

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 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 Reischl¹
Martin Ehenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Michael Baier³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
Rosina Ehmann⁴
Holger Scholz⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Roger Dumke⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Agnes Anders⁸

- 1 Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland
- 2 Labor Dr. Heidrich und Kollegen MVZ GmbH, Hamburg, Deutschland
- 3 Institut für Medizinische Mikrobiologie, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland
- 4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland
- 5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland
- 6 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Technische Universität Dresden, Deutschland

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

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Nach erfolgreicher Etablierung dieser neuen Ringversuchserie 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.

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 den neuen Ringversuch RV 547 „Urogenital-Panel“ routinemäßig etabliert, der vom Konzept her jeweils einige der nachfolgenden Erreger in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen innerhalb des 4er-Panels enthält: *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 71 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.

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-Dateien zum freien Download bereit.

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

Die meisten dieser Assays sind zudem auch noch IVD-zertifiziert – mit allen aufwändigen herstellerseitigen Vorkehrungen zur möglichst zuverlässigen Durchführung und standardisierten Ergebnisinterpretation. Die auffällige „Streuung der Performance“ (bzw. das Auftreten einzelner Ausreißer) unterstreicht umso mehr die Bedeutung der

aktuell vorgegebenen Qualitätsstandards, wie beispielsweise das regelmäßige Mitführen von geeigneten Extraktions-, Positiv- und Negativ-Kontrollen sowie Schulungen und kontrollierte Maßnahmen zur Vermeidung von exogenen Kontaminationsmöglichkeiten in PCR/NAT-Arbeitsbereichen, die u.a. im Rahmen der aktuellen RiLiBÄK, der Akkreditierung und der praxisorientiert verfassten MIQ-1 gefordert werden. Deren Sinnhaftigkeit und Stringenz mag aus Anwendersicht ja gelegentlich bezweifelt werden, wird aber in diesen Ringversuchsrunden (sozusagen von neutraler Warte aus) dennoch immer wieder aufs Neue bestätigt.

Neben den überaus motivierten und engagierten Mitarbeitern der verschiedenen Sollwert-Laboratorien unterstützen uns bei der Konzeption und Auswertung der zahlreichen Ringversuche zum Bakterien- und 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 November 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 an den folgenden Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 2025304), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 2025402), *Helicobacter pylori* (Probe # 2025334) sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 2025413).

Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Austestung 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).

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.

So wurde beispielsweise im aktuellen **RV 539 MRSA/cMRSA** eine der vier Proben mit einem **MRSA**-Patientenisolat versetzt, das zwar alle PCR-detektionsrelevanten Segmente der *SCCmec*-Genkassette enthielt, dem aber auf Genomebene der bei *Staphylococcus aureus*-Stämmen „übliche“ Speziesmarker pSA442 fehlte. Erfreulicherweise konnte diese eher untypische MRSA-Variante in der aktuellen Ringversuchsrunde von nahezu 90% aller Teilnehmer mit ihren MRSA-spezifischen PCR-Testsystemen erfasst und korrekt als MRSA befundet werden. Die methodischen Limitationen aufgrund der Sequenzvielfalt bei bestimmten Speziesmarker- und resistenzvermittelnden Genen bestätigt 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 **Borrelia burgdorferi**-Panels im aktuellen **RV 535**. Neben zwei „normalen“ *Borrelia valaisiana*- und *Borrelia garinii*-Isolaten wurde auch die derzeit selten beobachtete Spezies **Borrelia hispanica** ausgesandt. Diese Spezies, die früher auch *Spirochaeta hispanica* genannt wurde und als Erreger des spanischen Rückfallfiebers bzw. Zeckenrückfallfiebers gilt, wurde im aktuellen Ringversuch von ca. 15% der Teilnehmer fälschlicherweise als PCR/NAT-positiv für *B. burgdorferi* sensu lato getestet und befundet.

In jeweils einer der 4 Einzelproben der aktuellen Ringversuche **RV 530: CT/GO**, **RV 533: Helicobacter pylori** und **RV 541: Mycoplasma pneumoniae** 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 GES-5** zu gelten, die plasmidcodiert ist, üblicherweise in *Acinetobacter* spp. gefunden wird, und deren Nachweisrate in den letzten Jahren auch bei anderen Enterobacterales wie auch in *Pseudomonas aeruginosa* zugenommen hat. Das Isolat aus dem *Enterobacter freundii*-Komplex mit GES-5-Gen wurde aktuell lediglich von 21 der insge-

samt 80 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.

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.

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.

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

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 drei Proben mit *C. trachomatis*-Organismen: Probe # 2025303 und # 2025302 mit $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL und Probe # 2025304 mit $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL. Diesmal waren ebenfalls 3 der 4 Einzelproben mit unterschiedlichen Mengen an Gonokokken versetzt: Probe # 2025303 mit $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL, Probe # 2025301 mit $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL und Probe # 2025304 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, Anhang 1, S. 1: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei CT; Tabelle 4, Anhang 1, S. 2: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei NG; jeweils gefolgt von den Richtigkeitsquoten nach aufgeführten Testsystemen in den Tabellen 3 und 5, Anhang 1, S. 2–3).

Auch wenn die etwas schwächer positive Probe # 2025304 des aktuellen Ringversuchs nur mit ca. 5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 239 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* diesmal nahezu durchweg richtig-positive Ergebnisse. Bei den beiden ca. 5- und 10-fach stärker CT-positiven Proben # 2025302 und # 2025303 des aktuellen Probensets wurden ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern richtig-positive Ergebnisse beobachtet. Lediglich ein Teilnehmer berichtete bei der Probe # 2025303 ein falsch-negatives Ergebnis, und ein Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis für die Probe # 2025303 als „fraglich“. Für die *C. trachomatis*-negative Probe # 2025301 wurden aus dem gesamten Teilnehmerfeld ebenfalls nur 3 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 dem falsch-negativen und den drei falsch-positiven Ergebnissen vermutlich um ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die drei positiven Proben # 2025301, # 2025303 und # 2025304 (*N. gonorrhoeae*; ca. 5×10^3 , ca. 5×10^4 und ca. 5×10^2 CFU/mL) diesmal von den insgesamt 239 Teilnehmern 12 falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA bei der relativ schwach positiven Probe # 2025304 sowie 4 falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA bei Probe # 2025301 und bei der deutlich stärker positiven Probe # 2025303 mitgeteilt. Bei der GO-negativen Probe # 2025302 wurden von 3 der insgesamt 237 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse berichtet. Dieser im Vergleich zu früheren Ringversuchsrunden doch überraschend hohe Anteil an falsch-positiven Ergebnissen deutet auf Kontaminationsereignisse oder wie auch immer geartete Template-Nukleinsäure-Verschleppungen bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung hin; vor allem, weil im aktuellen 4er-Set die GO-negative Probe # 2025302 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 5×10^2 CFU/mL doch relativ geringen Menge an Zielorganismen wurden die negativen PCR/NAT-Ergebnisse bei der GO-positiven Probe # 2025304 diesmal bei der Erstellung der Zertifikate nicht als „falsch-negativ“ gewertet.

Bei der GO-positiven Probe # 2025303 sollten falsch-negative oder als „fraglich“ klassifizierte 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. 5×10^2 CFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial der Probe # 2025303 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 November 2020 den Teilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität wieder geeignete Sets zur Überprüfung und Optimierung ihrer jeweiligen NAT-gestützten Testsysteme zur Verfügung.

Ich glaube, es ist auch für den Leser dieser Ringversuchsdiskussion weitgehend nachvollziehbar, dass wir als Organisatoren von Testkonzept- und Testplattform-übergreifenden Ringversuchen bei der Konfektionierung unserer Probenmaterialien leider nicht jede Besonderheit im Abarbeitungsprotokoll von kommerziellen Testsystemen berücksichtigen oder unterschiedliche Arten von 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-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA, Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und

getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden.

Aktuell wurden die *C. trachomatis*-Zielorganismen von allen 11 Teilnehmern mit RNA-basierten Hologic-Testsystemen in den drei CT-positiven Proben erfolgreich nachgewiesen. Auch in den stärker GO-positiven Proben # 2025301 und # 2025303 gelang nahezu allen Teilnehmern mit RNA-basierten Hologic-Testsystemen der erfolgreiche Nachweis der *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen. Nur bei der sehr schwach GO-positiven Probe # 2025304 (in der zusätzlich noch nennenswerte 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 und zudem die Probe # 2025304 nicht mit in die Bewertung einging, werden diesmal alle 11 Teilnehmer die entsprechenden Zertifikate ausgestellt bekommen.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen der insgesamt 239 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit den kommerziellen CT/NG-spezifischen PCR/NAT-Assays von Hologic, Seegene, Bruker-Hain, BD, Roche, Abbott, Mikrogen, TIB Molbiol 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 der Ergebnisformulare wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: BD ProbeTec (4x), GeneProof *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (3x), Qiagen artus CT/NG QS-RGQ Kit (3x), AID RDB 2110 STD (2x), AID RDB 2335 STI (1x), Abbott Alinity m STI Assay (2x), Amplex eazyplex STD complete (2x), Seegene Anyplex II STI-7 Detection (2x), BIORON diagnostics RealLine *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* (2x), EUROIMMUN EUROArray STI (4x), SIEMENS VERSANT kPCR CT/GC (1x), Diagenode S-DiaCTNG/S-DiaCT/S-DiaGono (1x), Goffin Presto CT/NG Assay (1x), AusDiagnostics Urinogenital and Resistance (1x), Anatolia Gene works (1x), AmpliSens *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*-screen FRT PCR kit (1x) und AB Analytica (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 zwei Proben mit ca. 5×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 2025313 und # 2025311), eine Probe mit ca. 5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 2025312), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2025314), 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 51 Teilnehmern bei allen drei positiven Proben (# 2025311, # 2025312 und # 2025313) diesmal durchweg korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Auch bei der *C. trachomatis*-negativen Probe # 2025314 wurden diesmal von allen Teilnehmern durchweg richtig-negative 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.

