia (1x), Elisabeth Pharmacon EliGene Borrelia RT (1x) und Demeditec GenFlow Borrelia plus PCR (1x).

## RV 536: Legionella pneumophila

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine sehr stark positive Probe # 2015361, die mit einer Menge von ca.  $10^5$  CFU/mL an *Legionella pneumophila* Serogruppe 14 versetzt war, sowie eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 2015363, ca.  $10^4$  CFU/mL) an *Legionella pneumophila* Serogruppe 1. Die Probe # 2015364 des aktuellen Sets enthielt ca.  $5 \times 10^4$  CFU/mL an *Legionella bozemanii*. Die zweite „negative“ Probe # 2015362 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*.

Die relativ hoch positive Probe # 2015361 des aktuellen Sets wurde erfreulicherweise von allen 120 Teilnehmern als positiv für *Legionella pneumophila*-DNA befundet, und bei der etwa 10-fach schwächer positiven Probe # 2015363 berichtete lediglich ein Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis. Auch bei der negativen Probe # 2015362 wurden diesmal erfreulicherweise keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet.

Die mit *Legionella bozemanii* ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) versetzte Probe wurde von 109 Teilnehmern mit *L. pneumophila*-spezifischen PCR-/NAT-Testsystemen korrekterweise als negativ befundet. Drei Teilnehmer berichteten hier ein falsch-positives Ergebnis für *Legionella pneumophila*-DNA, was auf eine Kreuzreaktion bzw. mangelnde Spezifität der Zielsequenz zurückzuführen sein dürfte. Bei der Interpretation der Daten in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 10) ist zu berücksichtigen, dass 8 der 11 Teilnehmer mit positivem Ergebnis bei Probe # 2015364 die Verwendung des ampliCube Respiratory Bacterial Panels der Fa. Mikrogen angegeben haben – dieses Testsystem detektiert jedoch unseres Wissens nach lediglich *Legionella* spp.

Vor allem Inhouse-Realtime-PCR-Protokolle mit ribosomalen Zielsequenzen zeigten in der Vergangenheit immer wieder Probleme bei der Spezifität. Bei Verwendung von nested Block-Cycler PCR-Protokollen zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung sollte jedoch der Fehler eher auf Anwenderseite gesucht werden (beispiels-

weise Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung), da dieses Testkonzept in jedem Fall die Unterscheidung der Spezies erlauben sollte. Da die damit erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Anwesenheit von *Legionella* spp. ja prinzipiell korrekt waren, werden wir ein auf den „Nachweis von *Legionella* spp. auf Genusebene“ eingeschränktes Zertifikat erwägen.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für die gute Sensitivität der verwendeten Testsysteme. Die allenfalls vereinzelt berichteten falsch-negativen Ergebnisse beruhen vermutlich eher auf anwendungstechnischen Problemen als auf unzureichender analytischer Sensitivität.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 91 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Signifikante Unterschiede bezüglich der analytischen Sensitivität zwischen kommerziellen und selbstentwickelten Testsystemen (von 29 Teilnehmern verwendet) fanden sich nicht. Inhibitionskontrollen wurden von allen der 120 Teilnehmer durchgeführt, wobei von keinem der Teilnehmer ein signifikantes Inhibitionsereignis in den Einzelproben des aktuellen Probensatzes beobachtet wurde.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: MIKROGEN ampliCube Respiratory Bacterial Panel 1(7x), BioFire FILMARRAY Pneumonia Panel (3x), BioGx Atypical pneumonia (4x), Fast Track Diagnostics FTD Atypical CAP (1x), Diagenode Legionella real time PCR Kit (1x), Gerbion diarella Legionella real time PCR Kit TM (1x), Ingenetix Bacto Real L. pneumophila (2x), Biologio Atypical Pneumonia-1 Assay (2x), ReadyMax B-CAP Assay (1x), Luminex Respiratory Pathogen Panel Multiplex (2x), Seegene Allplex PneumoBacter Assay (1x), ARGENE Legio pneumo/Cc r-gene (3x), BD Max (1x), AnDiatec Quidel L. pneumophila (1x), ELITechGroup L. pneumophila Q-PCR Alert Amplimix (1x), Euroclone Duplica Real Time L. pneumophila Detection Kit (1x) und Sacace Biotechnologies L. pneumophila Real-TM (1x).

## RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit einer relativ hohen Menge an *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (# 2015371;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), eine Probe mit dem gleichen Isolat in einer etwa zehnfach geringeren Menge (# 2015372,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), und zwei Proben ohne Zielorganismen (# 2015373 und # 2015374), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Vergleichbar mit der guten Ergebnislage bei manch früheren *Salmonella enterica* PCR/NAT-Ringversuchen, war diesmal nur ein falsch-negatives Ergebnis

bei der etwas schwächer positiven Probe # 2015372 zu beobachten.

Das Fehlen von falsch-positiven Ergebnissen deutet wieder einmal 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 unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Seegene Allplex GI-Bacteria (I) Assay (3x), Seegene Allplex GI-EB Screening (2x), Fast Track Diagnostics FTD Bacterial gastroenteritis(1x), MIKROGEN ampliCube Gastrointestinal Bacterial Panel 1 (1x), eazyplex TyphiTyper (1x) und r-Biopharm SureFast Salmonella PLUS (1x).

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

## RV 538: *Listeria* spp.

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

Daher werden, wie in dieser Ringversuchsrunde, auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein – so wie im Fall der Probe # 2015384, die diesmal ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL an *Listeria ivanovii* enthielt. Probe # 2015381 des aktuellen Sets enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL), die erfreulicherweise von nahezu allen der insgesamt 42 Teilnehmer korrekt erfasst wurde.

Zur Abprüfung von möglichen Kreuzreaktivitäten wurde in der aktuellen Ringversuchsrunde auch eine der 4 Proben (# 2015382) mit einer nennenswerten Menge an *Streptococcus pneumoniae* versetzt. Hier zeigte sich lediglich bei einem der insgesamt 42 Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis, das vermutlich eher durch Kontaminationsereignisse aus der Probe „1“ als durch analytische Kreuzreaktionen mit den eingesetzten *Listeria* spp.- oder

*L. monocytogenes*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen verursacht worden war.

Erfreulicherweise wurde auch die Probe # 2015383, welche ausschließlich humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt, von allen Laboratorien korrekterweise als „negativ“ befundet, was erneut für eine sehr gute Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsergebnissen 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=38). Dies spiegelte sich auch in der Ergebniskonstellation bei Probe # 2015384 wider, die diesmal eine signifikante Menge an *L. ivanovii* ( $1 \times 10^4$  CFU/mL) enthielt. Fünf der insgesamt 42 Teilnehmer mit explizit *Listeria* spp.-spezifischen Testsystemen berichteten diese Probe korrekt als positiv. Im Umkehrschluss spricht diese Datenlage jedoch für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung: Hält ein Teilnehmer lediglich ein **L. monocytogenes-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies im Online-Ergebnisformular spezifizieren, 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 42 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsergebnisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Progenie RealCycler *L. monocytogenes* (3x), Amplex eazyplex CSF direct (2x), Liferiver *L. monocytogenes* Real Time PCR Kit (1x), Sacace Biotechnologies *L. monocytogenes* Real-TM (2x), Seegene Allplex Meningitis-B Assay (1x), AmpliSens *L. monocytogenes* (1x), BioGx (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 diagnostische 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.

Nach den zugegebenermaßen etwas umfangreichen und ausführlichen Diskussionen der Ergebniskonstellationen vorhergegangener MRSA-Ringversuche kann die Auswertung des aktuellen Ringversuchs wieder einmal erfreulich kurz gehalten werden. Da wir diesmal, abgesehen von einem „interessanten“ *mecC*-positiven MRSA-Isolat und 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 besonders „schwierigen“ oder komplexen Probenkonstellationen versandt haben, wurden von den insgesamt 281 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 # 2015391 diesmal ein Gemisch aus einem *S. aureus*-Isolat (MSSA, PVL-negativ,  $\sim 10^5$  CFU/mL) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*, *mecA*-positiv,  $\sim 10^5$  CFU/mL), die Probe # 2015393 ein typisches MRSA-Patientenisolat (MRSA, PVL-negativ,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) und Probe # 2015392 eine relativ hohe Menge eines ***mecC*-positiven Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats** (MRSA, PVL-negativ, spa: spa:t10009,  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL). Die letzte der 4 Proben, # 2015394, enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der positiven MRSA-Probe # 2015393 von nahezu allen der 281 Teilnehmer durchweg korrekt-positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 3 falsch-negativen und des einen als „fraglich“ klassifizierten Ergebnisses bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden von diesen Teilnehmern, die die Verwendung von kommerziellen und zum Teil auch geschlossenen, sog. Kartuschen-Tests, angaben, Fehler bei der Probenvorbereitung oder -abarbeitung gemacht. Angesichts der mit  $5 \times 10^4$  CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 2015393 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben. Im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit vergleichbarer Probenkonstellation wurde bei Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies in Probe # 2015391 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 252 der insgesamt 281 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere

8 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von 5 dieser 8 Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruht. Da mit dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA*-Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus*- und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall „fraglich“ auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis.

