

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2014 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik

Zusammenfassung

Der vorliegende Beitrag liefert einen Auswertungsbericht der jüngsten Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT“. Er fasst die Zielwerte, einige Bezugsgrößen und die Gesamtbewertung der Ergebnisse aller teilnehmenden Laboratorien zusammen.

Diese hochwillkommene Versuchsreihe zur externen Qualitätskontrolle (EQAS, *external quality assessment scheme*) von Methoden der molekularen Diagnostik auf dem Gebiet der medizinischen Mikrobiologie wurde 2002 von der *Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie* (DGHM) angestoßen und wird seither von Instand e.V., Düsseldorf organisiert. Dieses Segment der INSTAND e.V.-Ringversuchsserie wird für diagnostische Laboratorien weltweit angeboten. Unser Ringversuchskonzept entspricht der aktuellen Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiLiBÄK), Teil B3, und basiert auf zwei Validierungsrunden pro Jahr (im Frühjahr und Herbst) unter einer permanent wachsenden Abdeckung der relevanten bakteriellen und fungalen humanpathogenen Erreger. Die entsprechenden Sets von Quality Control (QC)-Proben können dabei neben negativen Proben auch einige stark-positive Proben, Proben mit klinischen Varianten oder eng mit den Zielorganismen verwandte Spezies oder klinische Isolate enthalten. Weitergehende Informationen sowie die statistisch aufgearbeiteten und dokumentierten Ergebnisse der vergangenen Runden dieser Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ können auf der Homepage von Instand e.V. (<http://www.instandev.de>) eingesehen werden. Obwohl die bevorzugte Sprache dieser Dokumente deutsch ist, streben wir an, zumindest eine kurze Diskussion der Ergebnisse sowie die wichtigsten wissenschaftlichen Aspekte in Englisch bereitzustellen und die Tabellen zweisprachig zu gestalten.

Udo Reischl¹
Wulf Schneider¹
Thomas Holzmann¹
Martin Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Wolf Splettstößer⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Martin Kaase⁸

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

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

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Nach erfolgreicher Etablierung dieser neuen Ringversuchs-Serie wollen wir hier auch für Kolleginnen und Kollegen, die bisher noch nicht an diesen Ringversuchen teilgenommen haben, die Ergebnisse der aktuellen Ringversuche für den 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 burnetti**, **Bacillus anthracis**, **Francisella tularensis**, **Pneumocystis jirovecii** (vorm. **P. carinii**) sowie dem neu ins Programm aufgenommenen Ringversuch zur **molekularen Resistenztestung für Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae** darstellen und kurz diskutieren.

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

Wie bei allen anderen Ringversuchen erfolgt die Anmeldung zu ausgewählten Teilen der Reihe „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ über die Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in Medizinischen Laboratorien (INSTAND e.V.), Düsseldorf (<http://www.instandev.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 Home-

page von INSTAND e.V. als pdf-Files zum freien Download bereit.

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 16 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „Highlights“: so wurde beispielsweise im aktuellen **RV 532 Bordetella pertussis** eine Probe mit der zum Zielorganismus verwandten Spezies *Bordetella holmesii* versandt, die ebenfalls das populäre Zielgen IS481 enthält und daher von vielen unserer Ringversuchsteilnehmer als PCR-positiv getestet wurde. Als weiteres „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 539 MRSA/cMRSA** ein **mecC**-positives MRSA-Isolat ausgesandt, das erwartungsgemäß nur von einigen Teilnehmern mit speziell auf dieses „neue“ Methicillin-Resistenzgen abgestimmten Testsystemen detektiert werden konnte. Auch wenn solche **mecC**-positiven MRSA-Isolate derzeit zumindest in unseren Breiten noch sehr selten nachgewiesen werden, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher **mecC**-positiven MRSA-Isolate geweckt werden. Derzeit beschränkt sich der Nachweis von **mecC**-positiven MRSA-Isolaten (methoden- oder prävalenzbedingt?) noch auf einige wenige Einzelfälle. Inwieweit jedoch die Entwicklung und das zusätzliche Mitführen von **mecC**-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen erforderlich sein wird, kann sich erst im Rahmen zukünftiger systematischer Prävalenzstudien zeigen.

Nach dem offenbar sehr erfolgreichen Verlauf der aktuellen Proberingversuchsrunde wird der neue **RV 544** zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von **Carbapenemase-Genen bei Enterobacteriaceae** in das reguläre Ringversuchsprogramm „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. aufgenommen und zukünftig halbjährlich angeboten. Zumindest in der Anfangsphase dieses methodisch anspruchsvollen Ringversuchs zur molekularen Resistenztestung werden wir uns auf das Spektrum der derzeit häufigsten Carbapenemase Gene beschränken: KPC, VIM, OXA-48, GES Carbapenemase, NDM, IMP und

GIM. An der Ringversuchsleitung wird unser geschätzter Kollege **Dr. Martin Kaase** vom Nationalen Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger, Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Ruhr Universität in Bochum maßgeblich beteiligt sein.

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.

Untersuchungsergebnisse Mai 2014

Entsprechend des Grundgedankens unserer Ringversuchsaktivitäten wurde auch bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum „Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)“ bei einigen Zielorganismen der Versand von Proben mit relativ niedrigen Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 1415312), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 1415351), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1415403), *Coxiella burnetii* (Probe # 1415424), *Francisella tularensis* (Probe # 1415433) sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1415601). 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 (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

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

Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der Pro-

benextraktion und -abarbeitung und/oder auf mangelnde Spezifität der eingesetzten Testsysteme zu betrachten.

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Die Tabellen 1 (siehe Anhang 1) zeigen dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in den Tabellen 2 (siehe Anhang 1) nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen, und in den Tabellen 3 (siehe Anhang 1) nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikations-system 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 Richtigeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten, und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen, zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR-Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR-Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: <http://www.udo-reischl.de>; Unterpunkt „Auswertung der Ringversuche“ und natürlich auch über die Homepage von INSTAND e.V. (<http://www.instandev.de/>) als pdf-Files zum freien Download bereit.

Wie gehabt möchten wir uns an dieser Stelle recht herzlich bei allen Kollegen in den zahlreichen nationalen und internationalen Sollwertlaboratorien sowie bei den Kollegen und Mitarbeitern in Jena, Salzburg, Hamburg, Ober-schleißheim, Bonn, Dresden, München, Berlin, Bochum und Regensburg bedanken, die nach wie vor hochmotiviert an der praktischen Umsetzung unseres gemeinsamen Vorhabens zur externen Qualitätssicherung mitarbeiten.

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

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

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Ringversuchen zum kombinierten NAT-gestützten *C. trachomatis* und Gonokokken-Nachweis. Trotz der relativ geringen Erregermenge in den vier unterschiedlich zusammengesetzten positiven Proben führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysensysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive, als auch für negative Befunde.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit relativ geringen Mengen an *C. trachomatis* (# 1415301 und # 1415304, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL), eine Probe (# 1415304) mit ca. 1×10^4 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* und eine Probe mit 10-fach höherer Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen (# 1415303; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL).

Der Übersichtlichkeit halber werden wir bei diesem kombinierten Ringversuch (CT/NG) die Ergebniskonstellation zukünftig in **7 getrennten Tabellen** (siehe Anhang 1, S. 1-3) darstellen. Damit wird die diagnostische Performance der jeweiligen Testsysteme beim Nachweis von CT und NG aussagekräftiger (Tab. 4: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei CT, Tab. 6: Übersichtsdarstellung der Ergebnislage bei NG; jeweils gefolgt von den Richtigkeitsquoten nach aufgeführten Testsystemen in den Tab. 5 und 7; siehe Anhang 1, S. 2-3).

Auch wenn die beiden positiven Proben # 1415301 und # 1415304 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden waren, fanden sich unter den von insgesamt 194 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 2 falsch-positive und 5 falsch-negative Ergebnisse. Da von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den falschen Ergebnissen vermutlich um ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die Proben # 1415303 und # 1415304 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^5 bzw. 1×10^4 CFU/mL) diesmal nur von 2 der insgesamt 192 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA mitgeteilt. Bei den beiden GO-negativen Proben wurden ebenfalls nur von 2 Teilnehmern je ein falsch-positives Ergebnis mitgeteilt.

Angesichts der mit 1×10^4 bis 1×10^5 CFU/mL ehrlicherweise nicht als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an beiden Zielorganismen in den Proben # 1415301, # 1415303 und # 1415304 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen NAT-gestützten Testsysteme geben.

Um eine detaillierter Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen wurden diesmal zusätzlich

die Tab. 4 bis 7 (siehe Anhang 1, S. 2-3) angefertigt. In den Tab. 4 und 5 (siehe Anhang 1, S. 2) sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in den Tab. 6 und 7 (siehe Anhang 1, S. 3) nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet.

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

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (5x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (4x), HAIN Lifescience FluoroType CT (4x), HAIN Lifescience FluoroType NG (4x), TIB Molbiol LightMix *N. gonorrhoeae* (4x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (4x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (5x), Roche Cobas 4800 System (3x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (3x), BD ProbeTec (3x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (3x), Artus *C. trachomatis* (2x), Artus *N. gonorrhoeae* (2x), Amplex Hyplex STD *Chlamydia* und *Neisseria* (2x), Urethritis basic von fast-track Diagnostics (2x), Abbott RealTime CT/NG (1x), AmpliSens *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* PCR Kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex ELISA (1x), BioRad Dx CT/NG/MG Assay (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), Euroclone Duplica Real Time *C. trachomatis* (1x), Euroclone Duplica Real Time *N. gonorrhoeae* (1x), Bioron RealLine *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* (2x), AmpliGnost *C. trachomatis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Surefood CT/NG triplex von Congen (1x), Sacace *N. gonorrhoeae* Real-TM (1x), Sacace *C. trachomatis* Real-TM (1x), Seegene Anyplex™ STI-7 Detection (2x) und Seegene Seeplex STI Master Panel1 (1x).

Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems soll in diesem Zusammenhang auch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in Gegenwart von relativ hohen Mengen an Zielorganismen (bzw. deren Nukleinsäure) die interne Kontrollreaktion aufgrund der „Konkurrenzsituation“ mit der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz durchaus negativ ausfallen kann, obwohl keine Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal eine Probe mit ca. 1×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1415311), eine Probe mit ca. 5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1415312) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1415313 und # 1415314), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den insgesamt

125 Teilnehmern bei den zwei positiven Proben überwiegend korrekte Ergebnisse mitgeteilt.

Von je einem Teilnehmer wurden die Ergebnisse bei den beiden negativen Proben # 1415313 und # 1415314 als „fraglich“ klassifiziert. Bei den beiden negativen Proben # 1415313 und # 1415314, die ausschließlich nicht infizierte Humanzellen und *Escherichia coli* enthielt, sollten die falsch-positiven Ergebnisse bei den zwei betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres DNA-Isolierungsprozesses bzw. des jeweiligen *Chlamydia trachomatis*-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben.

Die markante Übereinstimmung der aktuellen Ergebniskonstellation mit den Beobachtungen und Richtigkeitsquoten vorhergegangener Ringversuche mit ähnlicher Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen kann, zumindest indirekt, erneut als Beleg für eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz der eingesetzten Testsysteme und der Probenabarbeitung angesehen werden.

Auch wenn mit ca. 1×10^3 IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht zu sein scheint, sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität sowohl falsch-negative, als auch falsch-positive Ergebnisse Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Angesichts der nach wie vor anhaltenden Diskussion um das „Pooling“ von entsprechendem Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in-house*-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf hohem Niveau mit geringer statistischer Streuung.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType CT (6x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (4x), VERSANT CT DNA Assay von Siemens (2x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (1x), Bioron *C. trachomatis* PCR (1x), Minerva biolabs Onar CT qPCR (1x), Sacace *C. trachomatis* Real-TM (1x) und AmpliGnost *C. trachomatis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 1415321; *B. pertussis*, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), eine mit etwas geringerer Menge (# 1415323; *B. pertussis* $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) sowie eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella holmesii* als verwandte Spezies

(# 1415324 mit 5×10^5 CFU/mL). Die Probe # 1415322 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Wie schon im letzten Ringversuch bereitete der Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in den Proben # 1415321 und # 1415323 den Teilnehmern keine allzu großen Schwierigkeiten. In der Probe #1415321 mit einer Erregermenge von $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL wurden lediglich zwei falsch-negative Ergebnisse berichtet. Allerdings wurden für die Probe # 1415323 (Erregermenge $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) neun falsch-negative und ein fragliches Ergebnis berichtet. Bei einer Menge von 10^4 CFU/mL an *B. pertussis*-Zielorganismen (entspricht ca. 10^3 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ L) liegt man deutlich über den in früheren Ringversuchsrunden beobachteten unteren Nachweisgrenzen entsprechender PCR-Testsysteme. In der mikrobiologischen Praxis sind vor allem bei Rachenabstrichen gelegentlich auch geringe Erregermengen zu erwarten – daher sollten falsch-negative Ergebnisse bei dem betroffenen Teilnehmer durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung seines jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Erfreulicherweise wurde von keinem Teilnehmer die mit *Escherichia coli* K12 versetzte Probe #1415322 als positiv für *Bordetella pertussis* eingestuft, es wurden ausnahmslos richtig-negative Ergebnisse vermerkt.

Auffällig war beim aktuellen Ringversuch eine hohe Rate an „falsch-positiven“ Ergebnissen für die Probe # 1415324, die diesmal nennenswerte Mengen an *Bordetella holmesii* enthielt. Wie bereits bei vorhergegangenen Ringversuchen erwähnt, ist diese Kreuzreaktion bei der Verwendung von IS481 als „*B. pertussis*-spezifische“ Zielsequenz jedoch ganz einfach zu erklären. Auf dem Genom aller bisher untersuchten *B. holmesii*-Isolate befinden sich einige Kopien der bakteriellen Insertionssequenz IS481. Kopien der Insertionssequenz IS481 wurden auch gelegentlich bei *B. bronchiseptica* gefunden. Dieser Umstand führte bei 113 der 152 Teilnehmer zwangsläufig zu „falsch-positiven“ PCR-Ergebnissen für die Probe # 1415324. Die Inzidenz von *B. holmesii* und *B. bronchiseptica* in klinischen Materialien von Menschen dürfte jedoch (zumindest hierzulande) eher gering sein. Daher erscheint es auch vertretbar, die Sequenz IS481, für die eine Vielzahl von Validierungsdaten vorliegt, auch weiterhin zur NAT-gestützten Diagnostik einer Infektion mit *B. pertussis* einzusetzen. Im Rahmen dieses Ringversuchs wollten wir aber lediglich auf diese potentielle Kreuzreaktion aufmerksam machen und bei Verwendung der IS481-Zielsequenz wurde ein positives Ergebnis für Probe # 1415324 daher nicht als Fehler bewertet. Zudem wurde diese unausweichliche Kreuzreaktion nicht bei der Berechnung der Richtigkeitsquoten für die negativen Ergebnisse berücksichtigt (Tab. 3, siehe Anhang 1, S. 5). Inhibitionskontrollen wurden von 150 der insgesamt 152 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme (63 Teilnehmer) oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifiziertere kommerzielle Testkits mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen (89 Teilnehmer) zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: r-biopharm RIDA GENE Bordetella Real Time PCR (10x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP *B. pertussis* (5x), GeneProof *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit (8x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), ARGENE Bordetella R-gene (2x), Mikrogen Diagenode *B. pertussis/B. parapertussis* kit (2x), Seegene PneumoBacter ACE Detection (1x), Attomol Bordetella-Realtime LT (1x), Ingenetix BactoReal *Bordetella pertussis* (2x), fast-track Diagnostics Bordetella (1x) und Bordetella Real-TM von Sacace (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt Probe # 1415331 des aktuellen Ringversuchs eine relativ hohe Menge an Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* ($\sim 10^5$ Organismen/mL). Die Probe # 1415332 enthielt das gleiche Isolat in einer etwa zehnfach geringeren Menge ($\sim 10^4$ CFU/mL). Probe # 1415333 enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter mustelae* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1415334 ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden beide *H. pylori*-haltigen Proben (# 1415331 und # 1415332) von allen Teilnehmern ausnahmslos als richtig-positiv bewertet und somit eine Richtigkeitsquote von 100% erzielt. Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysensysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Im aktuellen Ringversuch wurde zudem die analytische Spezifität der verwendeten Testsysteme durch die Probe # 1415333 überprüft, welche mit *Helicobacter mustelae* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) eine „non-pylori“ *Helicobacter*-Spezies enthielt. Für diese Probe wurden vier falsch-positive Ergebnisse berichtet sowie ein fragliches Ergebnis. Ein falsch-positives Ergebnis sollte zum Anlass genommen werden, die Spezifität des verwendeten Testsystems zu überprüfen. Die Probe #1415334 enthielt diesmal keine *Helicobacter pylori*-DNA, sondern war lediglich mit *Escherichia coli* K12 versetzt. Diese Probe wurde fälschlicherweise von einem Teilnehmer als positiv gewertet. Hier liegt möglicherweise ein laborinternes Kontaminationsereignis zugrunde und sollte eine Überprüfung der Arbeitsabläufe und ggfs. auch des verwendeten Testsystems nach sich ziehen. Inhibitionskontrollen wurden von 46 der insgesamt 48 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsereignisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Sowohl die kommerziellen, als auch die eigenentwickelten Testsysteme schnitten im aktuellen Ringversuch wieder

einmal erfreulich gut ab. So erreichten die *in-house* Testsysteme wie auch die kommerziellen Assays eine Richtigkeitsquote von 100%, was die richtig-positiven Ergebnisse betrifft. Auch bei den richtig-negativen Ergebnissen waren keine signifikanten Unterschiede in den Richtigkeitsquoten von *in-house* Testsystemen und kommerziellen Assays auszumachen.

Bis auf 25 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 1 x Geno Sen's *Helicobacter pylori* von Genome Diagnostics und 1 x RIDA GENE *Helicobacter* von r-biopharm, angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in-house* Testsysteme.

Wie in der Testbeschreibung des RV 533 vermerkt, konnten die Teilnehmer auf freiwilliger Basis auch die vermeintliche Clarithromycin-Resistenz der untersuchten *H. pylori*-Isolate mitteilen. Diese Spezialuntersuchung zur molekularbiologischen Resistenztestung erfolgt in der Regel über die Amplifikation und Sequenzierung von charakteristischen Bereichen, innerhalb der *H. pylori* 23S rDNA bzw. der Sequenzanalyse dieses Genombereichs, mittels Hybridisierungssonden. Ergebnisse wurden hier von 37 der insgesamt 48 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines einzigen Teilnehmers waren die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

RV 534: EHEC/STEC

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei unterschiedliche, aber relativ stark EHEC positive Proben mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1415342: *E. coli*, *stx*₁⁻, und *eae*-positiv und # 1415344: *E. coli*, *stx*₁⁻, *stx*₂⁻, *eae*⁻, *hlyA*- und O157-positiv) und eine Probe mit 1×10^5 CFU/mL an *Salmonella enterica* ser. Typhi (# 1415341). Probe # 1415343 enthielt einen *E. coli* K12 Stamm (*eae*⁻, *hlyA*-negativ).