Inhibitionskontrollen wurden von allen 51 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse 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. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf erfreulich hohem Niveau.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurden hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die folgenden Testsysteme aufgeführt: EUROIMMUN EUROArray STI (2x), HOLOGIC Aptima Combo 2 assay CT (2x), Roche COBAS 4800 CT (1x), Roche COBAS 6800 CT (1x), Diagenode S-DiaCT (1x), Qiagen artus CT (1x), Abbott RealTime CT (1x), AID RDB 2110 STD (1x), Sansure Biotech (1x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-

TM (1x), Seegene Allplex CT/NG/MG/TV Assay (1x) und Seegene Allplex STI Essential (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 (# 2025321 mit 5×10^5 CFU/mL und # 2025324 mit 5×10^4 CFU/mL an *B. pertussis*), sowie eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella holmesii* als verwandte Spezies (# 2025323 mit 5×10^4 CFU/mL). Die Probe # 2025322 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanem Zellmaterial. Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA führte diesmal erneut sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben zu relativ hohen Richtigkeitsquoten.

Der spezifische Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in den beiden Proben # 2025322 und # 2025324 bereitete den insgesamt 146 Teilnehmern offenbar keine allzu großen Schwierigkeiten. Lediglich von einem Teilnehmer wurde hier ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe # 2025321 berichtet, und je ein Teilnehmer beobachtete bei Probe # 2025324 ein falsch-negatives Ergebnis bzw. klassifizierte seinen Befund als „fraglich“. Für die negative Probe # 2025322 des aktuellen Sets wurden ebenfalls überwiegend korrekt-negative Ergebnisse mitgeteilt. Lediglich 2 der insgesamt 146 Teilnehmer beobachteten mit ihren *B. pertussis*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen hier ein falsch-positives Ergebnis, was eventuell mit Kreuzkontaminationen oder wie auch immer gearteten Template-Nukleinsäure-Verschleppungen bei der Probenabarbeitung erklärbar sein könnte.

Im RV 532 befand sich diesmal wieder ein IS481-positives *Bordetella holmesii*-Isolat, das (Methoden- bzw. Zielsequenz-bedingt) mit vielen der *B. pertussis*-spezifischen NAT-Testsysteme kreuzreagierte. Diese Problematik spiegelt sich beispielsweise in einer Veröffentlichung aus Frankreich wider [1]. Insgesamt betrachtet scheint aber der Vorteil einer hochsensitiven Detektion von *B. pertussis* und *B. holmesii* über die Verwendung der repetitiven IS481-Zielsequenz die Nachteile einer (eher aus akademischer Sicht wünschenswerten) Differenzierungsmöglichkeit zwischen den beiden Spezies in der PCR-Routine diagnostik mehr als aufzuwiegen. Zudem scheint in unseren Breiten *B. holmesii* eher selten aufzutreten [2] und Infektionen mit beiden Spezies scheinen eine gleichermaßen „behandlungsbedürftige“ Symptomatik hervorzurufen. Eine Abgrenzung zu den übrigen (IS481-negativen) *Bordetella*-Spezies muss jedoch aus diagnostischer Sicht stets gewährleistet sein. Angesichts der sehr hohen Richtigkeitsquote für die beiden *B. pertussis*-positiven Proben und der technisch bzw. methodisch bei der Verwendung der IS481-Zielsequenz zu erwartenden Kreuzreaktion mit dem aktuellen *B. holmesii*-Isolat in Probe # 2025323 haben wir uns (wie auch bei vergleichbaren Konstellationen in vorhergegangenen Ringversuchs-

runden) dazu entschlossen, bei der Erteilung der Zertifikate die falsch-positiven Ergebnisse bei *B. holmesii* nicht als falsch zu bewerten. Dies ist u.a. an der grauen Schraffierung aller 3 Felder in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 5) zu erkennen.

Die 2 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der *B. pertussis*-negativen Probe # 2025322 sollten jedoch intensiv daran arbeiten, die Kontaminationssicherheit und/oder die analytische Spezifität ihrer jeweiligen Testsysteme zu verbessern. Inhibitionskontrollen wurden von 145 der insgesamt 146 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden bei dem aktuellen Probenet bei keinem der Teilnehmer innerhalb der jeweils ausgesandten vier Einzelproben beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: AmpliGnost *B. pertussis*/*B. parapertussis* (3x), Altona diagnostics RealStar Anthrax (3x), Luminex ARIES Bordetella Assay (2x), ARGENE Bordetella r-gene (2x), AID RDB 2200 *B. pertussis* (1x), Diagenode R-DiaBorM (1x), AusDiagnostics (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), VIASURE Bordetella Real Time PCR Detection Kit (1x), DiaSorin (1x), BioFire FILMARRAY Respiratory Panel 2.1plus (1x), Bio-Speedy Real-Time PCR Detection Kit (1x), Master diagnostica (1x) und Gerbion Diarella Bordetella (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 7) dargestellt, enthielt Probe # 2025331 des aktuellen Ringversuchs eine relativ hohe Menge an Clarithromycin-resistenten *H. pylori*-Zielorganismen ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Probe # 2025333 und # 2025334 enthielten eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter salomonis* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 2025334 eine Mischung aus *Helicobacter acinonyx* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) und einer kleinen Menge an Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). Probe # 2025332 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden sowohl die mit einer relativ hohen Menge an *H. pylori*-Zielorganismen versetzte Probe (# 2025331) als auch die negative Probe # 2025332 nahezu von allen der insgesamt 45 Teilnehmer korrekt befundet. Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Im aktuellen Ringversuch wurde zudem die analytische Spezifität der verwendeten Testsysteme durch die Probe # 2025333 überprüft, welche mit *Helicobacter salomonis* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) eine „non-pylori“-*Helicobacter*-Spezies enthielt. Für diese Probe wurden 5 falsch-positive Ergebnisse berichtet, wobei diese bei betroffenen Anwendern zum Anlass genommen werden sollten, die Speziespezifität der jeweils eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zu überprüfen.

Probe # 2025334 enthielt diesmal eine entsprechend verdünnte Kultursuspension der „on-pylori“-Spezies *Helicobacter acinonyx* (mittlerweile auch bekannt als *H. aci-*

nonychis). Nach der erstmaligen Anzucht dieser Spezies aus Magenbiopsien eines vermutlich daran verstorbenen Tigers und Erstbeschreibung im Jahre 1998 wurde die Kultur in unsere Stammsammlung eingepflegt. Offenbar wurde die damalige Reinkultur trotz sorgfältigster mikrobiologischer Arbeitsweise innerhalb der letzten 20 Jahre mit Spuren eines *H. pylori*-Isolats kontaminiert, das im Rahmen unserer zahlreichen PCR-Untersuchungen bei der Ringversuchsproben-Konfektionierung überraschend auftauchte und sich als solches charakterisieren ließ. Trotz seines relativ geringen Anteils neben deutlich höheren Mengen an *H. acinonyx* konnte es dennoch von 37 der insgesamt 45 Ringversuchsteilnehmer in der Probe # 2025334 nachgewiesen werden.

Inhibitionskontrollen wurden von allen 45 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden dabei nicht beobachtet oder berichtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: MOBIDIAG Amplidiag *H. pylori* + ClariR (1x) und Sacace Biotechnologies *H. pylori* Real-TM (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 42 der insgesamt 45 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines der mitgeteilten Ergebnisse war die molekulare 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 Enterohämolsin kodierende *hlyA*-Gen).

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei gleiche und relativ starke EHEC-positive Proben: mit ca. 5×10^4 CFU/mL # 2025342 und mit ca. 1×10^4 CFU/mL # 2025343 (*E. coli*, *stx*₁⁻, *stx*₂⁻, *eae*⁻, *hlyA*- und O157-positiv) und eine Probe mit $\sim 10^4$ CFU/mL eines *Shigella sonnei*-Isolats (# 2025341). Probe # 2025344 enthielt einen *E. coli*-Stamm (*eae*⁻, *hlyA*-negativ).

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs waren keine „exotischen“ Shiga-Toxin-Gene vertreten, sodass, begründet auf die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten PCR/NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC, bei

allen Proben durchweg hohe Richtigkeitsquoten – sowohl für positive als auch für negative Befunde – beobachtet werden konnten. Bei den beiden EHEC-positiven Proben # 2025342 und # 2025343 wurden von 126 bzw. 125 der insgesamt 127 Teilnehmer richtig-positive EHEC-Befunde berichtet. Bei der positiven Probe # 2025342 wurden lediglich von einem Teilnehmer und bei der positiven Probe # 2025343 von 2 Teilnehmern falsch-negative PCR-Ergebnisse für EHEC/STEC beobachtet. Auch die Probe # 2025344 (*E. coli* K12-Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde von allen Teilnehmern bis auf zwei korrekterweise als negativ befundet.

Eine der vier Proben (# 2025341) war diesmal mit einer nennenswerten Menge an *Shigella sonnei* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) versetzt und auch hier wurden von 119 der insgesamt 127 Teilnehmer negative PCR/NAT-Ergebnisse für EHEC/STEC beobachtet. 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 den traditionellen Inhouse-Testsystemen werden auch hier zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle PCR/NAT-Assays eingesetzt. In Anbetracht der insgesamt relativ hohen Richtigkeitsquoten können aktuell keine großen Unterschiede innerhalb dieser Testkonzepte ausgemacht werden.