Die restlichen Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Diesen 21 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 2015391 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 im entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. In diesem Fall würden die Testsysteme der letztgenannten 21 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 # 2015391 in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 14) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird ersichtlich, dass zumindest 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). Die Gründe für einzelne „Ausreißer“ sollten dabei eher auf Seiten der Testdurchführung in den betroffenen Laboratorien gesucht werden und nicht auf Seiten des Testkonzepts oder der präkonfektionierten PCR-Testkits. Die augenscheinlich „schlechte Datenlage“ bei der MRSA-positiven Probe # 2015392 ist bei näherer Betrachtung schnell erklärt. Hier handelt es sich um ein *S. aureus*-Patientenisolat, dessen phänotypische Oxacillin-Resistenz nicht über die Anwesenheit des „üblichen“ *mecA*-Gens sondern vielmehr über das **mecC-Gen** kodiert bzw. vermittelt wird. In den letzten Jahren wurden solche MRSA-Stämme in der Patientenversorgung mittlerweile zwar mehrfach, jedoch nach wie vor noch relativ sporadisch beobachtet. Es sind Oxacillin-resistente *S. aureus*-Isolate, die auf Gesamtgenom-Ebene alle üblicherweise verwendeten *S. aureus*-Speziesmarker aufweisen, sich in der SCC*mec*-orfX-Region aber auf Sequenzebene von den „typischen“ MRSA-Isolaten deutlich unterscheiden und zusätzlich noch anstatt des „populären“ *mecA*-Gens ein resistenzvermittelndes *mecC*-Gen mit stark abweichender Gensequenz tragen. Bei den mit diesem *mecA*-Homolog

ausgestatteten Bakterienisolaten erfolgt die Integration des *mecC*-Gens innerhalb einer neuartigen SCC*mec*-Genkassette vom Typ XI in das *S. aureus*-Genom (selbst auf Aminosäureebene weisen das *mecA*- und *mecC*-Genprodukt eine Homologie von weniger als 63% auf). Diese signifikanten Sequenzunterschiede führen noch bei einigen kommerziellen oder Inhouse-SCC*mec*-basierten PCR-Testsystemen, die nicht auf die speziellen Gensequenzen des *mecC*-Gens hin optimiert wurden, zwangsläufig zur „Nichterkenntnis“ solcher *mecC*-positiven MRSA-Isolate. Das MRSA-Isolat in Probe # 2015392 konnte daher (erwartungsgemäß) nur von Teilnehmern mit speziell auf dieses „neue“ Methicillin-Resistenzgen abgestimmten Testsystemen detektiert werden. Auch wenn solche *mecC*-positiven MRSA-Isolate derzeit zumindest in unseren Breiten noch sehr selten nachgewiesen werden, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher *mecC*-positiven MRSA-Isolate geweckt werden. Derzeit beschränkt sich der Nachweis von *mecC*-positiven MRSA-Isolaten (methoden- oder prävalenzbedingt) noch auf einige wenige Einzelfälle. Inwieweit jedoch die Entwicklung und das zusätzliche Mitführen von *mecC*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen erforderlich sein wird, kann sich erst im Rahmen zukünftiger systematischer Prävalenzstudien zeigen. Aufgrund des derzeit noch sehr seltenen Auftretens *mecC*-positiver MRSA-Isolate wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist, wie gehabt, durch die drei grauschriftierten Felder in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 13) gekennzeichnet.

Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 2015394), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von drei der 281 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 aufwendigen Ringversuchen mit nahezu 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen unseres Erachtens keiner weiteren Diskussion.

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. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht. Abgesehen von der besagten Probe mit dem *mecC*-positiven MRSA-Isolat spricht die Ergebnislage dieses Ringversuchs erneut für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Für Kolleginnen und Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickel-

ten 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 (PVL-negative) Ergebnisse der molekularbiologischen PVL-Testung wurden von 87 der insgesamt 281 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt, und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diese diesmal durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der nach wie vor hochaktuellen cMRSA- bzw. CA-MRSA-Problematik finden sich beispielsweise in Linde et al. [2] und Witte et al. [3]. Ein gut evaluiertes Realtime-PCR-Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in Reischl et al. [4]. Mittlerweile sind auch schon einige kommerzielle Realtime-PCR-Testsysteme für den zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis von PVL-Genen bei MRSA- und MSSA-Isolaten verfügbar.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Immundiagnostik MutaPlex MRSA (3x), Hologic Panther Fusion MRSA Assay (2x), BD Max StaphSR assay Kit (1x), BD Max MRSA XT (1x), MIKROGEN alphaCube MRSA (1x), Gerbion (1x), GenID MRSA combi (1x), GeneProof MRSA PCR Kit (1x), GenomEra MRSA/SA Multi Swab (1x) und ELITechGroup MRSA/SA Kit (1x).

## RV 540: Chlamydia pneumoniae

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

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit einer relativ hohen Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 2015402, *Chlamydia pneumoniae*,  $\sim 5 \times 10^5$  IFU/ml) und eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 2015403, *Chlamydia pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/ml), eine Probe mit ca.  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL an *Haemophilus influenzae* (# 2015404), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2015401), die ausschließlich

humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Aus den in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 15) aufgeführten Daten ist ersichtlich, dass im aktuellen Ringversuch erfreulicherweise alle der insgesamt 138 Teilnehmer die *C. pneumoniae*-Zielorganismen in der sehr stark positiven Probe # 2015402 (ca.  $5 \times 10^5$  IFU/mL) und in der 50-fach schwächer positiven Probe # 2015403 (ca.  $1 \times 10^4$  IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten.

Für die beiden Proben ohne *C. pneumoniae*-Zielorganismen # 2015401 (*E. coli*) und # 2015404 (*Haemophilus influenzae*) ist im Vergleich zu den vorhergegangenen Ringversuchen die Anzahl falsch-positiver Befunde erneut deutlich zurückgegangen. Bei diesen beiden Proben fand sich lediglich ein Teilnehmer, der die *Haemophilus influenzae*-positive Probe fälschlicherweise als positiv für *C. pneumoniae*-DNA bewertet hat. Hierbei dürfte es sich aber am ehesten um ein laborinternes Kontaminationsergebnis bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung gehandelt haben. Systematische Kreuzreaktivitäten der mittlerweile gut etablierten und evaluierten *C. pneumoniae*-spezifischen PCR/NAT-Testsysteme mit DNA von *H. influenzae* erscheinen aus methodischer Sicht eher als unwahrscheinlich. Diesmal wiesen nahezu alle der von den Teilnehmern eingesetzten Testsysteme oder PCR/NAT-Protokolle die im Rahmen der regulatorischen Vorgaben geforderten Inhibitionskontrollen auf; eine nennenswerte Inhibition wurde aktuell von keinem der Teilnehmer berichtet.

Selbstentwickelte Inhouse-PCR/NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 36 Laboratorien eingesetzt, von den restlichen 102 Teilnehmern wurde die Verwendung von kommerziellen Assays aufgeführt.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: AmpliSens M. pneumoniae/C. pneumoniae FRT PCR (4x), Seegene PneumoBacter assay (1x), Fast Track Diagnostics FTD Atypical CAP Kit (1x), BioGx atypical pneumonia (5x), MIKROGEN ampliCube Respiratory Bacterial Panel 1 (9x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (2x), Biologix ReadyMax B-CAP Assay (2x), Sacace Biotechnologies M. pneumoniae/C. pneumoniae Real-TM (4x), Ingenetix Bacto Real C. pneumoniae (2x), ARGENE Chla/Mycopneumo r-gene (4x), BioFire FILMARRAY respiratory Panel (3x), Eazyplex PneumoBug expert (1x), RespiFinder (1x), Euroclone Duplica Real Time C. pneumoniae Kit (1x) und AusDiagnostics Atypical Pneumonia MT-PCR (2x).

## RV 541: Mycoplasma pneumoniae

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

**plasma pneumoniae-DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut, wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial, konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 16) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 2015411 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*,  $\sim 5 \times 10^5$  Genomkopien/mL) und Probe # 2015414 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*,  $\sim 5 \times 10^3$  Genomkopien/mL). Um zur Abwechslung auch einmal die analytische Spezifität der *M. pneumoniae*-spezifischen PCR/NAT-Testsysteme abzu prüfen, enthielt Probe # 2015413 diesmal eine nennenswerte Menge an *Chlamydia pneumoniae*. Im Ringversuchsprobenset befand sich auch eine weitere Probe ohne Zielorganismen (# 2015412), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen in der üblichen Matrix enthielt.