In diesem Ringversuch waren keine „exotischen“ Shiga-Toxin-Gene vertreten, sodass, begründet auf die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC, bei allen Proben durchwegs hohe Richtigkeitsquoten – sowohl für positive als auch für negative Befunde – verzeichnet werden konnten. Die beiden EHEC-haltigen Proben # 1415342 bzw. 1415344 wurden von 130 bzw. 132 Teilnehmern als richtig-positiv berichtet. Eine naheliegende Erklärung für die zwei falsch-

negativen sowie ein fragliches Ergebnis der *stx*₁- und *eae*-positiven Probe # 1415342 gibt es ebensowenig wie für das einzige falsch-negative PCR-Resultat bei dem *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiven EHEC-Isolat (Probe # 1415344). Eventuell decken die eingesetzten Testkonzepte der entsprechenden Teilnehmer nicht das gesamte zu erwartende Spektrum an „üblichen“ *stx*₁- und *stx*₂-Genen ab (Gennachweis gilt als molekularer Marker für das Vorliegen von EHEC/STEC bzw. *Shigella dysenteriae* Typ 1 bei *stx*₁).

Die Probe # 1415343 (*E. coli* K12 Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde von nahezu allen Teilnehmern korrekterweise als negativ befundet – sie führte lediglich bei einem der insgesamt 133 Teilnehmer zu einem falsch-positiven Ergebnis. Die Probe # 1415341, welche *Salmonella enterica* ser. Typhi (~1x10⁵ CFU/mL) enthielt, wurde erfreulicherweise von allen Teilnehmern korrekt als negativ für EHEC/STEC berichtet.

Neben *in-house* Testsystemen werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle Assays eingesetzt. In den Richtigkeitsquoten zeigte sich keine Über- bzw. Unterlegenheit eines Systems, was für die breite Etablierung PCR-/NAT-gestützter Testsysteme spricht.

Zudem wurden von 112 Teilnehmern die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin (*eae*)- und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt. Lediglich zwei Teilnehmer berichteten hier unkorrekte Ergebnisse. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: RealStar EHEC PCR Kit von Altona diagnostic (2x), AmpliGnost Verotoxin ½ (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), r-biopharm RIDA GENE EHEC/EPEC (1x), TIB Molbiol LightMix *stx*₁, *stx*₂, *eae* (1x), fast-track Diagnostics (1x) und LightMix Kit von TIB Molbiol (1x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Nachdem die Probenauswahl des letzten Ringversuchs mehr auf die analytische Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzielte, wollten wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Prüfung der analytischen Sensitivität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt somit eine Probe mit einer hohen Menge an *Borrelia garinii* OspA Typ6 (# 1415353, ~1x10⁶ Organismen/mL), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 1415354, ~1x10⁵ Organismen/mL), eine Probe mit relativ geringer Menge (# 1415351, ~1x10⁴ Organismen/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen, die eine relativ hohe Menge *Treponema phagedenis* enthielt (# 1415352, ~1x10⁵ Organismen/mL).

Nochmals eine kurze Rekapitulation: Mittlerweile sind 21 verschiedene dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörige, genetisch eindeutig unterscheidbare Spezies

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

Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen: Die Detektion von *Borrelia garinii* in den Proben mit relativ hoher Erregerlast (# 1415353 mit ~1x10⁶ Organismen/mL bzw. # 1415354 mit ~1x10⁵ Organismen/mL) bereitete keinem der Teilnehmer Probleme, sodass für beide Proben eine Quote richtig-positiver Ergebnisse von 100% erreicht wurde. Bei abnehmender Erregerlast (~1x10⁴ Organismen/mL) wurde von sechs Teilnehmern ein falsch-negatives Ergebnis berichtet. Drei Teilnehmer beobachteten mit ihren *Borrelia*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen ein positives Ergebnis bei der negativen Probe # 1415352.

Da diese Probe die verwandte Spirochäte *Treponema phagedenis* enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr wahrscheinlich. Laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung sind natürlich ebenfalls möglich und sollten ggf. kontrolliert und korrigiert werden. Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von 126 der 128 Teilnehmer mitgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse der PCR-Reaktion wurden im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem Teilnehmer beobachtet.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen (Sensitivität zwischen 99 und 100%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 97%) zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den sechs Teilnehmern, die ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe # 1415351 mit relativ geringer Erregerlast berichteten, fünf davon durch *in-house* Testsysteme generiert wurden. Gegebenenfalls sollte also die Sensitivität der hauseigenen Testsysteme überprüft werden.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (8x), EliGene *Borrelia* LC von Elisabeth Pharmakon (3x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmakon (1x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (2x), RealLine *Borrelia*

burgdorferi Kit von Bioron (1x), Immundiagnostik MutaGEL Borrelia PCR (1x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (2x), Attomol *Borrelia burgdorferi* Realtime (3x) und iXSave Borrelia real time PCR Kit TM von Gerbion (1x).

RV 536: Legionella pneumophila

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine sehr stark positive Probe # 1415362, die mit einer Menge von ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 5 versetzt war sowie eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1415363, ca. 10^5 CFU/mL) an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 5. Die Probe # 1415364 des aktuellen Sets enthielt ca. 105 CFU/mL an *Legionella pneumophila*-Serogruppe 5. Die zweite „negative“ Probe # 1415361 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*.

Diese wurde erfreulicherweise von 105 der insgesamt 108 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Zwei Teilnehmer berichteten ein falsch-positives Ergebnis und ein weiterer Teilnehmer ein fragliches Ergebnis. Da diese Probe lediglich *E. coli*-Zellen enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich. Vermutlich ist das falsch-positive Ergebnis hier durch laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung bedingt.

Die relativ stark positive Probe # 1415362 mit ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG5 wurde mit einer Ausnahme von allen 108 Teilnehmern korrekterweise als positiv interpretiert. Die etwa 10-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 1415363 (ca. 10^5 CFU/mL) konnte ebenfalls von fast allen Teilnehmern korrekt als positiv identifiziert werden. Lediglich zwei Teilnehmer reichten falsch-negative Ergebnisse ein. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für die gute Sensitivität der verwendeten Testsysteme, die allenfalls vereinzelt berichteten falsch-negativen Ergebnisse beruhen vermutlich eher auf anwendungstechnischen Problemen als auf unzureichender analytischer Sensitivi-

tät. Die mit *Legionella pneumophila* (~ 1×10^5 CFU/mL) versetzte Probe wurde von 99 Teilnehmern mit *L. pneumophila*-spezifischen PCR-/NAT-Testsystemen korrekt als negativ befundet. 9 Teilnehmer berichteten ein falsch-positives Ergebnis, was auf eine Kreuzreaktion bzw. mangelnde Spezifität der Zielsequenz zurückzuführen sein dürfte. Vor allem *in-house real-time* PCR Protokolle mit ribosomalen Zielsequenzen zeigten in der Vergangenheit immer wieder Probleme bei der Spezifität. Bei Verwendung von nested Block-Cycler PCR-Protokollen zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung sollte jedoch der Fehler eher auf Anwenderseite gesucht werden (beispielsweise Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung), da dieses Testkonzept in jedem Fall die Unterscheidung der Spezies erlauben sollte.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 57 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Signifikante Unterschiede bezüglich der analytischen Sensitivität zwischen kommerziellen und selbstentwickelten Testsystemen (von 50 Teilnehmern verwendet) fanden sich nicht. Inhibitionskontrollen wurden offenbar von 107 der 108 Teilnehmer durchgeführt, wobei ein Teilnehmer ein signifikantes Inhibitionsergebnis in der mit *E. coli* versetzten „negativen“ Probe berichtete.

RV 537: Salmonella enterica

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit relativ hoher Menge an *Salmonella enterica* ser. Enteritidis (# 1415374; ~ 1×10^5 CFU/mL), eine Probe mit dem gleichen Isolat in einer etwa zehnfach geringeren Menge (# 1415371; ~ 1×10^4 CFU/mL) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1415372 und # 1415373), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu tadellosen Richtigkeitsquoten von 100%. Auch die schwächer positive Probe # 1415371 wurde von allen Teilnehmern korrekt als positiv befundet. In vorausgegangenen Ringversuchen waren bei dieser niedrigeren Erregerlast immer wieder falsch-negative Ergebnisse berichtet worden. Das aktuelle Ergebnis unterstützt somit auch die analytische Sensitivität der eingesetzten Testsysteme.

Da in der aktuellen Ringversuchsrunde keine falsch-positiven Befunde mitgeteilt wurden, deutet dies, im Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden, auch auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin, denn unmittelbar nach der positiven Probe # 1415371 (ca. 10^4 CFU/mL) folgte diesmal eine negative

Probe, die von keinem der 19 Teilnehmer positiv getestet wurde. Das erreichte Niveau konstant zu halten muss jetzt das Ziel sein!

Jeweils ca. die Hälfte der Teilnehmer verwendete kommerzielle bzw. selbstentwickelte Testsysteme. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: r-biopharm RIDA GENE Bacterial Stool Panel (2x), Fast Track Diagnostics Kit (1x) und Diarella Salmonella real time PCR Kit von Gerbion (1x).

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. So wie im Fall der Probe # 1415383, die diesmal relativ hohe Mengen an *L. innocua* enthielt. Probe # 1415384 enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 10^5 CFU/mL), die von allen der insgesamt 36 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1415381 enthielt mit ca. 10^4 CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte.