Zudem wurden von 108 Teilnehmern die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin (*eae*)- und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt. Lediglich von zwei Teilnehmern wurden in der aktuellen Ringversuchsrunde falsche Ergebnisse für die Feintypisierung berichtet. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: BD MAX Enteric Bacterial Panel (3x), Amplex eazyplex EHEC basic (2x), BioMerieux BioFire GI Panel (2x), Seegene Allplex GI-EB Screening (2x), Seegene Seeplex Diarrhea-B1 (1x), AmpliSens Escherichiosis FRT PCR kit (1x), Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (1x), MIKROGEN ampliCube Gastrointestinal Bacterial Panel 2 (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit (1x) und Fast Track DIAGNOSTICS FTD Bacterial gastroenteritis (1x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

Spezifität fokussieren. Daher wurden bei der Konzeption des Ringversuchs diesmal drei unterschiedliche Borrelien-Spezies an die Teilnehmer versandt. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit ca. 5×10^4 Organismen/mL an *Borrelia valaisiana* (# 2025351), eine Probe mit ca. 5×10^4 Organismen/mL an *Borrelia garinii* OspA Typ 3 (# 2025353) und eine Probe mit ca. 1×10^5 Organismen/mL an *Borrelia hispanica* (# 2025354). Probe # 2025352 enthielt lediglich eine relativ hohe Menge an *Treponema phagedenis* ($\sim 10^5$ Organismen/mL).

Nochmals eine **kurze Rekapitulation**: Schon die Tatsache, dass mittlerweile mehr als 20 verschiedene dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörige Spezies beschrieben sind, impliziert erhebliches Problempotenzial für den PCR-/NAT-gestützten Nachweis von *B. burgdorferi*. *B. garinii* ist eine seit Langem bekannte, gesichert humanpathogene Spezies, die weit verbreitet in Europa und Asien vorkommt und auch häufig bei disseminierten Infektionen gefunden wird. Für die vor mehr als 20 Jahren beschriebene *B. valaisiana* ist eine Humanpathogenität nicht gesichert. Obwohl diese Spezies regelmäßig in Ixodes-Zecken aus Europa und Asien nachweisbar ist, existiert bislang kein einziges Isolat aus Humanproben. Lediglich vereinzelte Nachweise dieser Spezies mittels PCR aus Humanmaterial schließen die Humanpathogenität nicht sicher aus.

Dagegen gilt die Borrelienspezies *B. hispanica*, die früher auch *Spirochaeta hispanica* genannt wurde, als Erreger des spanischen Rückfallfiebers bzw. Zeckenrückfallfiebers. Diese aktuell in Spanien und Nordafrika beheimatete Rückfallfieber-Borreliose wurde in jüngerer Zeit selten als Erreger humaner Erkrankungen nachgewiesen und ist bei uns nur von differentialdiagnostischer bzw. reisemedizinischer Bedeutung.

Einmal mehr muss in diesem Zusammenhang vor der nicht zu empfehlenden Untersuchung von Zecken, um daraus eine Therapieindikation abzuleiten, gewarnt werden: Abgesehen davon, dass die Studienlage keinen signifikanten Informationsgewinn für die Patientenversorgung erwarten lässt, sind diese Untersuchungen ohne weitergehende Identifikation der nachgewiesenen Spezies schlicht als gefährlich für den Patienten einzustufen, nicht zuletzt da die Angabe „*B. burgdorferi* s.l. nachgewiesen“ grundsätzlich auch nicht-humanpathogene Arten mit einschließt und somit unnötige und potenziell gefährliche therapeutische Interventionen nach sich zieht.

Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen: Der zuverlässige Nachweis von *Borrelia garinii* in der Probe mit relativ hoher Erregerlast (# 2025353 mit $\sim 5 \times 10^4$ Organismen/mL) bereitete nahezu keinem der 98 Teilnehmer signifikante Probleme. Da hier von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei dem einen falsch-negativen Ergebnis vermutlich um einen ringversuchstypischen „sporadischen Ausreißer“.

Auch für die negative Probe # 2025352, die lediglich eine relativ hohe Menge an *Treponema phagedenis* enthielt,

wurde diesmal von allen Teilnehmern ein korrekt-negatives PCR/NAT-Ergebnis berichtet. Für die beiden übrigen Proben # 2025351 (*Borrelia valaisiana*, 5×10^4 Organismen/mL) und # 2025354 (*Borrelia hispanica*, 1×10^5 Organismen/mL) wurden jedoch deutlich höhere Raten an falschen PCR/NAT-Ergebnissen beobachtet.

Die *B. valaisiana*-Zielorganismen konnten dabei nur von 91 der insgesamt 98 Teilnehmer mit ihren *B. burgdorferi*-spezifischen Testsystemen erkannt werden, und beim Vorliegen von nennenswerten Mengen an *Borrelia hispanica* lieferten die PCR/NAT-Testsysteme von 15 Teilnehmern offenbar ein (falsch-)positives Ergebnis für *B. burgdorferi*-DNA, und ein Teilnehmer klassifizierte seinen Befund als „fraglich“. Zumindest bei Probe # 2025351 (*B. valaisiana*) sollten falsch-negative Ergebnisse den betroffenen Teilnehmern Anlass zur gelegentlichen Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Möglicherweise ist hier die Gesamtsensitivität des analytischen Workflows und/oder die Spezifität bzw. Abdeckung der unterschiedlichen Borrelien-Spezies des verwendeten PCR-NAT-Assays unzureichend.

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen 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 54 der 98 Teilnehmer eingesetzt. Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (Inhouse-)Testsystemen zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den insgesamt 21 falsch-negativen bzw. falsch-positiven Ergebnissen für die Proben # 2025351 (*B. valaisiana*) und # 2025354 (*B. hispanica*) 14 davon durch Inhouse-Testsysteme generiert wurden. Gegebenenfalls sollte also die Sensitivität und/oder Spezifität mancher der hauseigenen Testsysteme überprüft werden.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Qiagen artus *Borrelia* (2x), Ingenetix BactoReal *B. burgdorferi* (2x), Elisabeth Pharmacon EliGene *Borrelia* RT (1x), Attomol *B. burgdorferi* Realtime LT (1x), BIORON diagnostics RealLine *B. burgdorferi* (1x), Sacace Biotechnologies TBEV, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris* Real-TM (1x), AID Zecken-Screening (1x), Master diagnostica Tick-borne bacterial flow chip (1x) und Immundiagnostik MutaPLEX *Borrelia* (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

Aus aktuellem Anlass hier erneut vorab ein kurzer Hinweis: Dieser Ringversuch ist ausschließlich für die Abprüfung von PCR/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 diagnostischen Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 10) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei relativ stark positive Proben: Proben # 2025363 und # 2025364 mit einer großen Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG1, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 2025361 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG1, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Probe # 2025362 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Letztere Einzelprobe wurde erfreulicherweise von allen der insgesamt 109 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet.

Die relativ stark positiven Proben # 2025363 und # 2025364 mit ca. 5×10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG1 wurden von jeweils 107 Teilnehmern korrekterweise als positiv interpretiert. Die 2 falsch-negativen Ergebnisse bei beiden Proben beruhen vermutlich eher auf anwendungstechnischen Problemen als auf unzureichender analytischer Sensitivität. Die etwa 50-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 2025361 (ca. 1×10^4 CFU/mL) konnte noch von 106 Teilnehmern korrekt als positiv identifiziert werden, allerdings wurden hier bereits 3 falsch-negative Ergebnisse berichtet. Der aktuelle Ringversuch und insbesondere ein falsch-negatives Ergebnis bei den relativ stark positiven Proben # 2025363 und # 2025364 sollten von den betroffenen Laboratorien dringend zum Anlass genommen werden, die analytische Sensitivität des verwendeten Testsystems kritisch zu hinterfragen und gegebenenfalls zu optimieren.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 76 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: MIKROGEN ampliCube Respiratory Bacterial Panel 1 (6x),

ARGENE Legio pneumo/Cc r-gene (3x), Diagenode R-DiaLeg (2x), Gerbion diarella Legionella real time PCR Kit TM (2x), BioGx auf BD Max (1x), Ingenetix Bacto Real L. pneumophila (2x), Biologio ReadyMax B-CAP Assay (2x), BioFire FILMARRAY Pneumonia Panel (2x), Luminex Respiratory Pathogen Panel Multiplex (2x), AID Community acquired pneumonia bacteria (1x), Fast Track Diagnostics FTD Bacterial pneumonia CAP (1x), Seegene Allplex PneumoBacter Assay (1x), AnDiatec Quidel L. pneumophila (1x), Eazyplex PneumoBug expert (1x), AmpliSens L. pneumophila FRT PCR kit (1x), r-Biopharm SureFast Legionella 3plex (1x), Bioeksen Bio-Speedy L. pneumophila Kit (1x) und PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x).

RV 537: Salmonella enterica

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit einer sehr hohen Menge an *Salmonella enterica* Serovar typhimurium (# 2025371 mit $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit *Salmonella enterica* Serovar typhi (# 2025374 mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit *Shigella sonnei* (# 2025372 mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und eine Probe ohne Zielorganismen (# 2025373), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte erfreulicherweise bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Die Mitteilung von durchweg richtig-positiven und richtig-negativen Ergebnissen von allen 24 Teilnehmern der aktuellen Ringversuchsrunde vereinfacht die Diskussion erheblich. Diesmal war alles perfekt! Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Seegene Allplex GI-EB Screening (2x), TIB Molbiol LightMix Salmonella (1x), MIKROGEN ampliCube Gastrointestinal Bacterial Panel 1 (1x) und BioMerieux BioFire GI Panel (1x).