Alle bis auf zwei der insgesamt 160 Teilnehmer konnten die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 2015411 problemlos und zuverlässig nachweisen. Bei der etwa hundertfach schwächer positiven Probe # 2015414 (ca.  $5 \times 10^3$  Genomkopien/mL) gelang diesmal nur noch 154 Teilnehmern der erfolgreiche Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA. Fünf Teilnehmer berichteten hier ein negatives Ergebnis, und einer klassifizierte sein PCR/NAT-Ergebnis als „fraglich“ (dieser Teilnehmer berichtete übrigens bei allen 4 Proben ein fragliches Ergebnis und wir konnten ihm leider kein Zertifikat erteilen).

Bei den betroffenen Laboratorien sollte dies zum Anlass genommen werden, die Sensitivität des verwendeten Testsystems sowie gegebenenfalls die Prozesse der Probenaufarbeitung zu evaluieren.

Bei den beiden Proben # 2015413 (mit nennenswerten Mengen an *Chlamydia pneumoniae*) und # 2015412 (die „nur“ *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt) wurden jeweils von 153 Teilnehmern korrekt-negative Ergebnisse mit ihren jeweiligen *M. pneumoniae*-spezifischen Testsystemen beobachtet. Bei den je 6 falsch-positiven Ergebnissen für letztere beide Einzelproben handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung oder um Kreuzreaktivitäten, die möglicherweise in der Verwendung von Testsystemen mit unzureichender Spezies-Spezifität begründet sind. Daher sollten vor allem diejenigen Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen bei der Probe mit *Haemophilus influenzae* versuchen, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen NAT-Testsysteme zu überprüfen und gegebenenfalls nachzubessern.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 119 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt und gravierende Unterschiede in den Richtigkeitsquoten von kommerziellen Testsystemen und

Inhouse-Assays waren, soweit in den entsprechenden Angaben ersichtlich, nicht auffällig.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: MIKROGEN ampliCube Respiratory Bacterial Panel 1 (9x), Meridian Bioscience Alethia Mycoplasma direct (8x), Sacace Biotechnologies *M. pneumoniae*/C. pneumoniae Real-TM (4x), AmpliSens *M. pneumoniae*/C. pneumoniae FRT PCR (4x), Seegene PneumoBacter assay (1x), BioGx auf BD Max (3x), BioGx atypical pneumonia (2x), BioFire FILMARRAY respiratory Panel (3x), Biologig ReadyMax B-CAP Assay (2x), Euroclone Duplica Real Time *M. pneumoniae* Kit (1x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (3x), Luminex MagPix Respiratory Pathogen Panel Assay (1x), Sartorius Microsart ATMP Mycoplasma (2x), Ingenetix Bacto Real *M. pneumoniae* (1x), RespiFinder (1x), AusDiagnostics Respiratory panel C (1x), AusDiagnostics Atypical Pneumonia MT-PCR (1x), HiberGene HG *M. pneumoniae* (1x) und Minerva Venor GeM qEP (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 geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tabelle 1, Anhang 1, S. 17) enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *C. burnetii* ( $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL in Probe # 2015423 und  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL in Probe # 2015421), eine Probe mit DNA des *B. anthracis* „STI“-Impfstammes ( $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL in Probe # 2015424), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* UR-1-Isolats ( $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL in Probe # 2015421), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2015422), 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), für *B. anthracis* in den Tabellen 4 und 5 (Anhang 1, S. 18).

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Progenie RealCycler Kits (3x), a-Cube (1x), AmpliSens *C. burnetii*/*B. anthracis* (1x), Life Technologies LSI VetMAX Absolute quant. *C. burnetii* (1x), Sacace Biotechnologies *C. burnetii* Real-TM (1x), Master diagnostica Tick-borne

bacterial flow chip (1x), BioGx (1x) und Adiagene ADIAVET *C. burnetii* (1x),

**Coxiella burnetii:** Wie bereits in vorausgegangenen Ringversuchsrunden dieser Serie gestaltet sich die Ergebnislage auch in der aktuellen Aussendung sehr erfreulich. Die etwas stärker positive Probe # 2015421 (mit ca.  $1 \times 10^5$  Genomkopien *C. burnetii*/mL) wurde von allen der insgesamt 48 Teilnehmer mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Die zweite positive Probe # 2015423 des Probesets (ca.  $1 \times 10^4$  Genomkopien/mL an *C. burnetii*) wurde von 47 Laboratorien korrekt befundet. Hier wurde allerdings von einem Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis beobachtet. Die beiden Proben ohne *C. burnetii*-Zielorganismen bzw. -DNA (# 2015422 und # 2015424) wurden jeweils von allen Teilnehmern bis auf einen korrekt als „negativ“ bewertet und zwei Teilnehmer klassifizierten ihr Ergebnis hier als „fraglich“. Sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse sollten in den betroffenen Laboratorien zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems nochmals zu evaluieren und gegebenenfalls die spezifischen Prozesse der Probenaufarbeitung sowie den diagnostischen Ablauf zu optimieren.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA der Teilnehmer enthielten durchwegs eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bis auf zwei „isolierte“ Inhibitionsereignisse bei Einzelproben wurden bei den jeweils eingesetzten PCR/NAT-Assays keine signifikanten Inhibitionsereignisse beobachtet.

**Bacillus anthracis:** Die Ergebnislage des Ringversuchs *Bacillus anthracis*-DNA ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Alle bis auf einen der insgesamt 27 Teilnehmer konnten die beiden Proben mit Zielorganismen (# 2015421 und # 2015424) sowie die beiden Proben ohne Zielorganismen (# 2015422 und # 2015423) richtig klassifizieren.

Zur kurzen Rekapitulation: **B. anthracis-Stamm STI** ist positiv für die **B. anthracis-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker rpoB** oder **dhp61** und das **Virulenzplasmid pXO1** (kodiert für Letal- und Ödem-Faktor sowie Protektives Antigen *pagA*), jedoch **negativ für das Virulenzplasmid pXO2**. Wie immer stehen nach erfolgreichem Abschluss der aktuellen Ringversuchsrunde den Kolleginnen und Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen für *C. burnetii*-DNA und *B. anthracis*-DNA interessiert sind, mit den Proben dieses Ringversuchs auch gewissermaßen „standardisierte Rückstellproben“ zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

## RV 543: Francisella tularensis & 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 F. tularensis-DNA und Brucella spp.-DNA** aus geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tabelle 1, Anhang 1, S. 19) enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *F. tularensis* subsp. *tularensis*-DNA ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL in Probe # 2015433 und  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL in Probe # 2015434), zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Brucella melitensis*-DNA ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL in Probe # 2015432 und  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL in Probe # 2015434), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2015431), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Sacace Biotechnologies *Brucella* Real-TM (1x), AmpliSens *Brucella* spp. (1x) und Master diagnostica Tick-borne bacterial flow chip (1x).

**Francisella tularensis:** Im aktuellen Probenet befanden sich jeweils zwei positive Proben (# 2015433 und # 2015434) sowie zwei negative Proben (# 2015431 und # 2015432), die diesmal von allen der insgesamt 33 Teilnehmer durchwegs korrekt mit ihren *F. tularensis*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen analysiert und befundet wurden. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von *F. tularensis*-DNA enthielten entsprechende Inhibitions- und/oder Extraktionskontrollen und bei keiner der aktuellen Proben wurden Inhibitionsereignisse beobachtet.

**Brucella spp.:** Die Ergebnislage für die *Brucella* spp.-spezifische Komponente des RV 543 deckt sich diesmal komplett mit der zuvor diskutierten Konstellation für *F. tularensis*. Auch hier wurden die beiden *Brucella* spp.-positiven Proben (# 2015432 und # 2015434) und die beiden negativen Proben (# 2015431 und # 2015433) von allen der diesmal 30 Teilnehmer durchweg korrekt mit ihren *Brucella* spp.-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen analysiert und befundet.

Bei den selbstentwickelten oder kommerziellen Testsystemen zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von *Brucella* spp.-DNA wurden durchweg geeignete Inhibitions- und/oder Extraktionskontrollen mitgeführt und bei keiner der aktuellen Proben Inhibitionsereignisse mitgeteilt.

## 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 Enterobacterales konzipiert.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 21) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacterales*: Probe # 2015441 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit dem OXA-232-Gen (ca.  $1 \times 10^7$  Genomkopien/mL), Probe # 2015442 *Enterobacter cloacae*-Komplex-Zielorganismen mit dem IMI-2-Gen (ca.  $1 \times 10^7$  Genomkopien/mL) und Probe # 2015444 enthielt eine NDM-1-positive *Serratia marcescens* (ca.  $1 \times 10^7$  Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 2015443 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

87 der 89 Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in der Probe # 2015441 fest. Für die Probe mit NDM-1-positiver *Serratia marcescens* (# 2015444) wurden sogar ausnahmslos korrekte Ergebnisse berichtet. Hoch lag die Richtigkeitsquote auch für die Probe # 2015443, hier berichteten 86 Teilnehmer die Probe als „Carbapenemase-negativ“; zudem wurden 2 falsch-positive und ein fragliches Ergebnis eingereicht. Schwächen zeigten sich allerdings bei der Detektion des IMI-2-positiven *Enterobacter cloacae*-Komplex in Probe # 2015442. Nur 14 Teilnehmer reichten für diese Probe ein korrektes, positives Ergebnis ein. Da das IMI-2-Gen gerade in einigen Multiplex-PCR/NAT-Testformaten (noch) nicht als Target enthalten ist, wurden die mitgeteilten Ergebnisse auch nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist der Übersichtlichkeit halber durch die drei grau schraffierten Felder in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 21) gekennzeichnet.