Wie bereits in vorangegangenen Ringversuchsrunden wurden von den Teilnehmern ganz überwiegend *Listeria monocytogenes*-spezifische Testsysteme eingesetzt. Dies spiegelte sich in der Probe # 1415383 wider, welche eine relativ hohe Menge an *L. innocua* (1×10^5 CFU/mL) enthielt. Lediglich ein Teilnehmer berichtete diese Probe korrekt als positiv. Im Umkehrschluss spricht diese Datenlage jedoch für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung: hält ein Teilnehmer lediglich ein **L. monocytogenes-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben, und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Die Tatsache, dass die „negative“ Probe # 1415382 von allen Teilnehmern korrekt als negativ berichtet wurde, spricht für eine sehr gute Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden Laboratorien.

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

AmpliGnost *L. monocytogenes* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Seegene Meningitis B MultiNA (1x), *L. monocytogenes* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Sacace *L. monocytogenes* Kit (1x), Fast Track Diagnostics Neonatal meningitis (1x) und Diarella *Listeria* real time PCR Kit TM von Gerbion (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 4-er 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.

Nach den zugegebenermaßen etwas umfangreichen und ausführlichen Diskussionen der Ergebniskonstellationen vorhergegangener MRSA-Ringversuche kann die Auswertung des aktuellen Ringversuchs wieder einmal erfreulich kurz gehalten werden. Da wir diesmal, abgesehen von einem „interessanten“ *mecC*-positiven MRSA-Isolat und einer Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken-spezies (eine Konstellation die in der täglichen Praxis nicht gerade selten beobachtet wird), keine besonders „schwierigen“ oder komplexen Probenkonstellationen versandt haben, wurden von den insgesamt 298 Teilnehmern mit ihren unterschiedlichsten NAT-gestützten Testsystemen nahezu durchweg korrekte PCR-Ergebnisse für 3 der insgesamt 4 Proben des aktuellen Panels berichtet. Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1415392 diesmal ein Gemisch aus einem *S. aureus*-Isolat (MSSA, PVL-negativ, $\sim 10^3$ CFU/mL) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; *mecA*-positiv, $\sim 10^3$ CFU/mL), die Probe # 1415394 ein typisches MRSA-Patientenisolat (MRSA; PVL-negativ, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1415391 eine relativ hohe Menge eines **mecC-positiven Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats** (MRSA; PVL-negativ; spa: spa:t10009; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Die letzte der 4 Proben, # 1415393, enthielt

neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der positiven MRSA-Probe # 1415394 von nahezu allen der 298 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 2 falsch-negativen und der 2 als „fraglich“ klassifizierten Ergebnisse bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden von zwei dieser 4 Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) PCR-Testsysteme mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt oder es ging während der Probenaufarbeitung ein gewisser Anteil der Template-DNA bei der DNA-Isolierung oder der Komplettierung der PCR-Ansätze verloren. Angesichts der mit 1×10^4 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1415394 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben.

Im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit vergleichbarer Probenkonstellation wurde bei Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies in Probe # 1415392 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 278 der insgesamt 298 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere 9 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von 5 dieser 9 Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruht. Da mit dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA*-Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall „fraglich“ auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis.

Die restlichen Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Diesen 11 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 1415392 ist dringend anzuraten, ihre Testsysteme zu überprüfen bzw. die methodische Eignung ihres jeweiligen Testkonzepts zu hinterfragen. In der mikrobiologischen Praxis wird relativ häufig die gleichzeitige Anwesenheit einer Methicillin-resistenten (also *mecA*-positiven) Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies und eines Methicillin-empfindlichen (also *mecA*-negativen) *S. aureus*-Isolates in dem entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. In diesem Fall würden die Testsysteme der letztgenannten 11 Teilnehmer vermutlich fälschlicherweise einen Hinweis auf das Vorliegen einer MRSA-Infektion bzw. -Besiedelung anzeigen (mit allen hinlänglich bekannten Konsequenzen

für den betroffenen Patienten!). Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 1415392 in Tab. 3 (siehe Anhang 1, S. 12) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird schnell ersichtlich, dass alle der derzeit etablierten SCC*mec*-basierten Testsysteme bei diesem Gemisch korrekterweise MRSA-negative Befunde liefern (da das *S. aureus*-Genom der MSSA-Komponente ja *de facto* keine integrierte SCC*mec* Kasette aufweist).

Die augenscheinlich „schlechte Datenlage“ bei der MRSA-positiven Probe # 1415391 ist bei näherer Betrachtung schnell erklärt. Hierbei handelt es sich um ein *S. aureus*-Patientenisolat, dessen phänotypische Oxacillin-Resistenz nicht über die Anwesenheit des „üblichen“ *mecA*-Gens sondern vielmehr über das **mecC-Gen** kodiert bzw. vermittelt wird.

Hierbei handelt es sich um mittlerweile zwar mehrfach aber jedoch noch sehr sporadisch beobachtete Oxacillin-resistente *S. aureus*-Isolate, die auf Gesamtgenomebene alle üblicherweise verwendeten *S. aureus*-Speziesmarker aufweisen, sich in der SCC*mec*-orfX Region aber auf Sequenzebene von den „typischen“ MRSA-Isolaten deutlich unterscheiden und zusätzlich noch anstatt des „populären“ *mecA*-Gens ein resistenzvermittelndes *mecC*-Gen mit stark abweichender Gensequenz tragen. Bei den mit diesem *mecA*-Homolog ausgestatteten Bakterienisolaten erfolgt die Integration des *mecC*-Gens innerhalb einer neuartigen SCC*mec* Genkasette vom Typ XI in das *S. aureus*-Genom (selbst auf Aminosäureebene weisen das *mecA*- und *mecC*-Genprodukt eine Homologie von weniger als 63% auf). Diese signifikanten Sequenzunterschiede führen bei allen kommerziellen oder *in-house* SCC*mec*-basierten PCR-Testsystemen, die nicht auf die speziellen Gensequenzen des *mecC*-Gens hin optimiert wurden, zwangsläufig zur „Nichtererkennung“ solcher *mecC*-positiven MRSA-Isolate. Das MRSA-Isolat im Probe # 1415391 konnte daher (erwartungsgemäß) nur von einigen Teilnehmern mit speziell auf dieses „neue“ Methicillin-Resistenzgen abgestimmten Testsystemen detektiert werden. Auch wenn solche *mecC*-positiven MRSA-Isolate derzeit zumindest in unseren Breiten noch sehr selten nachgewiesen werden, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher *mecC*-positiven MRSA-Isolate geweckt werden. Derzeit beschränkt sich der Nachweis von *mecC*-positiven MRSA-Isolaten (methoden- oder prävalenzbedingt?) noch auf einige wenige Einzelfälle. Inwieweit jedoch die Entwicklung und das zusätzliche Mitführen von *mecC*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen erforderlich sein wird, kann sich erst im Rahmen zukünftiger systematischer Prävalenzstudien zeigen.

Um die Ergebnislage in Tab. 3 (siehe Anhang 1, S. 12) nicht allzusehr durch die *mecC*-Problematik zu verzerren, haben wir diesmal eine zusätzliche Tab. 4 (siehe Anhang 1, S. 13) angefertigt. Hier sind explizit die Richtigkeitsquoten der einzelnen Testsysteme ohne Berücksichtigung der Probe # 1415391 aufgeführt.

Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1415393), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von zwei der 298 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 nahezu 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion.

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

Abgesehen von der besagten Probe mit dem *mecC*-positiven MRSA-Isolat spricht die Ergebnislage dieses Ringversuchs erneut für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine-Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende (PVL-negative) Ergebnisse der molekulargenetischen PVL-Testung wurden von 65 der insgesamt 298 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diese diesmal durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA bzw. CA-MRSA-Problematik finden sich beispielsweise unter [2] oder [3]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR-Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in [4]. Mittlerweile sind auch schon einige kommerzielle *real-time* PCR-Testsysteme für den zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis von PVL-Genen bei MRSA- und MSSA-Isolaten verfügbar (z.B. von r-biopharm oder von TIB Molbiol).

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: r-biopharm RIDAGENE MRSA PCR (21x), HAIN Lifescience FluoroType MRSA (8x), HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (6x), HAIN Lifescience Genotype MRSA (1x), Alere detect ready MRSA Panel Plus (2x), Sentosa SA MRSA PCR test von VELA diagnostics (2x), TIB Molbiol LightMix MRSA (1x), Roche Cobas 4800 System (1x), Amplex hyplex MRSA (1x) und Diarella MRSA real time PCR Kit TM von Gerbion (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1415401; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1415403; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/mL), eine Probe mit sehr geringer Menge (# 1415402; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1415404; nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen).

Analog zu vorhergegangenen Ringversuchen wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die hervorragende analytische Sensitivität und Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z. T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 14) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch alle Teilnehmer die Zielorganismen in der positiven Probe # 1415401 (ca. 10^5 IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Auch die zehnfach geringere Menge an Zielorganismen der Probe # 1415403 konnte von 128 der 129 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die sehr geringe Erregermenge in Probe # 1415402 (10^3 IFU/mL) wurde erfreulicherweise auch von fast allen teilnehmenden Laboratorien erfasst und korrekt bewertet. Für diese Probe fanden sich nur vier falsch-negative Ergebnisse, dennoch sollte von diesen Teilnehmern die Sensitivität des eingesetzten Testsystems sowie die Arbeitsabläufe evaluiert werden, auch wenn es sich zugegebenermaßen um eine geringe Erregerlast handelt.

Für die Probe ohne Zielorganismen # 1415404 (*Escherichia coli*) dokumentierten 126 der 129 Teilnehmer ein korrektes negatives Ergebnis. Daneben fanden sich für diese Probe noch zwei falsch-positive und ein fragliches Ergebnis. Dies unterstreicht einerseits aufs Neue die hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *C. pneumoniae*-DNA. Andererseits könnte es sich bei den beiden isoliert falsch-positiven Ergebnissen eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln.

Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA *E. coli* erscheinen eher als unwahrscheinlich.

Eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion in einer der versandten Proben (# 1415404) wurde von einem der Teilnehmer beobachtet, Inhibitionskontrollen wurden von insgesamt 128 der 129 Teilnehmer durchgeführt.

Selbstentwickelte *in-house* NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae* DNA wurden von 56 Labors eingesetzt, kommerzielle Assays wurden von 79 Teilnehmern verwendet.

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

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 14 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 7 Teilnehmern der Diagenode MP/CP Kit und von 2 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit angegeben. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit (9x), GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (9x), AmpliGnost Easy Mag *C. pneumoniae* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Biomerieux Argene Chla/Myco pneumo r-gene (3x), Ingenetix Bacto Real *Chlamydomydia pneumoniae* (2x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE detection (2x), Seegene PneumoBacter MultiNA (1x), Fast Track Diagnostics FTD Atypical CAP Kit (2x), Fast Track Diagnostics FTD Respiratory pathogens 33 (1x), Mikrogen Diagenode *Mycoplasma/Chlamydomydia pneumoniae* Real Time PCR (1x), Immundiagnostik MutaPLATE *C. pneumoniae* (1x), RespiFinder SMART 22 FAST (1x), Vircell Speed-oligo *Chlamydomydia pneumoniae* (1x) und Euroclone Duplica Real Time *C. pneumoniae* (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 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Dieses Mal waren jedoch keine Proben mit geringen Mengen an Zielorganismen im ausgesandten Probenset vertreten.

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1415412 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL) und Probe # 1415414 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL). Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielt Probe # 1415413 (*Mycoplasma genitalium*; $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) diesmal nennenswerte Mengen an einer zu dem Zielorganismus verwandter Mykoplasmen-Spezies. Probe # 1415411 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Ausnahmslos konnten die 135 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1415412 problemlos und zuverlässig nachweisen. Der Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA in der etwas schwächer positiven Probe # 1415414 gelang 133 von 135 Teilnehmern.

Zum Vergleich sei hier kurz auf den vorhergehenden Ringversuch November 2013 verwiesen: hier konnten 103 von 104 Teilnehmern die *M. pneumoniae*-DNA in einer vergleichbar konzentrierten positiven Probe mit ca. 105 Genomkopien/mL nachweisen. Für die mit *E. coli* versetzte „negative“ Probe # 1415411 wurde erfreulicherweise nur ein falsch-positives Ergebnis berichtet. Zugrundeliegen dürften diesem am ehesten sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bei der Probenextraktion und -abarbeitung. Für die zweite „negative“ Probe, welche mit $\sim 10^5$ Genomkopien/mL *Mycoplasma genitalium* – einer dem Zielorganismus verwandten Bakterien-spezies – versetzt war, wurden von 9 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse berichtet, 125 Labors befundeten diese Probe korrekt als negativ. Bei den falsch-positiven Ergebnissen könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Eventuelle Kreuzreaktivitäten der *M. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von anderen Mykoplasmen-Spezies sollten von den betroffenen Teilnehmern abgeprüft und die entsprechenden Testkonzepte ggf. nachgebessert werden. Insgesamt jedoch zeigte die Ergebniskonstellation in einem breiten Teilnehmerfeld mit unterschiedlichsten Testsystemen und PCR-Protokollen eine relativ hohe analytische Spezifität der eingesetzten PCR/NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae*-DNA.

Selbstentwickelte PCR-/NAT-Testsysteme kamen bei 62 Teilnehmern zum Einsatz, während 72 Teilnehmer kommerzielle Testsysteme verwendeten. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit (9x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (9x), AmpliGnost *M. pneumoniae* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), Biomerieux Argene Chla/Myco pneumo r-gene

(3x), Fast Track Diagnostics FTD Respiratory pathogens 21 (2x), Fast Track Diagnostics FTD Atypical CAP (2x), In-genetix Bacto Real *Mycoplasma pneumoniae* (2x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE detection (1x), Vircell Speed-oligo *Mycoplasma pneumoniae* (1x), Immundiagnostik MutaREAL *M. pneumoniae* (1x), Seegene PneumoBacter MultiNA (1x), Euroclone Duplica Real Time *M. pneumoniae* (1x) und RespiFinder SMART 22 FAST (1x). Die Richtigkeitsquoten lagen bei *in-house* und vorkonfektionierten Assays auf vergleichbarem Niveau.

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 4-er Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Coxiella burnetii* ($\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1415424 und $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1415423), zwei Proben mit 5-fach unterschiedlicher Menge an *Bacillus anthracis*-DNA ($\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1415422 und $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1415423) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1415421), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Der Übersichtlichkeit halber haben wir uns bei diesem kombinierten Ringversuch entschlossen, die Ergebnislage für die beiden unterschiedlichen Erreger auch in zwei getrennten Tabellen darzustellen: für *Coxiella burnetii* in den Tab. 2 und 3 (siehe Anhang 1, S. 16) sowie für *Bacillus anthracis* in den Tab. 4 und 5 (siehe Anhang 1, S. 17).

Coxiella burnetii: Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich einfach. Sowohl die etwas stärker positive Probe # 1415423 mit ca. 10^4 Genomkopien *C. burnetii*/mL als auch die zweite positive Probe # 1415424 des Probesets mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an *C. burnetii* (ca. 10^3 Genomkopien/mL) wurde diesmal von allen der insgesamt 27 Teilnehmer mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Diese Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus den vorherigen Ringversuchen. Bei der Probe ohne Zielorganismus # 1415421 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) wurde von einem Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis berichtet, was am ehesten auf laborinterne Kontaminationsereignisse zurückzuführen sein dürfte. In Anbetracht der Tragweite eines falsch-positiven Nachweises eines L3-Erregers sollten alle Anstrengungen unternommen werden, Kontaminationen bei Aufbereitung und Abarbeitung der Proben zu verhindern. Die zweite

„negative“ Probe # 11415422, welche ca. 1×10^4 Genomkopien/mL *Bacillus anthracis*-DNA und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt, wurde von allen 27 Teilnehmern korrekt als negativ berichtet.

Mit 20 diagnostischen Labors, welche *in-house* Testsysteme zum spezifischen Nachweis von *C. burnetii* verwenden, waren die selbstentwickelten Assays den vorkonfektionierten kommerziellen Testkits zahlenmäßig überlegen. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA von 26 der 27 Teilnehmer enthielten eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Bacillus anthracis: Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt und kann bayerisch-prägnant mit „baßt scho“ zusammengefasst werden.

Alle der 16 Teilnehmer konnten mit ihren jeweils vor Ort etablierten *Bacillus anthracis* spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die beiden positiven Proben mit ca. 1×10^4 Genomkopien/mL (# 1415422) und mit ca. 5×10^4 Genomkopien/mL (# 1415423) an *Bacillus anthracis*-DNA erfolgreich nachweisen.

Ebenfalls von allen der 16 Teilnehmer wurden korrekt negative Ergebnisse für die Proben ohne entsprechende Zielorganismen # 1415421 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie # 1415424 (nur *Coxiella burnetii* mit ca. 10^4 Genomkopien/mL und eine Suspension aus humanen Zellen) beobachtet. Insgesamt eine sehr erfreuliche Gesamtsituation.

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

RV 543: *Francisella tularensis*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 18) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1415432 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1415431 mit ca. zehnfach geringerer Menge (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^4$

CFU/mL) und Probe # 1415433 mit ca. $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL an *F. tularensis* spp. *holarctica*. Im Ringversuchssprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (#1415434), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier alle der 16 Teilnehmer die relativ stark positive *F. tularensis* spp. *holarctica*-Probe # 1415432 sowie die etwa 10-fach geringer konzentrierte Probe # 1415431 mit ihren NAT-gestützten Testsystemen korrekt identifiziert. Ein negatives Ergebnis wurde für diese beiden Proben von keinem der teilnehmenden Laboratorien berichtet. Die Probe mit der geringsten Erregermenge ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) konnte noch von 13 der 16 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die drei falsch-negativen Bewertungen sollten Anlass geben, das verwendete Testsystem bzgl. Sensitivität zu evaluieren und ggfs. zu optimieren. Die *F. tularensis*-negative Probe # 1415434 wurde von allen Teilnehmern erfreulicherweise durchgehend als negativ befundet. Die gesamte Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorherigen Ringversuchen und spricht erneut für ein gutes Funktionieren sowohl der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme, als auch der implementierten laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

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

RV 544: Carbapenemase-Gene

Dieser aktuell als Probe-Ringversuch durchgeführte Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Carbapenemase-Gene“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zur molekularen Resistenztestung bzw. dem Direktnachweis von charakteristischen Carbapenemase-Genen aus DNA-Präparationen von Reinkulturen an Enterobacteriaceae** konzipiert. Zum orientierenden Herantasten an die technische Eignung und die „Praktikabilität“ der versandten Probenmaterialien werden wir uns in den ersten Runden dieses methodisch anspruchsvollen Ringversuchs zur molekularen Resistenztestung auf die Abprüfung eines kleinen Spektrums der derzeit häufigsten Carbapenemase Gene bei *Enterobacteriaceae* beschränken: KPC, VIM, OXA-48 ähnliche Gene, GES-Carbapenemase, n NDM, IMP und GIM.