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

RV 538: Listeria spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnah-

me von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. Im aktuellen Ringversuch wurde jedoch eine Art Verdünnungsreihe von *Listeria monocytogenes* angefertigt, um primär die untere Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten Testsysteme abzuprüfen. Innerhalb des aktuellen Ringversuch-Probensets enthielt die Probe # 2025383 eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 5×10^5 CFU/mL), Probe # 2025384 (ca. 5×10^4 CFU/mL) eine etwa zehnfach geringere Menge und Probe # 2025382 (ca. 5×10^3 CFU/mL) eine etwa hundertfach geringere Menge der entsprechenden *L. monocytogenes*-Zielorganismen. Erfreulicherweise konnte selbst die am schwächsten positive Probe noch von allen der insgesamt 41 Teilnehmer als „positiv“ klassifiziert werden. Lediglich 1 Teilnehmer berichtete für die negative Probe # 2025381 des aktuellen Probensets ein falsch-positives Ergebnis.

Im Vergleich zu den vorhergegangenen Ringversuchen deutet dies auf eine kontinuierlich verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der analytischen Sensitivität aber auch der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Von allen 41 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsergebnisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: AmpliGnost *L. monocytogenes* (2x), Progenie RealCycler *L. monocytogenes* (2x), Sacace Biotechnologies *L. monocytogenes* Real-TM (2x), BioFire FILMARRAY ME Panel (2x), BioGx Bacterial meningitis ELGBS (1x) und Amplex eazyplex CSF direct (1x).

RV 539: MRSA

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

hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von MRSA etabliert haben bzw. im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie an dieser Stelle bereits mehrfach thematisiert, basieren einige der derzeit etablierten eigenentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum Direktnachweis von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern, Staphylokokkenspezies-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen in der entsprechenden Nukleinsäurepräparation. Da sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken das *mecA*-Gen für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Aussagekraft dieser PCR-gestützten Testsysteme für den Direktnachweis von MRSA aus nativem Patientenmaterial eingeschränkt, wenn beim Patienten eine gleichzeitige Besiedelung mit *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. SCCmec-basierte PCR-Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCCmec-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCCmec-Kassette im *S. aureus*-Genom als Zielsequenz verwenden. Dass aber auch die SCCmec-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCCmec-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCCmec-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCCmec-Kassette vorhandenen *mecA*-Gens versandt. Da wir diesmal, abgesehen von einem „ganz speziellen“ MRSA-Isolat keine schwierigen oder komplexen Probenkonstellationen versandt haben, wurden von den insgesamt 294 Teilnehmern mit ihren unterschiedlichsten NAT-gestützten Testsystemen nahezu durchweg korrekte PCR-Ergebnisse für 3 der insgesamt 4 Proben des aktuellen Panels berichtet. Das eben erwähnte MRSA-Patientenisolat enthält auf Genomebene zwar eine typische SCCmec-Genkassette und flankierend die typischen Integrationsstellen bzw. Sequenzbereiche, aber auf Genomebene fehlt der für *S. aureus*-Stämme typische Speziesmarker pSA442, der nach wie vor in einigen Testkonzepten als bewährte PCR/NAT-Zielsequenz verwendet wird [3].

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 13) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 2025391 diesmal eine relativ hohe Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (MRSA; PVL-negativ; pSA442-negativ; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), die Probe # 2025393 eine nennenswerte Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (MRSA; PVL-positiv; $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), die Probe # 2025394 eine deutlich höhere Menge von gleichen Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats (MRSA, PVL-positiv; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), und die Probe # 2025392 ein „ganz

gewöhnliches“ *mecA*-negatives *Staphylococcus epidermidis*-Isolat ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL).

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der relativ stark positiven MRSA-Probe # 2025394 von 275 der insgesamt 277 Teilnehmer durchweg korrekt-positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Auch wenn sich in der zweiten MRSA-positiven Probe # 2025393 eine etwa 10-fach geringere Menge an entsprechenden Zielorganismen befand, so kann die dabei beobachtete Richtigkeitsquote von 98% noch als durchaus zufriedenstellend betrachtet werden. Für diese Probe wurden von 273 Teilnehmern korrekt-positive Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der für beide Proben insgesamt 5 falsch-negativen und einem als „fraglich“ klassifizierten Ergebnis bei Verwendung von kommerziellen und vorkonfektionierten PCR-Testsystemen ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Angesichts der mit 5×10^4 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei den Proben # 2025393 und # 2025394 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Die eher untypische Genomkonstellation des MRSA-Patientenisolats in Probe # 2025391 wurde bereits zuvor diskutiert. Da die besagte pSA442-Sequenz nur bei wenigen Anwendern als *S. aureus*-Speziesmarker zum Einsatz kommt, ist die Ergebnislage bei dieser Probe auch weitgehend nachvollziehbar: die meisten der insgesamt 277 Teilnehmer berichteten hier ein richtig-positives Ergebnis. Diese spezielle Probe wird im Rahmen der aktuellen Ringversuchsauswertung natürlich als „edukativ“ klassifiziert und die Ergebnisse bei der Erteilung der Zertifikate nicht bewertet.

Bei der Probe ohne MRSA-Zielorganismen (# 2025392), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge eines „ordinären“ *mecA*-negativen *S. epidermidis*-Patientenisolats enthielt, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs von 5 der 277 Teilnehmer ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beobachtet. Dabei liegt das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontaminationsereignisses oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe. Solche „Ausreißer“ sind bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 200 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der erfreulich große Anteil von richtig-positiven Ergebnissen bei den beiden bewerteten positiven Proben und die überwiegend richtig-negativen Befunde bei der MRSA-negativen Probe erneut für ein hervorragendes Funktionieren von test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen spricht.

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. Entspre-

chende Ergebnisse wurden von 78 der insgesamt 277 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt, und mit Ausnahme von zwei Teilnehmern waren alle Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung durchweg korrekt.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: VELA diagnostics Sentosa SA Direct MRSA (2x), HOLOGIC Panther Fusion MRSA Assay (2x), Gerbion Diarella MRSA (2x), GenomEra MRSA/SA Multi Swab (1x), ELITechGroup MRSA/SA Kit (1x) und Q-Bioanalytic MRSA 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 erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *C. pneumoniae*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit einer relativ hohen Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 2025403; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ IFU/mL) und eine Probe mit einer etwa hundertfach geringeren Menge (# 2025402; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 2025401 und # 2025404), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Aus den in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 14) aufgeführten Daten ist ersichtlich, dass im aktuellen Ringversuch erfreulicherweise nahezu alle der insgesamt 119 Teilnehmer die *C. pneumoniae*-Zielorganismen in der sehr stark positiven Probe # 2025403 (ca. 1×10^6 IFU/mL) und in der 50-fach schwächer positiven Probe # 2025392 (ca. 5×10^4 IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Lediglich ein Teilnehmer berichtete für die sehr stark positive Probe # 2025393 ein falsch-negatives Ergebnis für *C. pneumoniae*-DNA. Für die beiden Proben ohne *C. pneumoniae*-Zielorganismen # 2025401 und # 2025404 (jeweils nur *E. coli*) ist im Vergleich zu den vorhergegangenen Ringversuchen die Anzahl falsch-positiver Befunde erneut etwas zurückgegangen: Hier fanden sich insgesamt lediglich 4 Teilnehmer, die diese Proben fälschlicherweise als positiv für *C. pneumoniae*-DNA bewerteten. Dabei dürfte es sich aber am ehesten um laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -bearbeitung

gehandelt haben. Alle von den Teilnehmern eingesetzten Testsysteme oder PCR/NAT-Protokolle wiesen die im Rahmen der regulatorischen Vorgaben geforderten Inhibitionskontrollen auf, und nennenswerte Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet. Selbstentwickelte In-house-PCR/NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 34 Laboratorien eingesetzt, von den restlichen 84 Teilnehmern wurde die Verwendung von kommerziellen Assays aufgeführt.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: MIKROGEN Diagenode Myc./Ch. Pneumoniae (3x), Sacace Biotechnologies M. pneumoniae/C. pneumoniae Real-TM (3x), Biologio ReadyMax b-CAP Assay (2x), AmpliSens M. pneumoniae/C. pneumoniae FRT PCR kit (2x), BioFire FILMARRAY respiratory Panel 2 plus (2x), BioFire FILMARRAY Pneumonia Panel (1x), Ingenetix Bacto Real C. pneumoniae (1x), Seegene PneumoBacter assay (1x), BD Max (1x), Luminex Respiratory Pathogen Panel Multiplex PCR (1x), Eazyplex PneumoBug expert (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), r-Biopharm RIDAGENE CAP Bac (1x) und AusDiagnostics Pneumonia 16 Plex (1x).

RV 541: Mycoplasma pneumoniae

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

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 2025414 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ Genomkopien/mL), Probe # 2025412 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL) und # 2025413 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^3$ Genomkopien/mL). Probe # 2025411 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*. Mit jeweils einer bzw. zwei Ausnahmen konnten die 136 Teilnehmer die DNA von *M. pneumoniae* in den beiden stärker positiven Proben # 2025412 und # 2025414 zuverlässig nachweisen. Die Probe # 2025413 mit der geringsten Menge an Zielorganismen wurde immerhin von 128 Laboratorien als positiv für *M. pneumoniae*-DNA erkannt. Für die negative, mit *E. coli* versetzte Probe # 2025411 wurden ledig-

lich von drei Teilnehmern des aktuellen Ringversuchs falsch-positive Ergebnisse berichtet. Hierbei könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung gehandelt haben. Die im Rahmen der regulatorischen Vorgaben geforderten Inhibitionskontrollen wurden von allen 136 Teilnehmern mitgeführt, und bei keiner der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsereignisse beobachtet.