Hier noch ein kurzer **Kommentar von Frau Dr. Agnes Anders vom NRZ für gramnegative Krankenhauserreger**: Besonders auffällig ist bei dieser **Carbapenemase IMI-2**, die zu den Serin-Carbapenemasen gehört und deren Nachweisrate in den letzten Jahren zugenommen hat, eine **häufige Colistin-Resistenz**. Diese liegt nach Daten des Nationalen Referenzzentrums bei etwa 50%. IMI-2 kommt am häufigsten in *Enterobacter* spp. vor.

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

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Check-Points Check direct CPE oder MDR (2x), AID Carbapenemase (2x), GenID Carbapenemase (2x), Seegene eazyplex SuperBug expert (1x), AmpliGnost Carbapenemase PCR Kit (1x), BD Max CPO Kit (1x), Mast Group Mast Isoplex CRE-ART (1x), HAIN Lifescience Check-Direct CPE (1x) und hylabs Hy-CRE-(KPC/OXA-48/NDM-1) Detection Kit (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 geeigneten klinischen 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. 22) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben drei positive Proben: Probe # 2015452 mit einer relativ hohen Menge an *Clostridium difficile* ( $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL), Probe # 2015453 mit ca. zehnfach geringerer Menge ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL), Probe # 2015451 mit ca. hundertfach geringerer Menge ( $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2015454), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden relativ stark positiven *Clostridium difficile*-Proben # 2015452 und # 2015453 wurden erfreulicherweise von 179 bzw 177 der insgesamt 181 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ klassifiziert. Falsch-negative Ergebnisse sollten hier zum Anlass genommen werden, das verwendete Testsystem bezüglich der analytischen Sensitivität und Spezifität zu evaluieren und auch die laborinternen Prozesse der Probenaufbereitung und -abarbeitung kritisch zu hinterfragen. Letzteres gilt insbesondere für den Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis für die lediglich *E. coli* enthaltende Probe # 2015454. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich. Probe # 2015451 enthielt mit  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL die geringste Menge an Zielorganismen und wurde immerhin von 177 (also nahezu von allen) Teilnehmern korrekt als positiv für *C. difficile* befundet. Bei den 3 Teilnehmern mit falsch-negativem Ergebnis sollte gegebenenfalls die analytische Sensitivität des eingesetzten PCR/NAT-Testsystems hinterfragt werden. Bis auf 2 Teilnehmer haben diesmal alle die vorschrittmäßigen Extraktions- und/oder Inhibitionskontrollen mitgeführt, und signifikante Inhibitionsereignisse wurden für keine der ausgesandten Proben berichtet.

Wie in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 22) angegeben, verwendete der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme, während selbstentwickelte Testkonzepte in 12 Laboratorien zum Einsatz kamen. In dieser Ringversuchsrunde zeigten sich (vergleichbar mit der vorausgegangenen) zwischen den kommerziellen Testsystemen und den Eigenentwicklungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität. Für eine verlässlichere Beurteilung sollten jedoch die folgenden Ringversuchsrunden abgewartet werden.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: QUDEL

Solana C. difficile Assay (5x), Amplex eazypex C. difficile (4x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (1x), Seegene Allplex GI-EB Screening (2x), AmpliGnost C. difficile Toxin A und B (2x), Seegene Allplex GI Bacteria Assay (1x), TIB Molbiol LightMix Kits (2x), Abacus Diagnostica GenomEra C. difficile (1x), Altona diagnostic RealStar C. difficile PCR Kit (1x), Fast Track Diagnostics C. difficile (1x) und Aries Luminex C. difficile (1x).

## RV 546: VRE

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Vancomycin-resistente Enterokokken“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an DNA Vancomycin-resistenter Enterokokken** aus geeigneten klinischen 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 # 2015464 mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecium* vanA-resistent,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), Probe # 2015461 mit einer etwa fünf-fach höheren Menge (*Enterococcus faecium* vanB-resistent,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) und Probe # 2015463 mit ca.  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL an *Enterococcus faecalis*. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 2015462), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden „positiven“ Proben mit vanB- bzw. vanA-tragenden *Enterococcus faecium* (# 2015461 und # 2015464) mit drei bzw. keiner Ausnahme von allen Teilnehmern als „VRE-positiv“ klassifiziert.

Das heißt aber auch, immerhin 3 falsch-negative Ergebnisse wurden für den vanB-tragenden *E. faecium*-Stamm (# 2015461) eingereicht. Im Falle einer Infektion mit dem Erreger kommt dem korrekten Nachweis einer Vancomycin-Resistenz natürlich eine hohe Bedeutung zu. Wie bereits im vorangegangenen Ringversuch waren mit lediglich einer Ausnahme die eingereichten vanA/vanB-Differenzierungen korrekt. Von den VRE-negativen Proben wurde # 2015462 von 67 der 68 Teilnehmer korrekt klassifiziert, für die Probe # 2015463 waren drei falsch-positive Befunde zu verzeichnen.

Bei den eingesetzten Testsystemen zeigt sich in den letzten Jahren ein Trend hin zu kommerziell erhältlichen, vorkonfektionierten Systemen. Unterschiede in Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu Inhouse-Assays waren jedoch nicht zu erkennen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: BD GeneOhm™ VanR (1x), Amplex eazypex VRE (1x), BioGx Vancomycin resistance (2x), GeneProof VRE PCR Kit (1x), Roche LightCycler VRE Detection Kit (1x), TIB Molbiol (1x)

und AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz Differenzierung (1x).

## RV 547: Urogenital-Panel

Nach intensiven Vorarbeiten zum Proben-Design, zur praktischen Umsetzung und der Aussendung von zwei sogenannten „Piloten“ wird der komplexe Ringversuch RV 547 „Urogenital-Panel“ zukünftig im Rahmen des regulären Ringversuchsprogramms von INSTAND e.V. durchgeführt und die Ergebniskonstellation hier diskutiert. Das überaus heterogene Spektrum an eingesetzten Testsystemen erschwert natürlich nach wie vor eine strukturierte und übersichtliche Auswertung der auf den Report-Formularen mitgeteilten Ergebnisse. Daher haben wir im Vergleich zu den übrigen Ringversuchen der hier diskutierten Ringversuchsreihe „Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT“ die ursprüngliche Tabelle 3 etwas differenzierter dargestellt (jetzt: „erregerspezifische“ Auswertung in den Tabellen 2 bis 9, Anhang 1, S. 24–28). Dort ist der Übersicht halber nun die Anzahl an positiven und negativen Ergebnissen für die in den jeweiligen Proben anwesenden Pathogene aufgeführt. Mit dieser Lösung sollte man, trotz der enormen und vermutlich zukünftig auch noch zunehmenden Heterogenität des Erreger- und Testspektrums einzelner Multiplex-PCR-Testkonzepte, eine einigermaßen informative Darstellung über das erfasste Erregerspektrum und über die Leistungsdaten einzelner Testsysteme erhalten können.

Im Großen und Ganzen haben die 88 aktuell registrierten Teilnehmer die Erreger in den 4 Einzelproben entsprechend den methodischen Möglichkeiten ihrer Testsysteme zufriedenstellend nachweisen können. Wie aus den Tabellen 2 bis 9 (Anhang 1, S. 24–28) zu entnehmen, wurden insgesamt nur sehr wenige (sporadische) falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse berichtet.

So wurden in der aktuellen Ringversuchsrunde vereinzelt falsch-positive sowie falsch-negative Ergebnisse für *Trichomonas vaginalis* oder *Gardnerella vaginalis* beobachtet, und von einem Teilnehmer wurde innerhalb des aktuellen Sets bei der *Mycoplasma genitalium*-positiven Probe # 2015474 ein positives Ergebnis für *Treponema pallidum*-DNA und *Gardnerella*-DNA berichtet. Bei den falsch-positiven Befunden könnte es sich eventuell um labor- oder testinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung gehandelt haben. Inhibitionskontrollen wurden von allen der 88 Teilnehmer mitgeführt, und von keinem Teilnehmer wurden Inhibitionsereignisse beobachtet.