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 19) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1415441 enthielt *Escherichia coli* Zielorganismen mit NDM-1 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL), Probe # 1415442 enthielt *Enterobacter cloacae* Zielorganismen mit VIM-1 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL) und Probe # 1415444 enthielt ein *Klebsiella pneumoniae*-Isolat mit KPC-3 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL). Die vierte Probe

1415443 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

Betrachtet man die aktuelle Ergebnislage so waren unsere sorgfältigen und systematischen Evaluierungsaktivitäten im Vorfeld dieses Proberingversuchs erfreulicherweise offenbar zielführend. Sowohl die Probe # 1415441 mit NDM-1 positiven *E. coli* sowie die Probe # 1415442 mit VIM-1 positiven *E. cloacae*-Zielorganismen wurden von allen der insgesamt 26 Teilnehmer korrekterweise als positiv befundet.

Bei der Probe # 1415444 mit einem Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae*-Isolat konnten leider nur 23 der insgesamt 26 Teilnehmer das resistenzvermittelnde KPC-3 Gen eindeutig nachweisen. Bei einem falsch-negativen Ergebnis sollte unbedingt eine Fehlersuche erfolgen, da ein molekularbiologischer Test die bedeutende Carbapenemase KPC aus Koloniematerial sicher erkennen muss. Denkbar ist, dass nach DNA-Präparation aus den lyophilisierten Proben des Ringversuchs geringere DNA-Mengen erhalten werden als nach Einsatz von Koloniematerial. Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1415443), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

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

Selbstentwickelte *in-house* NAT-Testsysteme zur Detektion von Carbapenemase-Genen wurden von 13 der insgesamt 26 teilnehmenden Laboratorien eingesetzt. Die andere Hälfte gab im Ergebnisformular die Verwendung von kommerziellen Testkonzepten oder -kits an. Aufgrund der leider noch nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Bezogen auf die individuell ermittelten Richtigkeitsquoten in Tab. 3 (siehe Anhang 1, S. 19) war die gesamte Ergebnislage bei diesem Proberingversuch jedoch sehr gut.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Dieser im Jahr 2013 neu in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch RV 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis von *Pneumocystis jirovecii***

DNA in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe (Tab. 1, siehe Anhang 1, S. 20): eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 1415602; *Pneumocystis jirovecii*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1415604; *Pneumocystis jirovecii*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1415601; *Pneumocystis jirovecii*, $\sim 2 \times 10^3$ Genomkopien/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1415603), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Erfreulicherweise hat sich auch in der aktuellen Ringversuchsrunde die überaus gute Ergebnislage des im Mai 2013 erstmals regulär durchgeführten Ringversuchs RV 560 bestätigt. Sowohl die am stärksten positive Probe # 1415602 mit ca. 1×10^5 Genomkopien/mL sowie die etwas schwächer positive Probe # 1415604 mit ca. 1×10^4 Genomkopien/mL wurde von nahezu allen der insgesamt 84 Teilnehmer als positiv befundet.

Lediglich zwei der 84 Teilnehmer erzielten bei der am stärksten positiven Probe (# 1415602) wie auch bei der etwas schwächer positiven Probe (# 1415604) ein falsch-negatives Ergebnis. Angesichts der mit mehr als 10^4 Genomkopien/mL nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten diese falsch-negative Ergebnisse den betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben. Der zuverlässige Nachweis von *Pneumocystis jirovecii*-DNA in der relativ schwach positiven Probe (# 1415601) mit ca. $\sim 2 \times 10^3$ Genomkopien/mL gelang immerhin noch 75 aller 84 Teilnehmer. Die Ergebnisse der Probe wurden bei diesem RV nicht in die Bewertung für das Zertifikat mit einbezogen, da diese relativ geringe Menge an Zielorganismen zum ersten Mal eingesetzt wurde. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 20) gekennzeichnet. Angesichts der mit 2×10^3 Genomkopien/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen und angesichts der zuverlässigen Detektion durch die überwiegende Mehrheit unserer Ringversuchsteilnehmer sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1415601 den betroffenen 8 Teilnehmern dennoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1415603), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs lediglich von einem Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis beobachtet. In diesem Fall liegt das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontaminationsereignisses oder einer Kreuzkontamina-

tion während der Probenextraktion und -abarbeitung nahe. Andererseits sprechen 83 richtig-negative Ergebnisse für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen im Teilnehmerkreis.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: r-biopharm RIDAGENE *Pneumocystis jirovecii* (6x) und AmpliGnost *P. jirovecii* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x).

Nicht zuletzt aufgrund dieser erfreulichen Ergebnislage werden sich in den zukünftig ausgesandten 4-er Sets auch immer positive Proben befinden, die relativ geringe Genommengen des entsprechenden Zielorganismus enthalten.

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000013.shtml>

1. Anhang1_lab000013.pdf (426 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ Mai 2014

Literatur

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;24(1):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Udo Reischl
Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene,
Universitätsklinikum Regensburg (UKR),
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg,
Deutschland, Tel.: +49-(0)941-944-6450
udo.reischl@ukr.de

Bitte zitieren als

Reischl U, Schneider W, Holzmann T, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, Splettstößer W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2014 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab.* 2014;5:Doc03. DOI: 10.3205/lab000013, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000133

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000013.shtml>

Veröffentlicht: 01.07.2014

Copyright

©2014 Reischl et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.

Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: discussion of the May 2014 distribution for external quality assessment of nucleic acid-based protocols in diagnostic medical microbiology by INSTAND e.V.

Abstract

This contribution provides an analysis report of the recent proficiency testing scheme "Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)". It summarizes some benchmarks and the overall assessment of results reported by all of the participating laboratories.

A highly desired scheme for external quality assessment (EQAS) of molecular diagnostic methods in the field of medical microbiology was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. This segment of the INSTAND e.V. proficiency testing program is open for diagnostic laboratories worldwide. The concept of this EQAS scheme, which is in accordance to the "Directive of the German Medical Association for quality assurance of medical laboratory examinations" (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 quality control (QC) specimens may contain some strong-positive samples, samples spiked with clinical variants or species closely related to the target organisms. Further information as well as the statistically documented and discussed results of the past rounds of this proficiency testing scheme "Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)" can be found at the homepage of INSTAND e.V. (<http://www.instandev.de>). Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least a brief discussion of the results and some key issues in English and keep the tables in a bilingual style.

Udo Reischl¹
Wulf Schneider¹
Thomas Holzmann¹
Martin Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Wolf Splettstößer⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Martin Kaase⁸

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

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

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

4 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

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

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

7 Institute for Medical Microbiology, Immunology

and Parasitology (IMMIP),
University of Bonn, Germany

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

Brief discussion of the current results

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

Examination results May 2014

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

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

The current set of QC samples contained two samples with almost identical amounts of *C. trachomatis* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL; sample # 1415301 and sample # 1415304), two samples with various amounts of *N. gonorrhoeae* organisms ($\sim 10^4$ CFU/mL in sample # 1415304 and $\sim 10^5$ CFU/mL in sample # 1415303) and one sample without target organisms (# 1415302).

Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target cells in the positive samples # 1415301 and # 1415304, only 2 false-positive and 5 false-negative results were observed among the *Chlamydia trachomatis*-specific results, reported by the 194 participants. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by only 2 of the 192 participants for samples # 1415303 and # 1415304, which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of 1×10^5 CFU/mL and 1×10^4 CFU/mL respectively. Also false-positive results for the two GO-negative samples were reported by 2 participants.

Since the amount of target organisms in samples # 1415301, # 1415303 and # 1415304 (1×10^4 – 1×10^5 CFU/mL) could not be considered as „extremely low“, false negative results should encourage the participants to review and optimize their CT- and GO-specific NAT-based assays.

Inhibition controls were included by all of the 194 participants and no inhibitory events were reported.

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

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained two positive samples: # 1415312 with $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms and sample # 1415311 with $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Samples # 1415313 and # 1415314 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

As depicted in Tab. 2 (see Attachment 1, p. 4), the reported results were generally correct for the three positive samples.

For the *C. trachomatis*-negative samples # 1415313 and # 1415314 containing only non-infectious human cells and *E. coli*, 2 false-positive results were observed of the 125 participants.

False positive results should encourage the participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system. For both negative samples # 1415313 and # 1415314, results were classified as „questionable“ from one participant each. For questionable results, certificates are only issued when correct results are reported by the participant for the remaining 3 samples of RV 531.

This striking match of the current results with observations and accuracy rates in the last years can be considered as an evidence for a high reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing. Run controls were performed by all of the 125 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 125 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1415321; 5×10^5 CFU/mL), one sample with an approximately tenfold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1415323; 1×10^4 CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella holmesii* (# 1415324 with $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1415322).

The availability of well-established commercial or *in-house* NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only two of the 152 participants reported a false-negative result for the sample # 1415321 (*B. pertussis*, 5×10^5 CFU/mL). Sample # 1415323 contained $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *Bordetella pertussis* and was correctly reported by 142 of the 152 participants. The amount of 10^4 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms is significantly above the previously observed lower limit of detection for the corresponding PCR assays or test systems. False-negative or questionable results should therefore lead to re-evaluations of the assay sensitivity. Sample # 1415322 contained only *E. coli*. All participants correctly reported this sample as negative for *Bordetella pertussis*. Sample # 1415324 contained the related *Bordetella* species *Bordetella holmesii*. As this strain also contains the IS481 insertion sequence which is a common target sequence to identify *Bordetella pertussis*, participants with IS481-based assays reported „false“-positive results. 39 laboratories identified this sample as negative for *Bordetella pertussis*, whereas 113 laboratories reported positive results. We included the *Bordetella holmesii*-containing sample to raise awareness for the issue of cross-reaction between these species. Consequently, false-positive results of participants had no negative effects on issuing the QC certificate. Of the 125 participants, 124 performed inhibition controls. Inhibition of the PCR-NAT-reaction was not reported. For the detection of *B. pertussis*, most participants used *in-house* test concepts.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained two samples with a clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain. Sample # 1415331 contained approximately 1×10^5 CFU/mL and sample # 1415332 approximately 1×10^4 CFU/mL of the respective target organisms. Sample # 1415333 contained culture suspensions of the related species *Helicobacter mustelae* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL).