Zusammenfassend bleibt anzumerken, dass wie bereits in vorausgegangenen Ringversuchsrunden die PCR/NAT-gestützte Diagnostik von *Mycoplasma pneumoniae* in vielen Labors robust und zuverlässig implementiert ist. Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 100 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: MIKROGEN Diagenode Myc./Ch. pneumoniae (3x), BioFire FILMARRAY Pneumonia oder respiratory Panel (3x), Biologix ReadyMax b-CAP Assay (2x), Sacace Biotechnologies M. pneumoniae/C. pneumoniae Real-TM (2x), Luminex MagPix Respiratory Pathogen Panel Assay (2x), Sartorius Microsart ATMP Mycoplasma (2x), Seegene PneumoBacter assay (1x), Fast Track DIAGNOSTICS FTD Atypical CAP (1x), Fast Track DIAGNOSTICS FTD Respiratory Pathogens 21 (1x), AmpliSens M. pneumoniae/C. pneumoniae FRT PCR kit (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), AusDiagnostics Pneumonia 16 Plex (1x), Ingenetix BactoReal M. pneumoniae (1x) und Eazyplex PneumoBug expert (1x).

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

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tabelle 1, Anhang 1, S. 17) enthielt zwei Proben mit ähnlichen Mengen an *C. burnetii* ($\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 2025421 und # 2025424), zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *B. anthracis*-UR-1-Isolat-DNA ($\sim 5 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 2025422 und $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 2025421), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2025423), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt. Der Übersichtlichkeit halber wird bei diesem kombinierten Ringversuch die Ergebnislage für die beiden unterschiedlichen Erreger auch in zwei getrennten Tabellen dargestellt: für *C. burnetii* in den Tabellen 2 und 3 (Anhang 1,

S. 17) und 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: Gerbion Diarella Q-Feber (2x), INDICAL Bioscience Bactotype *C. burnetii* PCR Kit (2x), Sacace Biotechnologies *C. burnetii* Real-TM (1x), Master diagnostica Tick-borne bacterial flow chip (1x), Adiagene ADIAVET *C. burnetii* (1x) und BioFire FILMARRAY BioThreat Panel (1x).

Coxiella burnetii: Wie bereits in den vorausgegangenen Ringversuchen gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage zufriedenstellend. Die beiden relativ stark positiven Proben # 2025421 und # 2025424 (ca. 5×10^4 Genomkopien *C. burnetii*/mL) wurden von jeweils 45 der insgesamt 46 Teilnehmer mit ihren *C. burnetii*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen detektiert. Die beiden Teilnehmer mit den singulären falsch-negativen Ergebnissen haben dabei die Verwendung von selbstentwickelten Inhouse-PCR-Assays aufgeführt. Falsch-negative Ergebnisse beim Vorliegen von doch nennenswerten Mengen an *C. burnetii*-Zielorganismen im Probenmaterial sollten die betroffenen Laboratorien zum Anlass nehmen, die Performance des verwendeten Testsystems zu hinterfragen und die Prozesse der Probenaufarbeitung gegebenenfalls zu optimieren.

Bei den beiden Proben ohne Zielorganismus (# 2025422 und # 2025423) wurde lediglich von einem Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis beobachtet. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA der Teilnehmer enthielten durchweg eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Relevante Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet.

Bacillus anthracis: Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Alle 24 Teilnehmer konnten sowohl die stärker positive Probe # 2025422 als auch die etwa 5-fach schwächer *B. anthracis*-positive Probe # 2025421 richtig klassifizieren. Im Gegensatz zu einigen der vorausgegangenen Ringversuchsrunden wurden in der aktuellen Aussendung erfreulicherweise auch keine falsch-positiven Ergebnisse für die ‚negativen‘ Proben (# 2025423 und # 2025424) berichtet. Im Hinblick auf die Konsequenzen solcher Ergebnisse für die Therapie und das Management von Patienten (und die Auswirkungen auf das Umfeld!) ist dies sicherlich lobenswert.

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

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 (~1x10⁵ CFU/mL in Probe # 2025433 und ~1x10⁴ CFU/mL in Probe # 2025431), zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Brucella melitensis*-DNA (~1x10⁵ CFU/mL in Probe # 2025432 und ~1x10⁴ CFU/mL in Probe # 2025431), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 2025434), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

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

***Francisella tularensis*:** Sowohl die zwei positiven Proben (# 2025431 und # 2025433) als auch die zwei negativen Proben (# 2015431 und # 2015432) des aktuellen Probensets wurden diesmal von allen bis auf 2 der insgesamt 27 Teilnehmer durchweg korrekt mit ihren *F. tularensis*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen analysiert und befundet. Die beiden Teilnehmer mit falsch-negativen Ergebnissen bei Probe # 2025431 sollten die Performance des verwendeten Testsystems überprüfen und/oder versuchen, die Effizienz ihrer jeweiligen Probenaufarbeitung zu optimieren. 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 ist ebenfalls wieder sehr erfreulich. Hier wurden die beiden *Brucella* spp.-positiven Proben (# 2025431 und # 2025432) und die beiden negativen Proben (# 2025433 und # 2025434) von allen der diesmal 25 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 wurden 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 # 2025441 enthielt *Serratia marcescens*-Zielorganismen mit dem **VIM-4**-Gen (ca. 1x10⁷ Genomkopien/mL), Probe # 2025443 *Escherichia coli*-Zielorganismen mit dem **OXA-162**-Gen (ca. 1x10⁷ Genomkopien/mL) und Probe # 2025444 enthielt *Citrobacter freundii*-Komplex-Zielorganismen mit dem **GES-5**-Gen (ca. 1x10⁷ Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 2025442 war als Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

Erfreulicherweise konnten diesmal alle der insgesamt 80 Teilnehmer die Carbapenemase-Gene in den beiden positiven Proben # 2025441 und # 2025443 eindeutig nachweisen. Für die negative Probe # 2025442 des aktuellen Sets wurden ebenfalls von allen bis auf einen der Teilnehmer korrekt-negative PCR/NAT-Befunde mitgeteilt. Gewisse Schwächen der gegenwärtig eingesetzten Testsysteme zeigten sich allerdings bei der Detektion des **GES-5**-positiven Isolats aus dem *C. freundii*-Komplex. Hier wurden lediglich von 21 der 80 Teilnehmer positive Ergebnisse für Carbapenemase-Gene berichtet. Methodisch gesehen ist das auch nicht weiter verwunderlich, da das GES-5-Gen in vielen der aktuell verfügbaren bzw. routinemäßig eingesetzten Multiplex-PCR/NAT-Testformaten derzeit nicht als Target enthalten ist. Dennoch stellen GES-5-Carbapenemasen durch ihre steigende Nachweisrate in den letzten Jahren sowie ihr Vorkommen sowohl in *Enterobacterales* wie auch in *Pseudomonas aeruginosa* ein interessantes Target für diesen Ringversuch dar.

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

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Bruker-Hain Carbaplex (2x), Check-Points Check direct CPE oder MDR (1x), BD Max Check-Points CPO Assay (1x), Amplex eazyplex SuperBug CRE (1x) und AmpliGnost Carbapenemase PCR 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 zwei positive Proben: Probe # 2025453 mit einer relativ hohen Menge an *Clostridium difficile* ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 2025452 mit ca. zehnfach geringerer Menge ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 2025451 und # 2025454), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten.

Die beiden relativ stark positiven *Clostridium difficile*-Proben # 2025452 und # 2025453 wurden erfreulicherweise von 164 bzw. 162 der insgesamt 165 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 die beiden Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis für die lediglich *E. coli*-enthaltende Probe # 2025454. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich. Die negative Probe # 2025451 wurde dagegen von allen bis auf einen Teilnehmer, der ein als „fraglich“ klassifiziertes Ergebnis berichtete, korrekterweise als negativ für *C. difficile* befundet. Bis auf 4 Teilnehmer haben diesmal alle die vorschriftsmäßigen Extraktions- und/oder Inhibitionskontrollen mitgeführt, und signifikante Inhibitionsereignisse wurden bei keiner der diesmal ausgesandten Proben berichtet.

Wie in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 23) angegeben, verwendete der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme, während selbstentwickelte Testkonzepte in 11 Laboratorien zum Einsatz kamen. In dieser Ringversuchsrunde zeigten sich (vergleichbar mit den vorausgegangenen Aussendungen) keine signifikanten Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität zwischen den kommerziellen Testsystemen und den eigenentwickelten PCR/NAT-Assays.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: TIB Molbiol Modular Dx Kit Cdiff Toxin Gene tcdA/tcdB (3x), TIB Molbiol LightMix Kit (1x), Seegene Allplex GI-EB Screening (2x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B (2x), r-Biopharm RIDAGENE CD Toxin A/B (1x), Abacus Diagnostica Genom-Era *C. difficile* (1x), Bio-Speedy *C. difficile* Real-Time PCR (1x), ANCHOR *C. difficile* PCR Kit (1x) und Fast Track DIAGNOSTICS FTD Bacterial gastroenteritis (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. 24) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 2025461 mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecium* vanA-resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 2025464 mit einer ähnlichen Menge (*Enterococcus faecium* vanB-resistent, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 2025462 mit ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL an *Lactobacillus rhamnosus*. Im Ringversuchssprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 2025463), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden positiven Proben mit vanA- bzw. vanB-tragenden *Enterococcus faecium* (# 2025461 und # 2025464) mit keiner Ausnahme von allen Teilnehmern korrekterweise als „VRE-positiv“ klassifiziert. Wie bereits in den vorangegangenen Ringversuchsrunden waren auch diesmal nahezu alle mitgeteilten Ergebnisse der vanA/vanB-Differenzierungen (bis auf zwei falsch klassifizierte) korrekt. Von den VRE-negativen Proben wurde # 2025462 von allen der insgesamt 63 Teilnehmer korrekt klassifiziert, für die Probe # 2025463 war lediglich ein falsch-positiver Befund zu verzeichnen.