Dies spricht zum einen für die Praktikabilität unseres innovativen Multiplex-Ringversuchskonzepts und zum anderen für die relativ zuverlässige Erfassung der Zielorganismen innerhalb der jeweils testspezifisch abgedeckten Erregerspektren der eingesetzten kommerziellen oder eigenentwickelten PCR/NAT-Verfahren.

Wie bereits in der vorhergehenden Ringversuchsdiskussion erwähnt, haben wir im Rahmen der Online-Ergebnisübermittlung des RV 547 eine Option in der Eingabe-

maske entwickelt, über die die einzelnen Teilnehmer das aktuell erfasste Erregerspektrum ihrer individuellen Testsysteme und Multiplex-Assays während der Ergebniseingabe mitteilen. Für die Erteilung von Zertifikaten macht es nachvollziehbarerweise nur Sinn, dass diejenigen Parameter bewertet und testiert werden, die von den individuellen Teilnehmern im Rahmen ihres diagnostischen Workflows prinzipiell auch als positiv bzw. negativ erfasst werden können.

Wie bereits eingangs kurz erwähnt, werden wir uns aufgrund des zunehmend heterogenen Spektrums von differenziert erfassten oder auch nicht zu differenzierenden Spezies einiger Erregergruppen (z.B. *Ureaplasma* spp. vs. *U. parvum*/*U. urealyticum*) bei vielen der aktuellen PCR-Testsysteme zeitnah bemühen, bei den Online-Eingabemasken die Möglichkeit einer differenzierten Befundung auf Spezies- oder eben nur auf Genus-Ebene schaffen.

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 Teilnehmer bei den zukünftigen Ringversuchsrunden mit aussagekräftigen Zertifikaten versorgen zu können.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Seegene Allplex Genital ulcer (7x), Mikrogen ampliCube STD Panels (6x), Amplex eazyplex STD complete (3x), AmpliGnost M. hominis (2x), Seegene Anyplex STI-7 Detection (2x), AB Analytica UU/UP (1x), AmpliSens UU/UP/TV/MG/MH/GV (1x), AID RDB 2110 STD (1x), aprimeo Vivalytic STI (1x), AusDiagnostics Urogenital (1x), BIORON diagnostics RealLine U.urealyt./U. parvum (1x), BioGx T. vaginalis (1x), BD Max T. vaginalis (1x), Fast-track Diagnostics T. pallidum (1x), Fast Track Diagnostics STD Urethritis basic (1x), GeneProof Ureaplasma/TV/TP Kits (1x), GeneProof CT/NG/MG/MH Multiplex PCR Kit (1x), Genedia M. genitalium (1x), HAIN Lifescience FluoroType STI (1x), Progenie RealCycler TPHD Kit (1x), Roche COBAS TV/MG (1x), Sacace Biotechnologies UU/UP/TV/TP/MG/MH/GV (1x), TIB Molbiol LightMix modular T. pallidum (1x) und VIASURE (1x).

## RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Dieser Ringversuch „RV 560 Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis von *Pneumocystis jirovecii*-DNA** in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set zwei positive Proben (Tabelle 1, Anhang 1, S. 29): eine Probe

mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (# 2015601, *Pneumocystis jirovecii*, ca.  $1 \times 10^5$  Organismen/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 2015604, *Pneumocystis jirovecii*, ca.  $1 \times 10^4$  Organismen/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 2015602 und # 2015603), aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Die beiden negativen Proben # 2015603 und # 2015602 wurden erfreulicherweise mit einer bzw. zwei Ausnahmen von allen Teilnehmern korrekt als negativ für *Pneumocystis jirovecii*-DNA befundet. Im Vergleich zu den vorausgegangenen Ringversuchsrunden hat sich die Rate an falsch-positiven Ergebnissen damit erneut leicht reduziert. Einer der Teilnehmer hat seine Ergebnisse bei allen 4 Proben des aktuellen Sets als „fraglich“ klassifiziert. Bei den positiven Proben wurde Probe # 2015601 mit  $\sim 1 \times 10^5$  Organismen/mL diesmal von nahezu allen der insgesamt 118 Teilnehmer korrekt als positiv befundet. Etwas schlechter war die Ergebnislage für die ca. zehnfach schwächere positive Probe # 2015604 (ca.  $1 \times 10^4$  Organismen/mL). Immerhin 107 von insgesamt 118 teilnehmenden Laboratorien berichteten hier ein korrektes, positives Ergebnis. Bei einer Menge von  $1 \times 10^4$  Organismen/mL an *P. jirovecii* (entspricht ca. 100 Zielorganismen in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100  $\mu$ l) nähert man sich offenbar der unteren Nachweisgrenze aktueller, durchschnittlich sensitiver PCR/NAT-Testsysteme und den entsprechenden Arbeitsabläufen zur Probenaufarbeitung und Template-DNA-Präparation an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 2015604 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die durchgehend grau schraffierten Felder in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 29) gekennzeichnet. Inhibitionskontrollen wurden von allen 118 Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse waren auch diesmal nicht zu beobachten.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: AmpliSens *P. jirovecii* FRT (2x), PathoNostics PneumoGenius (1x), VIASURE *P. jirovecii* Real Time PCR Detection (2x) und Ademtec MYCOgenie (1x).

## Anhänge

Verfügbar unter

<https://www.egms.de/de/journals/lab/2021-12/lab000041.shtml>

1. Anhang1\_lab000041.pdf (463 KB)  
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ Mai 2020

## Literatur

1. Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschäpe H. Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol.* 2009 Jun;299(5):343-53. DOI: 10.1016/j.ijmm.2008.10.008
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem Staphylococcus aureus: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant Staphylococcus aureus: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(1):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of 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 Buttlar H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2020 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab.* 2021;12:Doc01. DOI: 10.3205/lab000041, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000414

### Artikel online frei zugänglich unter

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2021-12/lab000041.shtml>

Veröffentlicht: 08.03.2021

### Copyright

©2021 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 May 2020 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 INSTAND e.V. website (<https://www.instand-ev.de>). Although the preferred language of these documents is German, we aim to provide at least a brief discussion of the results and some key issues in English and keep the tables in a bilingual style.

**Udo Reischl<sup>1</sup>**  
**Martin Ehrenschwender<sup>1</sup>**  
**Andreas Hiergeist<sup>1</sup>**  
**Matthias Maaß<sup>2</sup>**  
**Michael Baier<sup>3</sup>**  
**Dimitrios Frangoulidis<sup>4</sup>**  
**Gregor Grass<sup>4</sup>**  
**Heiner von Buttler<sup>4</sup>**  
**Holger Scholz<sup>4</sup>**  
**Volker Fingerle<sup>5</sup>**  
**Andreas Sing<sup>5</sup>**  
**Roger Dumke<sup>6</sup>**  
**Ingrid Reiter-Owona<sup>7</sup>**  
**Agnes Anders<sup>8</sup>**

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

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

3 Institute of 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 May 2020

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

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

The current set of QC samples contained three samples with different amounts of *C. trachomatis* ( $\sim 5 \times 10^4$  IFU/mL in sample # 2015304,  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/mL in sample # 2015303 and  $\sim 5 \times 10^3$  IFU/mL in sample # 2015301), as well as three samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms:  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL in sample # 2015301,  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL in sample # 2015304 and  $\sim 5 \times 10^2$  CFU/mL in sample # 2015303. Due to the relatively high amounts of *C. trachomatis* target organisms in the three positive samples of the current distribution, all but 2 of the 269 participants reported correct-positive CT results for samples # 2015301, # 2015303 and # 2015304. For the CT-negative sample # 2015302, only 2 false-positive results were noted. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 29 of the 267 participants for samples # 2015303 and # 2015304, which contained a relatively low number of *N. gonorrhoeae* target organisms ( $5 \times 10^2$  CFU/mL and  $1 \times 10^3$  CFU/mL, respectively) next to a high amount of *C. trachomatis* ( $5 \times 10^4$  IU/mL). Also 6 false-positive results for the GO-negative sample # 2015302 were reported by the participants. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, contamination events of the GO-negative sample "2" by target organisms or PCR products of the positive sample "1" is by far not unlikely in the current

sample constellation. As a consequence, observation of false-positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their GO-specific NAT-based test system. Since the amount of target organisms in the GO-positive sample # 2015301 could not be considered as "extremely low", false-negative results should also encourage the corresponding participants to carefully investigate and optimize their GO-specific NAT-based assays (or at least the GO-specific components if they are using multiplex assay concepts).

Inhibition controls were included by nearly 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 269 participants.

### RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained three positive samples: # 2015312 with  $\sim 5 \times 10^4$  IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, # 2015314 with  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/mL and # 2015311 with  $\sim 5 \times 10^3$  IFU/mL. Sample # 2015313 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. As depicted in Table 2 (Attachment 1, p. 4), the reported results were generally correct for the two *C. trachomatis*-positive samples # 2015311 and # 2015312. Two false-negative results were observed for sample # 2015314 of the current set. For the *C. trachomatis*-negative sample # 2015313, containing only non-infectious human cells and *E. coli*, false-positive results were observed by three laboratories among the 59 participants.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the "negative" sample "3" by target organism or PCR product carry-over from the positive samples "1" or "2" might have occurred within the sample prep and amplification workflow of the affected laboratories. In general, the observation of false-positive and/or false-negative results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system. However, this striking match of the current results with observations and accuracy rates during the past distributions of our EQAS scheme can again be considered as an evidence for high

reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing.