The availability of well evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in the two *Helicobacter pylori*-positive samples (# 1415331: $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL and # 1415332: $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) led to positive predictive values of 100%.

One false-positive results was observed among the 48 participants for sample # 1415334, which contained only a significant number of *E. coli* cells within our proprietary sample matrix. Of note, four false-positive results and one questionable result were reported for

sample # 1415333, containing $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL *Helicobacter mustelae*. This may be indicative of lacking specificity of the applied test system and should prompt re-evaluation

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 37 of the 48 participants. With one exception, the results were correct.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed previously, the challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenic factors (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1415344 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive) and # 1415342 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-negative, *eae*-positive and *hlyA*-negative). The other two EHEC-negative samples contained a *Salmonella enterica* ser. Typhi strain (sample # 1415341; 1×10^5 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1415343).

All participants correctly reported negative results for sample #1415341, containing only *Salmonella enterica* ser. Typhi. The second „negative“ sample (# 1415343), containing only *E. coli* K12 was with one exception also correctly commented as negative. For the EHEC/STEC positive samples # 1415342 and 1415344, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in consistently high accuracy rates. Sample # 1415342 was correctly reported positive by 130 of the 133 participants, while even 132 participants identified sample # 1415344 as positive.

As in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test, most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain more on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection techniques were performed by 112 of the 133 participating laboratories. With one exception, the reported results were correct. None of the participants observed significant inhibition of the NAT-reaction.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Due to numerous requests, here a short note for our participants outside Europe: as this proficiency testing

panel is designed for a specific and sensitive detection of *B. burgdorferi* sensu lato DNA, the positive samples **do not necessarily** contain suspensions of „prototype“ isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto and in many of the bi-annual rounds of our external quality assessment (EQAS) scheme also **other *B. burgdorferi* genotypes or genospecies will be present** in individual samples.

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

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *B. garinii* organisms in our proprietary matrix: sample # 1415353 (1×10^5 CFU/mL), sample # 1415354 (1×10^5 CFU/mL) and sample # 1415351 (1×10^4 CFU/mL). Sample # 1415352 contained no *Borrelia* organisms but a strain of *Treponema phagedenis*.

With the exception of 6 false-negative results for sample # 1415351 (containing the lowest amount of the target organism), all other *B. garinii*-containing samples were correctly identified by the participants. The false-negative results should prompt re-evaluation of the assay sensitivity.

The „negative“ sample # 1415352 was classified false-positive by three laboratories. Potentially, this is either due to cross-reactivity with this closely related spirochete or due to a contamination during sample preparation or analysis. Therefore, the workflow should be optimized to minimize clinically misleading false-positive results.

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

RV 536: Legionella pneumophila

Due to numerous requests: this test is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for direct detection of low amounts of *Legionella pneumophila* from appropriate clinical specimen (such as respiratory specimens for example). Individual samples may contain relatively small amounts of the corresponding target organism. For this reason, participation is promising only for diagnostic laboratories, which have established a highly sensitive and specific PCR/NAT-based method

for the detection of *L. pneumophila* DNA or who want to evaluate their method with the help of an external quality control.

The current set of QC samples contained two positive samples with *Legionella pneumophila* serogroup 5 (# 1415362; $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL and # 1415363; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), as well as one sample containing *Legionella dumoffii* (# 1415364; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1415361 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ($\sim 1 \times 10^6$ and $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) samples # 1415362 and #1415363 were correctly tested positive by 107 and 106 of the 108 participating laboratories, respectively. Sample # 1415364, which contained $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL was classified as false-positive by 9 laboratories. This should prompt investigations regarding the species-specificity of the applied test system. Additionally, three participants did not report a negative result for sample # 1415361, which contained only *E. coli*. As cross reaction is unlikely, accidental contamination during the process of sample preparation and analysis is most likely to be causative. Therefore, the workflow during the process should be re-checked. All but one participant included inhibition controls in their test systems. One laboratory reported significant inhibition of the PCR-/NAT-reaction for sample #1415361, whereas all other samples showed no inhibition.

RV 537: Salmonella enterica

The current set of QC samples contained two samples with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (sample # 1415374 with 1×10^5 CFU/mL, and sample # 1415371 with 1×10^4 CFU/mL). Sample # 1415372 and sample # 1415373 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. All participants reported correct results for all samples. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays and an improved procedure with regard to the prevention of contamination events during the individual sample preparation and PCR/NAT analytics in the participating diagnostic laboratories. Inhibitory events in the PCR-/NAT-reaction were not detected by any of the participants.

RV 538: Listeria spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1415382; only *E. coli* cells), two samples positive for *L. monocytogenes* (# 1415384 and # 1415381) and one sample with *Listeria innocua* (# 1415383) as *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. The *Listeria monocytogenes*-containing samples (# 1415381 and # 1415384) were correctly reported positive by all participants. In addition, the „negative“ *E. coli* containing sample # 1415382 was also identified as negative by all laboratories. Most of the participants used *Listeria monocytogenes*-specific assays, which is reflected by the high number of „false-negative“

results for sample # 1415383, containing 1×10^5 CFU/mL *L. innocua*. Only one participant reported a positive result for this sample. However, as noted in the report form, participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT-assays may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. In this case, (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species do not negatively affect issuing the corresponding QC certificates. In sum, the current results indicate a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA DNA in typical clinical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs, so the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a background of human cells and other components. It is therefore important to note that NAT assays designed mainly for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set. Despite of one sample containing an MSSA isolate together with a methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus* species and one sample containing a *mecC* positive MRSA isolate, no „difficult“ or „interesting“ sample was included into the current panel. All 298 participants consistently reported correct results for 3 of 4 samples this time.

Sample # 1415392 of the current set contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) and a CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-positive, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). One sample of the current set (# 1415393) contained no target organisms but only *E. coli* cells. Sample # 1415391 contained a relatively high number of a ***mecC* positive and methicillin resistant *S. aureus*** isolate (MRSA, PVL-negative, spa:t10009; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1415394 contained a typical MRSA isolate (MRSA, PVL-negative; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL).

The MRSA negative sample # 1415393 was tested by 296 of 298 participants with their PCR-based MRSA-specific assays as „negative“, so only two participant observed a false positive result, which may have probably been caused by contamination with MRSA DNA during the sample preparation, amplification or detection. Fortunately, for the positive MRSA sample # 1415394, positive results were reported by nearly all of the 298 participants. Two false-negative results were reported and two participants interpreted their results as „questionable“. Affected participants are encouraged to analyse and optimize their NAT-based assays, because the amount of MRSA target organisms (1×10^4 CFU/mL) was not abnormally low.

For the sample # 1415392, which contained a MSSA isolate together with a Methicillin resistant coagulase-

negative *Staphylococcus* species, 278 of all 298 participants reported their results correctly as „MRSA-negative“ and 9 participants classified the results as „questionable“. Five of these 9 participants indicated the use of test systems, which are based on a separated detection of the *mecA* gene and *S. aureus* specific target genes. In this case, the origin of the *mecA* target gene cannot definitively be correlated with the *S. aureus* or the coagulase-negative *Staphylococcus* species. Regarding this aspect, „questionable“ is the scientifically correct result for these assays. The remainder 11 participants reported false-positive results for MRSA for sample # 1415392, containing a mixture of a MSSA isolate and a methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococcus* species. These participants are encouraged to analyse the suitability of their test systems, as the described constellation is a relatively common scenario for microbiological routine diagnostic of MRSA. As Tab. 3 (see Attachment 1, p. 12) shows, all of participants, who the established SCCmec based NAT-assays for the detection of MRSA reported consistently correct (MRSA-negative) results.

The overall poor assay performance for MRSA positive sample # 1415391 is quickly explained after taking a closer look on the isolate included in this sample, which was a *S. aureus* patient isolate, where the phenotypic resistance for Oxacillin is not encoded by the „usual“ *mecA* gene, but the genetically distinct *mecC* gene.

These sporadically observed Oxacillin resistant *S. aureus* strains that include all commonly used genetic markers on the genome level inclusive of the SCCmec-orfX region, but on the sequence level, these MRSA strains clearly differ from isolates harboring the „popular“ *mecA* gene in their genome and are carrying a resistance mediating *mecC* gene instead with a strongly divergent gene sequence. This significant differing nucleotide sequence inevitably lead to false-negative results for MRSA in all commercial or *in-house* SCCmec-based PCR test systems, which were not yet optimized in the specific gene sequences of the *mecC* gene. As expected, the MRSA isolate in sample # 1415391 could only be detected by participants, who were using specially optimized assays for the detection of this „new“ Methicillin resistance gene. Even if such *mecC* positive MRSA isolates are rarely detected in our latitudes, this QC-panel aims to at least draw attention to the possible occurrence of such *mecC* positive MRSA isolates. Although *mecC* positive MRSA are currently rarely detected (caused by an analytical gap or by a low prevalence?), the necessity of optimizing available NAT assays for the detection of *mecC* can only be clarified by further scientific studies on the *mecC* prevalence. To avoid biasing the results in Tab. 3 (see Attachment 1, p. 12) by the *mecC* issue, we have included an additional Tab. 4 (see Attachment 1, p. 13) this time. Here, we listed the accuracy rates of each assay without taking the results for sample # 1415391 into account. Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported a correct result, predominantly correctly positive results for one positive sample and correctly negative findings for the 2 MRSA negative

samples. This indicates excellent sample workup functioning of laboratory-specific prevention measures to avoid the risk of contamination and carry-over events.