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

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: Amplex eazyplex VRE (3x), AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz Differenzierung (2x), GeneProof VRE (1x) und MIKROGEN ampliCube MRD Panel 6 (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. 25–29). 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 79 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. 25–29) 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 *Mycoplasma hominis* oder *Trichomonas vaginalis* beobachtet. Für die *Ureaplasma parvum*-positive Probe wurden erfreulicherweise durchweg korrekte Befunde von den insgesamt 53 Teilnehmern mit mitgeteiltem PCR-Ergebnis für *Ureaplasma* 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 79 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 für im Rahmen der Online-Ergebnisübermittlung des RV 547 eine Option in der Eingabemaske 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 Befun-

dung auf Spezies- oder eben nur auf Genus-Ebene zu 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 u.a. die Verwendung der folgenden Testkits aufgeführt: MIKROGEN ampliCube STD Panel 1 (8x), MIKROGEN ampliCube STD Panel 2 (7x), MIKROGEN ampliCube STD Panel 3 (4x), Seegene Anyplex STI-7 Detection (2x), Seegene Anyplex STI-5 Detection (1x), Seegene Allplex Genital ulcer (1x), AmpliGnost STI Urethritis (1x), AmpliGnost *U. urealyt./U. parvum* (1x), AmpliGnost *M. genitalium* und *M. hominis* (1x), BIORON diagnostics RealLine *U. urealyt./U. parvum* und *M. hominis/genitalium* (1x), Bruker-Hain Lifescience FluoroType STI (1x), Amplex eazyplex STD complete (1x), AmpliSens *U. parvum/U. urealyticum* FRT PCR kit (2x), AmpliSens *T. vaginalis* FRT PCR kit (1x), AmpliSens *M. hominis* und *M. genitalium* FRT PCR kit (1x), Sacace Biotechnologies *U. urealyticum* und *U. parvum/T. vaginalis/T. pallidum/M.hominis* und *M. genitalium/G. vaginalis* (1x), AB Analytica Realquality *U. urealyticum* und *U. parvum* (1x), AID RDB 2335 STI (1x), AID RDB 2110 STD (1x), r-Biopharm RIDAGENE *T. vaginalis* (1x), BD Max CT/GV/TV Panel (1x), EUROIMMUN EUROArray STI-11 (1x), TIB Molbiol LightMix modular *T. pallidum* (2x), TIB Molbiol LightMix modular *M. genitalium* (1x) und VIASURE STD Kit (1x).

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Der Ringversuch „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direkt-nachweis 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. 30): eine Probe mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (# 2025603; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^5 Organismen/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 2025601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^4 Organismen/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 2025602 und # 2025604) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen. Die beiden negativen Proben # 2025602 und # 2025604 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 auf einem sehr nied-

rigen Level stabilisiert. Bei den positiven Proben wurde Probe # 2025603 mit $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL diesmal von allen der insgesamt 111 Teilnehmer korrekt als positiv befundet. Etwas schlechter war die Ergebnislage für die ca. zehnfach schwächere positive Probe # 2025601 (ca. 1×10^4 Organismen/mL). Immerhin 107 von insgesamt 111 teilnehmenden Laboratorien berichteten hier ein korrektes, positives Ergebnis. Bei einer Menge von 1×10^4 Organismen/mL an *P. jirovecii* (entspricht ca. 100 Zielorganismen in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ 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.

Alle von den 111 Teilnehmern eingesetzten Testsysteme oder PCR/NAT-Protokolle wiesen die im Rahmen der regulatorischen Vorgaben geforderten Inhibitionskontrollen auf, und nennenswerte Inhibitionsereignisse wurden nicht beobachtet. Selbstentwickelte Inhouse-PCR/NAT-Testsysteme zur Detektion von *P. jirovecii*-DNA wurden von 28 Laboratorien eingesetzt, von den restlichen 83 Teilnehmern wurde die Verwendung von kommerziellen Assays aufgeführt.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Sacace Biotechnologies *P. jirovecii* Real TM (2x), AmpliSens *P. jirovecii* FRT PCR kit (2x), Biolegio Atypical Pneumonia-1 (1x), PathoNostics PneumoGenius (1x), VIASURE *P. jirovecii* Real Time PCR Detection (1x) und ELITechGroup Pneumocystis ELITE MGB Kit (1x).

Anhänge

Verfügbar unter

<https://www.egms.de/de/journals/lab/2021-12/lab000042.shtml>

1. Anhang1_lab000042.pdf (411 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ November 2020

Literatur

1. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11
2. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol.* 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46331-0
3. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1998 Mar;36(3):618-23. DOI: 10.1128/JCM.36.3.618-623.1998

Korrespondenzadresse:

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

Bitte zitieren als

Reischl U, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Ehmann R, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November 2020 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab.* 2021;12:Doc02. DOI: 10.3205/lab000042, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000426

Artikel online frei zugänglich unter

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2021-12/lab000042.shtml>

Veröffentlicht: 22.03.2021

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 November 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 Reischl¹
Martin Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Michael Baier³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Heiner von Buttlar⁴
Rosina Ehmann⁴
Holger Scholz⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Roger Dumke⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Agnes Anders⁸

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

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

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

4 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

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

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

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

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

Brief discussion of the current results

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

Examination results November 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 samples # 2025302 and # 2025303, and $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL in sample # 2025304), as well as three samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms: $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 2025303, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL in sample # 2025301 and $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL in sample # 2025304.

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 239 participants reported correct-positive CT results for samples # 2025302, # 2025303 and # 2025304. Three participants reported false-positive results for sample # 2025301. For the CT-negative sample # 2025301, only 3 false-positive results were noted. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 12 of the 239 participants for sample # 2025304, which contained a relatively low number of *N. gonorrhoeae* target organisms (5×10^2 CFU/mL) next to a significant amount of *C. trachomatis* (5×10^3 IU/mL). Due to the relatively low amounts of GO target organisms ($\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL) in sample # 2025304, we have not scored those

(false-)negative results in the course of issuing the corresponding QC certificates. Also 3 false-positive results for the GO-negative sample # 2025302 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” are 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 assay concepts. Since the amount of target organisms in the GO-positive sample # 2025303 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 239 participants.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained two positive samples (# 2025311 and # 2025313) with $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms, and sample # 2025312 with $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL. Sample # 2025314 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 three *C. trachomatis*-positive samples # 2025311, # 2025312 and # 2025313, and no false-negative results were observed for the current set. For the *C. trachomatis*-negative sample # 2025314, containing only non-infectious human cells and *E. coli*, also no false-positive results were observed among the 51 participants. 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 all of the 51 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 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained two samples with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 2025321 with 5×10^5 CFU/mL and # 2025324 with 5×10^4 CFU/mL), one sample with the closely related species *Bordetella holmesii* (# 2025323, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL; IS481-positive strain!), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 2025322). The availability of well-established commercial or in-house NAT assays has led to a high portion of correct results. Only two of the 146 participants reported false-negative results for the samples # 2025321 and # 2025324 (*B. pertussis*, 5×10^5 CFU/mL and 5×10^4 CFU/mL, respectively) and one participant has classified his result as “questionable”. By the way, even an amount of 5×10^4 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms is significantly above the previously observed lower limits of detection for the currently used PCR/NAT assays. Sample # 2025322, which only contained *E. coli*, was falsely scored positive by 2 of the participating laboratories. These sporadically observed false-positive results are most likely caused by contamination events in the course of sample preparation or the PCR/NAT amplification and detection workflow.

The *B. holmesii* organisms in sample # 2025323 were tested false-negative by 54 of the 146 participants. Since it is well known that *B. holmesii* strains may contain copies of the most popular *B. pertussis* target gene IS481, the high rate of false-positives is not surprising for the latter sample. Considering that the detection rate of the *B. pertussis* samples was very high (indicating a good performance of the *B. pertussis*-specific PCR/NAT assays), and IS481 is still one of the most practical and sensitive target genes for detection of *B. pertussis* DNA in clinical samples, we have not scored those (false-)positive results for the *B. holmesii* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. For colleagues who are interested in the IS481 topic, there is an informative paper by Njamkepo et al. [1].

For the two participants who observed false-positive *B. pertussis* PCR/NAT results with sample # 2025322, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity of their assay concepts [2]. However, it is good to see that most of the remaining results reported by the 146 participants were correct. 145 participants performed run controls, and

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

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained only one sample with a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strain isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study. Sample # 2025331 contained approximately 5×10^5 CFU/mL of the target organisms. Sample # 2025333 contained culture suspension of the related species *Helicobacter salomonis* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), and sample # 2025334 contained culture suspension of *Helicobacter acinonyx* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL).

The availability of well-evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in the *Helicobacter pylori*-positive sample (# 2025331: $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) led to high proportions of correct-positive and correct-negative PCR/NAT results in samples # 2025331, # 2025332 and # 2025333 of the current distribution. One false-positive result was observed among the 45 participants for sample # 2025332, which contained only a significant number of *E. coli* cells within our proprietary sample matrix. Of note, seven false-positive results were reported for sample # 2025333, containing $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL of the related species *Helicobacter salomonis*. False-positive *H. pylori* results for sample # 2025333 could be due to contamination events or just lacking analytical specificity of the applied PCR/NAT assays. Sample # 2025334 of the current set contained a relatively high amount of *Helicobacter acinonyx* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) contaminated with traces of *H. pylori* organisms during bacterial culture out of our stock collection vials originating from the year 1998. When we noted the traces of *H. pylori* in the *H. acinonyx* culture (meanwhile also known as *H. acinonychis*), we decided to keep this suspension as starting material for the preparation of EQAS samples and were already keen to see how they would perform in the current distribution. As expected, most of the participating labs were able to even detect the relatively low amounts of *H. pylori* organisms in sample # 2025334 next to *H. acinonyx*. Of course, we have not scored the results from this sample in the course of issuing the corresponding QC certificates.