Run controls were performed by nearly all of the 59 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 59 participants.

## RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a very high amount of *Bordetella pertussis* (# 2015323;  $1 \times 10^6$  CFU/mL), one sample with an approximately ten-fold lower number of *Bordetella pertussis* (# 2015321;  $1 \times 10^5$  CFU/mL), as well as two samples containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 2015322 and # 2015324).

The availability of well-established commercial or in-house NAT assays has led to a high portion of correct results. Only 2 of the 153 participants reported false-positive results for the *B. pertussis*-negative sample # 2015322, and four false-positives were observed with *B. pertussis*-negative sample # 2015324. The false-positivity issue is probably due to contamination events in the course of sample preparation or PCR/NAT amplification. A cross-reaction due to a possible low specificity of the used PCR/NAT test system is unlikely, because the negative samples contained only *E. coli* cells in the sample matrix as a kind of bacterial background. For sample # 2015323, two false-negative results were observed. With an amount of  $1 \times 10^6$  CFU/mL of *B. pertussis* target organisms, the false-negative results cannot be blamed on the lower limit of detection of appropriate test systems.

For the detection of *B. pertussis*, most participants used self-developed (in-house) test systems with inhibition and/or positive controls. According to our report files, 28 participating laboratories indicated the use of the IS481 insertion sequence, 14 the pertussis toxin coding gene, and 3 participants mentioned ribosomal genes as the PCR/NAT target region. Run controls were performed by all of the 153 participants, and no inhibition events were observed with the samples of the current distribution.

## RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained three samples with a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study in a kind of dilution series. Sample # 2015332 contained approximately  $5 \times 10^5$  CFU/mL, sample # 2015331 approximately  $5 \times 10^4$  CFU/mL, and sample # 2015334 approximately  $1 \times 10^3$  CFU/mL of the respective target organisms.

The availability of well-evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in two of the three *Helicobacter pylori*-positive samples (# 2015331 and # 2015332) as well as the reported results for the negative sample # 2015333 led to accuracy levels of 100%. Only for the very weak *Helicobacter pylori*-positive sample # 2015334 ( $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL), 8 false-negative results and one result classified as “questionable” were reported.

As noted in the description of RV 533, clarithromycin resistance testing in the examined *H. pylori* isolates could be performed by participants on a voluntary basis. This molecular resistance testing is usually based on amplification and sequencing of characteristic regions within the *H. pylori* 23S rDNA or the use of hybridization probe-based qPCR assays. Results for clarithromycin resistance were reported by 42 of the 51 participants. With two exceptions, all of the reported results were correct.

## RV 534: EHEC/STEC

As discussed before, the main challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but rather the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenicity (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of EQA samples contained three samples positive for EHEC: # 2015341 (*E. coli*,  $1 \times 10^5$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>-</sup>, *eae*<sup>-</sup>, *hlyA*<sup>-</sup> and O157<sup>-</sup>), # 2015343 (*E. coli*,  $5 \times 10^4$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup> positive and *eae*<sup>-</sup>), and # 2015344 (*E. coli*,  $1 \times 10^5$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup> positive). The other EHEC-negative sample contained an *eae*<sup>-</sup> and *hlyA*<sup>-</sup> negative *E. coli* K12 strain (# 2015342).

With the exception of sample # 2015343 (*stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup> positive EHEC isolate), the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in high accuracy rates for the two remaining samples. Consistently correct results were reported by 130 and 131 of the 132 participants, respectively. One of the simple reasons for false-negative results for the *stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup> positive EHEC isolate (# 2015343) is probably the missing coverage of “rare” Shiga toxin subtypes by the common spectrum of routinely applied PCR/NAT assays or commercial EHEC PCR test kits among the participating laboratories. It is well-known that the *stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup> encoding gene shows little if any homology to other Shiga toxin gene sequences [1]. This is impressively demonstrated by the inclusion of the *stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup> positive sample # 2015343, where only 79 of the 132 participants reported positive results for the presence of genes coding for Shiga toxins. Even if the relevance or the pathogenic potential of *stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup> positive EHEC isolates is still under dispute, their inclusion in the current EQA distribution could be classified as educational but not mandatory. Consequently, we have not scored those (false-)negative results for the *stx*<sub>2f</sub><sup>-</sup> positive sample # 2015343 in the course of issuing the corresponding

EQAS certificates. This is characterized by the three gray-shaded boxes in Table 2 (Attachment 1, p. 8).

Except for two false-positive results with the “negative” sample # 2015342 (containing an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain), which are presumably caused by carry-over from the strong-positive sample 201531, the majority of the remaining results reported by the 132 participants were correct.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of Shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test, most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained. Partial or complete Shiga toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 115 of the participating laboratories. Within the samples of the current distribution, all of the reported results were correct. None of the participants observed significant inhibition of the NAT reaction.

### RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

The current set of QC samples contained three samples with *B. burgdorferi* sensu stricto organisms in our proprietary matrix: sample # 2015351 ( $5 \times 10^5$  organisms/mL), sample # 2015353 ( $5 \times 10^4$  organisms/mL) and sample # 2015352 ( $5 \times 10^3$  organisms/mL). Sample # 2015354 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

With the exception of 3 false-negative results for sample # 2015352 (containing a relatively low amount of  $5 \times 10^3$  organisms/mL of *Borrelia* target organisms), all participants reported correct results for the four samples of the current EQAS distribution. The false-negative results should prompt re-evaluation of the assay sensitivity.

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

### RV 536: *Legionella pneumophila*

Due to numerous requests: this test is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols

for direct detection of low amounts of *Legionella pneumophila* from appropriate clinical specimen (such as respiratory specimens, for example). Individual samples may contain relatively small amounts of the corresponding target organism. For this reason, participation is promising only for diagnostic laboratories which have established a highly sensitive and specific PCR/NAT-based method for the detection of *L. pneumophila* DNA or who would like to evaluate their method with the help of an external quality control.

The current set of QC samples contained two positive samples with *Legionella pneumophila* serogroup 14 and serogroup 1, respectively (# 2015361,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL; and # 2015363,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), next to one sample containing *Legionella bozemanii* (# 2015364;  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL). Sample # 2015362 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ( $\sim 1 \times 10^5$  and  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) samples # 2015361 and # 2015363 were correctly tested positive by 119 of the 120 participating laboratories, respectively. Sample # 2015364, which contained  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL of *Legionella bozemanii*, was classified as false-positive by 11 of the participating laboratories. Observing false-positive *L. pneumophila* PCR results for non-pneumophila *Legionella* spp. should encourage the corresponding participants to review and optimize the analytical specificity of their “*L. pneumophila*-specific” assays and/or PCR protocols. It should be mentioned that 8 of the 11 affected laboratories mentioned the use of the commercial ampliCube Respiratory Bacterial panel (Mikrogen), which detect *Legionella* only on genus level. Consequently, we will consider to restrict the corresponding certificates on the detection of *Legionella* spp. only. All of the 120 participants indicated the use of internal or external inhibition controls in their assay concepts, and none of the investigated samples showed inhibition.

### RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained two samples with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (sample # 2015371 with  $1 \times 10^5$  CFU/ml, and sample # 2015372 with  $1 \times 10^4$  CFU/ml). No target organisms but only *E. coli* cells were present in samples # 2015373 and # 2015374.

Only one false-negative result was reported for the positive sample # 2015372, which contained a significant number of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium target organisms. For the remaining three samples, only correct-negative or -positive PCR/NAT results were reported among all of the 29 participating laboratories.

This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays and an improved procedure with regard to the prevention of contamination events during the individual sample preparation and PCR/NAT analytics in the participating diagnostic laboratories.

## RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained one sample without the corresponding target organisms (# 2015383, only *E. coli* cells), one sample positive for *L. monocytogenes* (# 2015381 with  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) and one sample with *Listeria ivanovii* (# 2015384 with  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) as a *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. The fourth sample (# 2015382) this time contained a *Streptococcus pneumoniae* strain ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL). The *Listeria monocytogenes*-containing sample (#2015381) was correctly reported positive by all but one of the 42 participating diagnostic laboratories. In addition, the “negative” *E. coli*-containing sample # 2015383 was correctly identified as negative by all participants. Thirty-seven of the 42 participants indicated the use of *Listeria monocytogenes*-specific PCR/NAT assays, which is reflected by the high number of “false-negative” results for sample # 2015384, containing  $1 \times 10^4$  CFU/mL of *Listeria ivanovii* organisms. However, as noted in the protocol booklet, participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT assays may indicate this fact in the electronic report form. 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 aim to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs. Consequently, 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. Despite of one sample containing an MSSA isolate together with a methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species and one sample containing a *mecC*-positive MRSA isolate, no “difficult” or “interesting” sample was included into the current panel. All 298 participants consistently reported correct results for 3 of 4 samples this time. Sample # 2015391 of the current set contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) and a CoNS strain (*S. epidermidis*, *mecA*-positive,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL). One sample of the current set (# 2015394) contained no target organisms but only *E. coli* cells. Sample # 2015392 contained a relatively high number of a ***mecC*-positive and methicillin-resistant** *S. aureus* isolate (MRSA, PVL-negative, spa:t10009;  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL), and sample # 2015393

contained a typical MRSA isolate (MRSA, PVL-negative,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL).

The MRSA-negative sample # 2015394 was correctly reported negative by 278 of 281 participants with their MRSA-specific PCR/NAT assays. Only three participants observed a false-positive result, which may probably have been caused by contamination with MRSA DNA during the sample preparation, amplification or detection. Fortunately, for the positive MRSA sample # 2015393, positive results were reported by nearly all of the 281 participants. Three false-negative results were reported, and one participant classified their results as “questionable”. Affected participants are encouraged to analyze and optimize their PCR/NAT-based assays, because the amount of MRSA target organisms ( $5 \times 10^4$  CFU/mL) was not abnormally low.

For sample # 2015391, which contained an MSSA isolate together with a Methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species, 252 of all 281 participants reported their results correctly as “MRSA-negative” and 8 participants classified the results as “questionable”. Five of these 8 participants indicated the use of test systems which are based on a separated detection of the *mecA* gene and *S. aureus*-specific target genes. In this case, 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 for these assays. The remaining 21 participants reported false-positive results for MRSA for sample # 2015391, containing a mixture of an MSSA isolate and a methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species. These participants are encouraged to analyze the suitability of their test systems, as the described constellation is a relatively common scenario for the molecular detection of MRSA in clinical swabs or other sample types. As depicted in Table 3 (Attachment 1, p. 14), most of the participants indicating the use of SCC*mec*-based PCR/NAT assays for the detection of MRSA reported correct (MRSA-negative) results for sample # 2015391.

The overall poor assay performance for MRSA-positive sample # 2015392 is quickly explained after taking a closer look at the genetic constellation of this particular clinical isolate: an *S. aureus* patient isolate, where the phenotypic resistance for Oxacillin is not encoded by the “usual” *mecA* gene but the genetically distinct *mecC* gene. These sporadically observed Oxacillin-resistant *S. aureus* strains harbor all commonly used genetic markers on the genome level, including the SCC*mec-orfX* region. But on the nucleotide sequence level, these MRSA strains clearly differ from isolates harboring the “popular” *mecA* gene in their genome and are carrying a resistance-mediating *mecC* gene instead with a strongly divergent gene sequence. The different nucleotide sequence inevitably lead to false-negative results for MRSA in all commercial or in-house SCC*mec*-based PCR test systems, which were not adapted to the detection of the *mecC* gene. As expected, the MRSA isolate in sample # 2015392 was only tested MRSA-positive by participants using PCR/NAT as-

says that have been “updated” for the inclusion of the *mecC* gene in the meantime. Even if such *mecC*-positive MRSA isolates are not frequently encountered in routine practice, this EQAS distribution should draw attention to the possible occurrence of such *mecC*-positive MRSA isolates.

Since the need to cover such MRSA isolates is still under dispute, their inclusion in the current panel is still classified as educational but not mandatory. Consequently, we have not scored those (false-)negative MRSA results in sample # 2015392 in the course of issuing the corresponding EQAS certificates. This is characterized by the three gray-shaded boxes in Table 2 (Attachment 1, p. 13). Overall, it should be noted that, again, a pleasingly large proportion of participants reported a correct result, predominantly correctly positive results for one positive sample and correctly negative findings for the 2 MRSA-negative samples. This indicates excellent sample workup that manages to avoid the risk of contamination and carry-over events through laboratory-specific prevention measures.

Also, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor **PVL (Panton-Valentine leukocidin)** or its coding gene *lukF/S-PV* was inquired. Corresponding results were reported by 87 of the total 281 participating laboratories, and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were correct in all but one case. Additional information can be found in Linde et al. [2] and Witte et al. [3]. A well-evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found in Reischl et al. [4].

In addition, a number of commercial real-time PCR assays reliably targeting PVL genes in MRSA and MSSA isolates are now available.

## RV 540: Chlamydia pneumoniae

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. pneumoniae* in typical (clinical) sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we intended to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory specimens. Consequently, 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 # 2015402 was spiked with  $\sim 5 \times 10^5$  IFU/mL of *C. pneumoniae*, whereas sample # 2015403 contained an approximately hundred-fold lower amount of *C. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^4$  IFU/mL). Sample # 2015404 contained significant numbers of

*Haemophilus influenzae* ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL). Only *E. coli* and human cells were present in sample # 2015401.

As depicted in Table 2 (Attachment 1, p. 15), all of the 138 current participants reported correct positive results for the very strong positive *C. pneumoniae* sample # 2015402 ( $5 \times 10^5$  IFU/mL) and also for sample # 2015403, which contained an approximately fifty-fold lower number of target organisms. For both of the *C. pneumoniae*-negative samples in the current distribution, # 2015401 and # 2015404 (where the latter sample contained significant amounts of *Haemophilus influenzae*, which in a sense represents an assay specificity challenge), all but one laboratories reported correct-negative results. The single sporadically observed false-positive result could be due to simple (cross-)contamination events in the course of sample processing and extraction. From the methodical point of view, a severe cross-reactivity of *C. pneumoniae*-specific NAT/PCR assays with *H. influenzae* DNA seems to be unlikely. This false-positive result, however, may prompt investigations and improvement of the preanalytical workup, assay concepts and/or the diagnostic workflow.

## RV 541: Mycoplasma pneumoniae

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

The current set of QC samples contained two *M. pneumoniae*-positive samples.

A relatively high amount of *M. pneumoniae* ( $\sim 5 \times 10^5$  genome copies/mL) was present in sample # 2015411, and an approximately hundred-fold lower amount of *M. pneumoniae* ( $\sim 5 \times 10^3$  genome copies/mL) was present in sample # 2015414. Sample # 2015413 was designed to monitor assay specificity: it contained a considerable amount of *Chlamydia pneumoniae* organisms ( $\sim 5 \times 10^5$  IFU/mL). The set was completed by sample # 2015412, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

As observed during the past distributions of our EQAS scheme for *Mycoplasma pneumoniae* PCR/NAT detection, the availability of well-established commercial or in-house PCR/NAT assays has led to a high percentage of correct results. Among the *M. pneumoniae*-specific results reported by the 160 participants, all but 2 laboratories reported

correct-positive results for the relatively high positive sample # 2015411, and all but 6 participants reported correct-positive PCR/NAT results for the approximately hundred-fold weaker *M. pneumoniae*-positive sample # 2015414.

Sample # 2015413, which contained  $5 \times 10^5$  IFU/mL of *Chlamydia pneumoniae*, was tested correctly negative by 153 of the 160 participants. Six participants reported false-positive results for the *C. pneumoniae* sample, which could be due to shortcomings in analytical specificity or just cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. The affected laboratories are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the analytical specificity of their PCR/NAT assays. Likewise, this hint holds true for the 6 participants who reported false-positive results for sample # 2015412 of the current set (no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells). With the exception of one participant, who indicated inhibition events with all 4 samples, no other noticeable problems were experienced with the current set of QC samples, and a good overall correlation with the expected results was observed.

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

A general note to our participants: the concept of this external quality assessment scheme (EQAS) 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. Consequently, 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 EQAS samples (Table 1, Attachment 1, p. 17) contained two samples with different amounts of *C. burnetii* organisms ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL in sample # 2015423 and  $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL in sample # 2015421), one sample with  $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL of *B. anthracis* strain UR-1 (sample # 2015421) and one sample with  $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL of a *B. anthracis* **STI vaccine strain** (sample # 2015424). Sample # 2015422 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 organism 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***: The relatively high amount ( $1 \times 10^5$  genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 2015421 was correctly reported by all of the current participants. The ten-fold lower concentration of target

organisms in sample # 2015423 was correctly identified as “positive” by 47 of the 48 participating laboratories. The two “negative” samples (#2015422 contained only *E. coli*, and # 2015424 contained only *B. anthracis*) were correctly reported as negative by all but two participants, and two participants classified their results as “questionable”. Laboratories who reported false-positive results for the latter two samples, which could be due to shortcomings in analytical specificity or just cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps, are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the analytical specificity of their PCR/NAT assays.

Overall, there were no noticeable problems with the current set of EQAS samples, and a good correlation with the expected results was observed.