As noted in the description of RV 533, clarithromycin resistance testing in the examined *H. pylori* isolates could be performed by participants on a voluntary basis. This molecular resistance testing is usually based on amplification and sequencing of characteristic regions within the *H. pylori* 23 S rDNA or the use of hybridization probes based qPCR assays. Results for clarithromycin resistance were reported by 42 of the 45 participants. Except one result, all of the reported results were correct for both of the *H. pylori*-positive samples.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed previously, the challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small

amounts of target organisms, but the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenic factors (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin).

The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 2025342 (*E. coli*, 5×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*- and *hlyA*-positive) and # 2025343 (*E. coli*, 1×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*- and *hlyA*-positive). The other two EHEC-negative samples contained a *Shigella sonnei* strain (sample # 2025341, 5×10^4 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 2025344).

The majority of the 127 participants reported correct EHEC/STEC-negative results for sample # 2025341, which contained a significant number of *Shigella sonnei* organisms. Also the second “EHEC/STEC-negative” sample (# 2025344) of the current distribution, containing only *E. coli* K12, was correctly reported as EHEC/STEC-negative by all except two of the participating laboratories. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, contamination events of the negative sample “4” by target organisms or PCR products originating from positive samples “2” or “3” are by far not unlikely in the current sample constellation.

For the EHEC/STEC-positive samples # 2025342 and # 2025343, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation (and relatively high numbers of target organisms present in the respective samples) resulted in consistently high accuracy rates. Samples # 2025342 and # 2025343 were correctly reported EHEC/STEC-positive by 126 and 125 of the 127 participants, respectively.

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 analytical sensitivity or lower limit of detection. Partial or complete Shiga toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 108 of the 127 participating laboratories. Except of two molecular typing results, all of the reported results were correct. None of the participants observed significant inhibition of the PCR/NAT reaction with the samples of the current distribution.

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 genospecies will be present** in individual samples.

Short recapitulation: So far, more than 20 different species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato complex were described that naturally present genetic differences in commonly used target genes. To further address this heterogeneity and to monitor the analytical sensitivity and specificity of the PCR/NAT assays applied by the diverse group of international participants for members of the *B. burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia garinii* and *Borrelia hispanica* were included in the current EQAS distribution.

While *B. garinii* is a well-known human pathogenic species present in Europe and Asia, pathogenicity of *B. valaisiana* for humans – though known for more than 15 years – is still questionable. ***Borrelia hispanica*** is not a member of the *B. burgdorferi* sensu lato complex, but like e.g. *Borrelia duttonii*, it is one of the causative agents for tick-borne relapsing fever, which is most common in Spain and Northern Africa. In Europe, this species is still extremely rare – and especially of differential diagnostic importance for travelers with febrile illnesses.

The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia valaisiana* (# 2025351, $\sim 5 \times 10^4$ organisms/mL), one sample with *Borrelia garinii* OspA type 3 (sample # 2025353, $\sim 5 \times 10^4$ organisms/mL) and one sample with *Borrelia hispanica* (sample # 2025354, $\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL). Sample # 2025352 contained no *Borrelia* organisms but a strain of *Treponema phagedenis*. With the exception of one false-negative result, all participants reported correct results for sample # 2025353 containing a high number of *B. garinii* target organisms. For the *Borrelia* spp.-negative sample # 2025352 (containing a high number of *Treponema phagedenis* organisms) of the current distribution, 98 correctly negative and no false-positive results for *B. burgdorferi* sensu lato DNA were observed. About 15% of all participants reported a false-positive result for the *B. hispanica* organisms in sample # 2025354, and 7 of the 98 participants reported a false-negative or questionable PCR/NAT *B. burgdorferi* DNA result for the *B. valaisiana* organisms present in sample # 2025351 of the current distribution.

Admittedly, the current set of 4 samples contained some analytical challenges with an educative background. But, as always, obtaining false-negative or false-positive results should prompt a thorough re-evaluation of the assay’s analytical specificity and/or sensitivity. Approximately half of the participating laboratories used self-developed (in-house) PCR/NAT assays with inhibition and/or positive controls. None of the participants noted significant inhibition of the NAT reaction. Looking at the species composition of the current panel, slight differences in test performance become apparent between commercially available kits and in-house assays for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

RV 536: *Legionella pneumophila*

Referring to some recent requests of candidate participants: this EQAS panel is designed exclusively for the

assessment of PCR/NAT-based methods and protocols for the 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 those diagnostic laboratories that 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 newly established methods or protocols with the help of an external quality control. In order to assess the analytical sensitivity of certain *Legionella pneumophila*-specific PCR assays, the current set of QC samples contained three samples with *Legionella pneumophila* serogroup 1: samples # 2025363 and # 2025364 with 5×10^5 CFU/mL and sample # 2025361 with 1×10^4 CFU/mL. Sample # 2025362 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. The relatively strong *L. pneumophila*-positive samples # 2025363 and # 2025364 ($\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) were correctly tested positive by 107 of the 109 participating laboratories. For the third positive sample within the current distribution, # 2025361, which contained an about 50-fold lower amount of *L. pneumophila* target organisms ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), only 106 of the 109 participants reported a correctly positive result. Since the amount of target organisms in *L. pneumophila*-positive samples # 2025363 and # 2025364 could not be considered as “extremely low”, false-negative results should encourage the participants to review and optimize the workflow and concept of their individual *L. pneumophila*-specific PCR/NAT assays.

Sample # 2025362, which contained only *E. coli*, was correctly classified as negative by all of the participating diagnostic laboratories. All but one of the participants have included inhibition controls in their test systems. No significant inhibitions of the PCR/NAT reactions were observed among the samples of the current distribution.

RV 537: Salmonella enterica

The current set of QC samples contained two positive samples with *Salmonella enterica*. A relatively high amount of the corresponding target organism was present in sample # 2025371 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), and a similar amount was present in sample # 2025374 (*Salmonella enterica* serovar Typhi, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 2025372 contained a *Shigella sonnei* strain (clinical isolate, 1×10^5 CFU/mL). No target organisms but only *E. coli* cells were present in sample # 2025373.

The results reported by the 24 participants make the discussion of the current distribution very easy and also pleasing. Only correct-positive and correct-negative results were observed for all of the 4 samples. This again indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR/NAT assays and improved procedures with respect to the effective prevention of contamination events during the individual sample

preparation and PCR/NAT analytics in the participating diagnostic laboratories.

RV 538: Listeria spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 2025381; only *E. coli* cells), and three samples positive for *L. monocytogenes* (# 2025383, # 2025384 and # 2025382). The *Listeria monocytogenes*-containing samples # 2025383 with 5×10^5 CFU/mL of *L. monocytogenes*, # 2025384 with 5×10^4 CFU/mL of *L. monocytogenes* and # 2025382 with 5×10^3 CFU/mL of *L. monocytogenes* were correctly reported positive by all of the 41 participants. In addition, the “*Listeria*-negative” *E. coli* containing sample # 2025381 was also correctly identified as negative by all but one of the participating laboratories. Most of the participants used very sensitive *Listeria monocytogenes*-specific assays, which is reflected by the high number of correctly positive results for sample # 2025384, containing only 5×10^3 CFU/mL of *L. monocytogenes*.

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

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA DNA in typical clinical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials, we 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. Except for one sample containing a rarely encountered MRSA isolate (missing the normally very reliable, very sensitive and robust pSA442 *S. aureus* species marker gene), no other difficult or interesting staphylococcal strains were included into the current panel.

Sample # 2025391 of the current distribution contained an MRSA patient isolate (MRSA, PVL-negative, pSA442-negative, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Samples # 2025394 and # 2025393 contained different amounts of a CA-MRSA isolate (MRSA, PVL-positive; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL and $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL respectively). One sample of the current set (# 2025392) contained no MRSA target organisms

but only a clinical isolate of an oxacillin-susceptible CoNS strain (*S. epidermidis*, *mecA*-negative, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). Fortunately, for the two relatively strong positive CA-MRSA samples # 2025393 and # 2025394, correct-positive results were reported by almost all participants. The 5 false-negative results are probably caused by problems in the course of the sample workup or experimental workflow of commercial PCR/NAT test systems. Considering the assay-specific percentage of true-positive and true-negative results given in Table 3 (Attachment 1, p. 13), no serious problems can be seen for individual commercial assay concepts. Consequently, any “problems” are obviously due to the technical or manual workflow of individual operators.

The MRSA-negative sample # 2025392 tested correctly negative by 273 of 277 participants with their PCR-based MRSA-specific test systems. Only 5 participants reported a false-positive result, which could be due to genomic DNA or amplicon contamination events during sample preparation, amplification or detection.

For the sample # 2025391, which contained an MRSA isolate lacking the pSA442 chromosomal *S. aureus* species marker gene, 250 of 277 participants reported correct MRSA-positive results, whereas 24 participants missed this MRSA strain with their individual PCR/NAT detection assay, and 3 participants classified their results as “questionable”. Five of these 24 participants indicated the use of test systems that are based on a separate detection of the *mecA* gene and *S. aureus* specific target genes. When they used the pSA442 target gene as *S. aureus* marker, it is likely that they have missed this particular isolate. For further information on pSA442, see Martineau et al. [3]. Due to the special genetic constellation of the MRSA strain in sample # 2025391, it was classified as “educative”, and the corresponding PCR/NAT results were not included into the assessment for the EQAS certificates.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported correct results for at least 3 samples of the current EQAS distribution. This indicates excellent sample workup that manages to avoid the risk of contamination and carry-over events through laboratory-specific prevention measures. Moreover, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor PVL (Panton-Valentine leukocidine) or its coding gene *lukF/S-PV* is possible in this EQAS scheme. Corresponding results were reported by 78 of the 277 participating laboratories. Within the current distribution, the (positive) results for molecular PVL testing were correct in all but two cases.