***Bacillus anthracis***: All participants correctly reported negative results for the samples # 2015422 and # 2015423 which did not contain *B. anthracis* target organisms. The positive sample # 2015424 containing  $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL of *B. anthracis* strain Sti was correctly reported by all of the 27 participating laboratories. This particular strain is positive for the *B. anthracis*-specific markers *rpoB* (or *dhp61*) and *pagA* and also contains the “protective antigen, lethal and edema factor” encoding plasmid pXO1, but not the virulence plasmid pXO2.

The second positive sample # 2015421 ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL of *B. anthracis* patient strain UR-1) was correctly reported by all but one of the 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 program coordinator (U. Reischl).

## RV 543: *Francisella tularensis* & *Brucella* spp.

A 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 aim to mimic the situation of processing typical clinical samples. Consequently, 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 EQAS samples (Table 1, Attachment 1, p. 19) contained two samples with different amounts of *F. tularensis* subsp. *tularensis* DNA ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL in sample # 2015433 and  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL in sample # 2015434), two samples with different amounts of *B. melitensis* DNA ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL in sample # 2015432 and  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL in sample # 2015434). Sample

# 2015431 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

**Francisella tularensis:** Similar to many of the past distributions, the positive samples # 2015433 ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL of *F. tularensis* subsp. *tularensis*) and # 2015434 ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL of *F. tularensis* subsp. *tularensis*) were correctly tested positive by all of the 33 participating laboratories, respectively. As a notable improvement to some of our previous EQAS distributions, also the *F. tularensis*-negative samples # 2015431 and # 2015432 were consistently reported as negative by all of the current participants. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *F. tularensis*-specific PCR assays and an obvious improvement with regard to preventing carry-over or other contamination events during the individual sample preparation and PCR/NAT analyses in the participating diagnostic laboratories. All laboratories indicated the use of appropriate internal or external inhibition controls in their assay concepts, and none of the investigated samples showed inhibition.

**Brucella spp.:** In accordance to the previously discussed result constellation of *F. tularensis*-specific NAT/PCR assays, the *B. melitensis*-positive samples # 2015432 and # 2015434 as well as the *B. melitensis*-negative samples # 2015431 and # 2015433 were correctly reported by the 30 participating laboratories within the current distribution of RV 542. None of the participants observed an inhibition of the nucleic acid amplification. Overall, there were no noticeable problems with the current set of EQAS samples, and a good correlation with the expected results was observed.

## 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 *Enterobacteriales* culture isolates.

As shown in Table 1 (Attachment 1, p. 21), the current set contained three samples with different carbapenem-resistant *Enterobacteriales*: sample # 2015441 contained *Klebsiella pneumoniae* with an OXA-232 gene ( $\sim 1 \times 10^7$  genome copies/mL), sample # 2015442 contained cultured organisms from the *Enterobacter cloacae* complex with an IMI-2 gene ( $\sim 1 \times 10^7$  genome copies/mL), sample # 2015444 contained an NDM-1-positive *Serratia marcescens* isolate ( $\sim 1 \times 10^7$  genome copies/mL). The fourth sample # 2015443 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes.

All but two participating laboratories reported sample # 2015441 and sample # 201544 as “carbapenemase-positive”. The third “positive” sample # 2015442 (*Enterobacter cloacae* complex with an IMI-2 gene) was correctly reported by only 14 of the 89 participants. Apparently, most of the assays currently used for molecular detection of carbapenemase genes lack this IMI-2 target.

Consequently, we have not scored those (false-)negative results for the IMI-2 gene in sample # 2015442 in the course of issuing the corresponding EQAS certificates. This is characterized by the three gray-shaded boxes in Table 2 (Attachment 1, p. 21). This limitation should be kept in mind, however, when discrepancies between phenotypic and molecular testing of carbapenem susceptibility arise. **IMI-2 belongs to the group of serine-carbapenemases** and is predominantly found in *Enterobacter* spp. Its number has increased over the past few years in Germany and it is often associated with a colistin resistance.

For sample # 2015443, which contained carbapenemase-negative *E. coli* K12, two false-positive and one questionable result were reported.

## RV 545: Clostridium difficile

A 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 aim to mimic the situation of processing typical clinical samples. The lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained three *Clostridium difficile*-positive samples: sample # 2015452 with  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL, sample # 2015453 with  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL, and sample # 2015451 with  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL. Sample # 2015454 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. The samples # 2015452 and # 2015453 containing relatively high amounts of *C. difficile* ( $5 \times 10^5$  CFU/mL and  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) were correctly reported as “positive” by 179 and 177 of the 181 participating laboratories, respectively. False-negative results should prompt a thorough evaluation of the test system and the workflow. The latter is definitely warranted for the participant reporting a false-positive result for sample # 2015454, containing only *E. coli*, but no target organism. A cross-reaction of the applied test system with *E. coli* DNA is unlikely; probably cross-contamination during the process of sample preparation and analysis is causative. Sample # 2015451 with the lowest amount of target organisms ( $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL) was correctly identified as positive by 177 participants. Again a false-negative result should prompt re-assessment of the sensitivity of the used test system. All but 2 participants included appropriate controls to monitor DNA extraction and/or detect inhibition of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

## RV 546: VRE

A 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 aim to mimic the situation of processing typical clinical samples. Consequently, 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 # 2015464 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecium* vanA ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), and sample # 2015461 contained an approximately five-fold higher amount of *Enterococcus faecium* vanB ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL). Sample # 2015463 contained *Enterococcus faecalis* ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), and sample # 2015462 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

All of the 68 participating laboratories correctly reported positive results for sample # 2015464. The second 'positive' sample (# 2015461) was correctly classified by 65 participants. Of note, the reported dedicated vanA/vanB identifications for these two samples were with a single exception correct. Compared to previous EQAS distributions, the number of false-positive results for the 'negative' samples (# 2015462 and # 2015463) increased. All but one participant included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory 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. Making some helpful experiences during the pilot phase of two previous distributions, we are starting with our first "regular distribution" in the current round.

Regarding the statistical analysis, data presentation and results discussion, 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 88 participants are depicted in Tables 2 to 9 (Attachment 1, p. 24–28), and a good overall correlation between the expected results (Table 1, Attachment 1, p. 24) and the reported results was observed. Briefly, only sporadic false-negative or false-positive results were observed. For example, false-positive *Trichomonas vaginalis* DNA and *Gardnerella vaginalis* DNA results were reported by one participant for sample # 2015474 of the current 4-sample set, which could probably be due to cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. The online results input mask of RV 547 distributions now contain extra fields where participants should specify the theoretical pathogen spectrum of their individual assay concepts. This extra information will help

to consider and fairly assess the broad spectrum of different commercial and in-house PCR/NAT assays regarding species coverage, differentiation and multiplex capabilities.

## RV 560: Pneumocystis jirovecii

A 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 *P. jirovecii* DNA** in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials, we aim to mimic the situation of processing typical clinical samples. Consequently, 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 (Table 1, Attachment 1, p. 29). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ( $\sim 1 \times 10^5$  organisms/mL) was present in sample # 2015601, and an approximately ten-fold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ( $\sim 1 \times 10^4$  organisms/mL) was present in sample # 2015604. The set was completed by *P. jirovecii*-negative samples # 2015602 and # 2015603, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms next to the lyophilization matrix. Sample # 2015601 of the current distribution, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ( $\sim 1 \times 10^5$  organisms/mL), and sample # 2015604 with a ten-fold lower concentration of *P. jirovecii*, were classified as "positive" by 117 and 107 of the 118 participating laboratories, respectively. Observing false-negative results, which could be due to a loss of template DNA during pre-analytical sample preparation procedures or limited analytical sensitivity of the entire PCR/NAT workflow, should encourage the affected laboratories to check their individual procedures for overall diagnostic sensitivity. Two laboratories reported a false-positive result for sample # 2015602, and one laboratory for sample # 2015603, both containing no target organisms but only *E. coli* cells and our sample matrix. All but one of the participants included appropriate DNA extraction and PCR inhibition controls. Significant inhibitory events were not reported.

Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples, and a good correlation with the expected results was observed.

## Attachments

Available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2021-12/lab000041.shtml>

1. Anhang1\_lab000041.pdf (463 KB)  
Results of the proficiency testing scheme "Bacterial and fungal genome detection (PCR/NAT)" May 2020

## References

1. Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschäpe H. Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol.* 2009 Jun;299(5):343-53. DOI: 10.1016/j.ijmm.2008.10.008
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem Staphylococcus aureus: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant Staphylococcus aureus: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, 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):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive Staphylococcus aureus by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

### Corresponding author:

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

### Please cite as

Reischl U, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttlar H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2020 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab.* 2021;12:Doc01. DOI: 10.3205/lab000041, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000414

### This article is freely available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2021-12/lab000041.shtml>

**Published:** 2021-03-08

### Copyright

©2021 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/>.