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 pro-

cessing typical clinical samples like BAL or other respiratory specimens. Therefore, 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 # 2025403 was spiked with $\sim 1 \times 10^6$ IFU/mL of *C. pneumoniae*, whereas sample # 2025402 contained an approximately hundred-fold lower amount of *C. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL). Only *E. coli* and human cells were present in samples # 2025401 and # 2025404.

As depicted in Table 2 (Attachment 1, p. 14), all but one of the 118 participants reported correct-positive results for both the relatively strong positive *C. pneumoniae* sample # 2025403 (5×10^5 IFU/mL) as well as for the ten-fold lower *C. pneumoniae*-positive sample # 2025402 (5×10^5 IFU/mL). For both of the *C. pneumoniae*-negative samples # 2025401 and # 2025404 in the current distribution, all but 4 laboratories reported correct-negative results. The sporadically observed false-positive results could be due to simple cross-contamination events in the course of sample processing and extraction. Interestingly, all of the 4 affected participants indicated the use of LDT or in-house PCR/NAT assay concepts. From the methodical point of view, a severe cross-reactivity of *C. pneumoniae*-specific NAT/PCR assays with *E. coli* DNA seems to be unlikely. False-positive results for samples # 2025401 and # 2025404, 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 specimens like BAL or other respiratory materials. Therefore, the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. As a consequence, diagnostic assays designed for *M. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *M. pneumoniae* infected cells in individual samples of the RV 541 distributions.

The current set of QC samples contained three positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 2025414. An approximately ten-fold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL) was present

in sample # 2025412, and sample # 2025413 contained an approximately hundred-fold lower amount of *M. pneumoniae* target organisms ($\sim 5 \times 10^3$ genome copies/mL). The set was completed by sample # 2025411, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli*.

With the exception of 3 laboratories, all of the 136 participants correctly reported samples # 2025414 and # 2025412 positive for *M. pneumoniae* DNA. The third positive sample with a relatively low amount of target organisms (# 2025413) was correctly identified by 128 participants, and 8 laboratories observed false-negative PCR/NAT results. Due to the relatively small amount of *M. pneumoniae* target organisms, sample # 2025413 was not included in the assessment for the EQAS certificates.

Sample # 2025411, which contained only human cells and *E. coli*, was correctly reported as negative for *M. pneumoniae* DNA by 133 laboratories. Only 3 participants observed false-positive results for the “negative” sample, which could be due to cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps.

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

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

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. burnetii* DNA and/or *B. 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 QC samples (Table 1, Attachment 1, p. 17) contained two samples with similar amounts of *C. burnetii* DNA ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 2025421 and # 2025424) and two samples with different amounts of *B. anthracis* strain UR-1 DNA ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 2025421 and $\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 2025422). Sample # 2025423 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. For convenient data presentation and analysis within this combined EQAS scheme, we decided to depict the PCR/NAT results for each target organism in two separate tables: please see Tables 2 and 3 (Attachment 1, p. 17) for the *C. burnetii*-specific results and Tables 4 and 5 (Attachment 1, p. 18) for the *B. anthracis*-specific results.

Coxiella burnetii: With the exception of two laboratories, all participants correctly reported correct-positive results for the *C. burnetii*-containing samples # 2025421

(5×10^4 genome copies/mL) and # 2025424 (5×10^4 genome copies/mL). The two negative samples (# 2025422 contained only *B. anthracis* and # 2025423 contained only *E. coli*) were correctly reported as negative by 45 and 46 of the 46 participants, respectively. These single false-negative and false-positive results should be taken as an opportunity by the affected participants to investigate the efficiency of their individual sample preparation and PCR/NAT amplification/detection procedures.

Bacillus anthracis: All participants correctly reported negative results for samples # 2025423 and # 2025424, which did not contain *B. anthracis* target organisms. The positive samples # 2025421 containing $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL and # 2025422 containing $\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL of *B. anthracis* strain “UR-1” were correctly reported by all of the 24 participants.

With the completion of this round of external quality assessment, standardized samples are again available for colleagues who are interested in obtaining *B. anthracis* DNA-positive material for assay validation purposes. Requests for backup samples should be addressed to the EQAS coordinator (udo.reischl@ukr.de).

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

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 # 2025433 and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 2025431), two samples with different amounts of *B. melitensis* DNA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL in sample # 2025432 and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL in sample # 2025431). Sample # 2025434 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Francisella tularensis: Similar to many of the past distributions, the *F. tularensis*-positive samples # 2025431 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *F. tularensis* subsp. *tularensis*) and # 2025433 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *F. tularensis* subsp. *tularensis*) were correctly tested positive by all but 2 of the 33 participating laboratories. As a notable improvement to some of our previous EQAS distributions, also the *F. tularensis*-negative samples # 2025432 and # 2025434 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 workflow, and none of the investigated samples showed inhibition.

Brucella spp.: All of the 25 participants correctly reported negative results for samples # 2025433 and # 2025434, which did not contain *B. melitensis* target organisms. The two positive samples of the current distribution, # 2025431 containing $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL and sample # 2025432 containing $\sim 1 \times 10^5$ CFUs/mL of *B. melitensis*, were also correctly reported by all of the 24 participants. None of the participants observed any inhibition events in the course of PCR/NAT amplification and detection. 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 # 2025441 contained *Serratia marcescens* with a VIM-4 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), sample # 2025443 contained *Escherichia coli* with an OXA-162 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), sample # 2025444 contained a GES-5-positive *Citrobacter freundii* complex isolate ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL). The fourth sample # 2025442 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes.

All of the 80 participating laboratories reported samples # 2025441 and # 2025443 correctly positive for the presence of a carbapenemase gene. The third positive sample # 2025444 (*C. freundii* complex with a GES-5 gene) was tested positive by only 21 of the 80 participants. Apparently, most of the PCR/NAT assays currently used for molecular detection of carbapenemase genes lack the GES-5 target sequence. This limitation should be kept in mind when discrepancies between phenotypic and molecular testing of carbapenem susceptibility arise. As GES-5 carbapenemases occur among *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa* in increasing numbers in Germany, they represent an important target for this EQAS panel.

For sample # 2025442, which contained a carbapenemase-negative *E. coli* K12 strain, only one false-positive result was reported (probably due to sporadic cross-contamination issues).

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 two *Clostridium difficile*-positive samples: sample # 2025453 with $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL, and sample # 2025452 with $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL. Samples # 2025451 and # 2025454 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. The samples # 2025452 and # 2025453 containing relatively high amounts of *C. difficile* (5×10^5 CFU/mL and $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) were correctly reported as “positive” by 164 and 162 of the 165 participating laboratories, respectively. False-negative results should prompt a thorough evaluation of the test system and the workflow, including a re-assessment of total analytical sensitivity. Re-assessment of the individual assay concept is also warranted for the two participants who reported a false-positive result for sample # 2025454, containing only *E. coli* but no *C. difficile* target organisms. As cross-reaction of the applied test system with *E. coli* DNA is unlikely, probably cross-contamination during the process of sample preparation and analysis is causative. The second *C. difficile*-negative sample # 2025451 was correctly identified as negative by all but one of the 165 participants. All but 4 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 # 2025461 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecium* vanA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), and sample # 2025464 contained an approximately half amount of *Enterococcus faecium* vanB ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL). Sample # 2025462 contained *Lactobacillus rhamnosus* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), and sample # 2025463 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

All of the 63 participating laboratories correctly reported positive results for samples # 2025461 and # 2025464. Also the negative samples # 2025462 and # 2025463 were correctly reported as negative for VRE by all but one participating laboratory. Of note, the reported vanA/vanB differentiation for the two VRE-positive samples were correct with two exceptions. All but one of the participants reported the use of mandatory 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 has recently been 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 71 participants are depicted in Tables 2 to 9 (Attachment 1, p. 25–29) and a good overall correlation between the expected results (Table 1, Attachment 1, p. 25) and the reported results was observed. Briefly, only sporadic false-negative or false-positive results were observed. In general, false-positive results for given species within the multiplex panel 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. 30). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 5 \times 10^4$ organ-

isms/mL) was present in sample # 2025603, and an approximately ten-fold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 5 \times 10^3$ organisms/mL) was present in sample # 2025601. The set was completed by *P. jirovecii*-negative samples # 2025602 and # 2025604, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms next to the lyophilization matrix.

Sample # 2025603 of the current distribution, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL), and sample # 2025601 with a ten-fold lower concentration of *P. jirovecii* were classified as “positive” by 111 and 107 of the 111 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 samples # 2025602 and # 2025604 of the current distribution, both containing no target organisms but only *E. coli* cells and our sample matrix. All of the participating laboratories 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/lab000042.shtml>

1. Anhang1_lab000042.pdf (411 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and fungal genome detection (PCR/NAT)” November 2020

References

1. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4347-8. DOI: 10.1128/JCM.01272-11
2. Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Mertsola J, van der Zee A. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol.* 2006 Aug;55(Pt 8):1043-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46331-0
3. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1998 Mar;36(3):618-23. DOI: 10.1128/JCM.36.3.618-623.1998

Corresponding author:

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

Please cite as

Reischl U, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M,
Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Ehmman R, Scholz H, Fingerle V,
Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und
Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs November
2020 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle
molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen
Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab.* 2021;12:Doc02.
DOI: 10.3205/lab000042, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000426

This article is freely available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2021-12/lab000042.shtml>

Published: 2021-03-22

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/>.