Also, an optional molecular detection of putative pathogenicity factor **PVL (Panton-Valentine Leukocidin)** or its coding gene *lukF/S-PV* was inquired. Corresponding results were reported by 65 of the total 298 participating laboratories and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were correct in all but one case. Additional information can be found at [2] or [3]. A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at [4].

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

RV 540: Chlamydia pneumoniae

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

To assess the analytical sensitivity of the NAT-assays used by the individual participating laboratories, the current set of QC samples contained a kind of dilution series of *C. pneumoniae* organisms in the sample matrix: sample # 1415401 contained about 5×10^5 IFU/mL, sample # 1415403 about 5×10^4 IFU/mL and sample # 1415402 about 1×10^3 IFU/mL of *C. pneumoniae*-positive human cells. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1415404 of the current set.

As depicted in Tab. 2 (see Attachment 1, p. 14), all participants reported correct results for the positive sample # 1415401. 128 of the 129 participants also reported correct positive results for sample # 1415403, and also for the sample with the lowest amount of *C. pneumoniae* (# 1415402; 1×10^3 IFU/mL) 125 correct results were reported. Only two participants reported false-positive results for the „negative“ sample # 1415404 (*E. coli*). Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 541: Mycoplasma pneumoniae

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the ana-

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

The current set of QC samples contained two positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL) was present in sample # 1415412 and an approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1415414. Sample # 1415413 was designed to monitor assay specificity: it contained a considerable amount of *M. genitalium* ($\sim 10^5$ genome copies/mL) as a related species to the target organism. The set was completed by sample # 1415411, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Similar to the result constellations observed with past distributions of our external quality assessment schemes for *Mycoplasma pneumoniae* PCR/NAT detection, the availability of well-established commercial or *in-house* PCR/NAT-assays has led to a high percentage of correct results. With the exception of one laboratory, all 135 participants correctly reported sample # 1415411 as negative. The *Mycoplasma pneumoniae* containing samples (#1415412, $\sim 10^6$ genome copies/mL and # 1415414 $\sim 10^5$ genome copies/mL) were correctly reported by all and all but two participants, respectively. Sample # 1415413 contained *M. genitalium* ($\sim 10^5$ genome copies/mL), and was erroneously reported positive by nine laboratories. This may indicate lacking species-specificity of the test systems and trigger investigations.

RV 542: Coxiella burnetii & Bacillus anthracis

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

The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *Coxiella burnetii* organisms ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL in sample # 1415424 and

$\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1415423), two samples with fivefold different amounts of *Bacillus anthracis* (sample # 1415422 with $\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL and sample # 1415423 with $\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL) Sample # 1415421 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

For convenient data presentation and analysis, we decided to depict the PCR/NAT-results for each target organisms within this combined EQAS scheme in two separate tables: please see Tab. 2 and 3 (see Attachment 1, p. 16) for the *Coxiella burnetii*-specific results and Tab. 4 and 5 (see Attachment 1, p. 17) for the *Bacillus anthracis*-specific results.

***Coxiella burnetii*:** The relatively high amount ($\sim 10^4$ genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1415423 (together with 5×10^4 genome copies/mL *B. anthracis*) was correctly reported by all participants, as well as the tenfold lower concentration of the pathogen in sample #1415424. The two „negative“ samples (#1415421 contained only *E. coli* and #1415422 contained only *B. anthracis*) were with one exception correctly reported negative. Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good correlation with the expected results was observed.

***Bacillus anthracis*:** The results for this newly introduced EQAS scheme are easily discussed. All of the 16 participants correctly reported positive results for both positive samples # 1415422 ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) and # 1415423 ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL). In addition, all participants correctly reported negative results for the two „negative“ samples # 1415421 (containing *E. coli* and human cells) and # 1415424 (containing $\sim 10^3$ genome copies of *Coxiella burnetii* in a suspension of human cells).

After this very successful round of external quality assessment, „standardized samples“ are now 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 (Prof. Reischl).

RV 543: *Francisella tularensis*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *F. tularensis* DNA in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis holarctica* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1415432, an approximately tenfold lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1415431, and an approximately

hundred fold lower amount (1×10^3 CFU/mL) was present in sample # 1415433.

Similar to QC samples from past distributions, the positive samples # 1415431 and # 1415432 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL and $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Francisella tularensis holarctica*, respectively) was correctly tested positive by all of the 16 participating laboratories. Even with pathogen amounts of $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL (sample #1415433), 13 out of 16 labs were able to detect *Francisella* DNA. As no false-positive result was observed for the „negative“ sample # 1415434 – it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions measures to prevent deleterious contamination events. Overall, these results corroborate the lower limits of detection observed in our previous EQAS distributions. Although the number of participating laboratories is still not very high, the results of the present distribution indicate that the lower limit of detection is about or slightly below 10^4 organisms/mL when using currently employed and well evaluated PCR/NAT-based assay concepts for the detection of *F. tularensis* DNA.

RV 544: Carbapenemase genes

The concept of this probational EQA-panel for the detection of carbapenemase genes is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for molecular resistance testing or the direct detection of carbapenemase genes from DNA preparations of Enterobacteriaceae culture isolates. Because of the methodologically challenging design of EQAs for the molecular resistance testing of the wide range of known carbapenemase coding genes in different bacteria, the panel is narrowed down to a small selection of the currently most common carbapenemase genes in Enterobacteriaceae: KPC, VIM, OXA-48 like genes, GES carbapenemase, NDM, IMP, and GIM.

As shown in Tab. 1 (see Attachment 1, p. 19), the current set contained three samples with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: sample # 1415441 contained *Escherichia coli* with NDM-1 gene (approx. 1×10^7 genome copies/mL), sample # 1415442 contained an *Enterobacter cloacae* isolate with a VIM-1 gene (approx. 1×10^7 genome copies/mL) and sample # 1415444 contained a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring a KPC-3 gene (approx. 1×10^7 genome copies/mL). The fourth sample # 1415443 was designed negative control – it contained only *E. coli* without carbapenemase genes.

Results for the NDM-1 positive *E. coli* sample (# 1415441) as well as the VIM-1 positive *E. cloacae* sample (# 1415442) were reported correctly positive by all of the 26 participants.

For the sample # 1415444 containing a carbapenem-resistant *K. pneumoniae* only 23 of the 26 participants were able to clearly detect the resistance mediating KPC-3 gene. In case of false-negative results intensive troubleshooting is necessary because it is not acceptable for a molecular test to miss the important carbapenemase KPC. It might be possible that the DNA yield after prepar-

ation from lyophilised EQA-samples is lower than from bacterial colonies. No false positive results were observed in the sample without target organisms (# 1415443), containing only human cell material and *E. coli*, so it seems that the participating laboratories have implemented efficient precautions to prevent contamination events. *In-house* NAT assays were used for the detection of carbapenemase coding genes by 13 of the 26 participating laboratories, while the other half quoted the use of commercial test systems or kits on the result form. As these commercial test systems were not specified by all of the participants a detailed comparison between commercial kits and the heterogeneous group of proprietary (*in-house*) test systems with respect to sensitivity, specificity or susceptibility to contamination events is not yet possible. Overall, a very good diagnostic performance and no noticeable issues regarding sensitivity and specificity, as shown in Tab. 3 (see Attachment 1, p. 19), were observed for the carbapenemase gene-specific NAT assays used by the 26 participants.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

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

The actual set of QC samples was designed as a kind of dilution series of *Pneumocystis jirovecii* organisms in the sample matrix: sample # 1415602 contained about 1×10^5 genome copies/mL, sample # 1415604 about 1×10^4 genome copies/mL and sample # 1415601 about 2×10^3 genome copies/mL of *Pneumocystis jirovecii*. Sample # 1415603 of the current set contained no target organisms but a mixture of human cells and *E. coli*.

The promising results observed in the previous rounds of this external quality assessment scheme were confirmed in the current distribution. Sample # 1415602, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) and sample # 1415604 with a slightly lower concentration of *P. jirovecii*, were reported „positive“ by nearly all of the 84 participating laboratories. Only two laboratories reported a false-negative result for samples # 1415602 and # 1415602, each. Although this could be due to a loss of template DNA during pre-analytical sample preparation procedures or other reasons, observation of false-negative results should give reason to check the diagnostic workflow, consider improving the sensitivity and/or analyzing the species coverage of the individual assay concept.

For sample # 1515601 – containing a relatively low number of target organisms (2×10^3 genome copies/mL)

– 75 out of 84 participants reported a positive result. The sample was, due to its low concentration of target organisms, this time excluded from issuing the certificates. However, participants with false-negative results should be encouraged to optimize their NAT assays.

Only one false-positive result was reported for sample # 1455603, which contained no target organisms but human cells and *E. coli*. The 83 reported negative results nicely demonstrate the efficiency of laboratory specific strategies for avoiding contamination events.

The yet limited number of participants in the INSTAND e.V. EQAS schemes RV 542, RV 543, RV 560, together with an incomplete reporting of the assays and manufacturers applied, do not allow a serious evaluation of the quality of either commercial tests or the very heterogeneous *in-house* PCR/NAT assays in regard to analytical sensitivity, analytical specificity, susceptibility to contamination, or simply the „overall performance“. In this regard we would like to encourage the participants to complete the protocol as good as possible.

Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000013.shtml>

1. Anhang1_lab000013.pdf (426 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)” Mai 2014

References

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“: Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologie*. 2003 Aug;13(4):149-56.
2. Linde HJ, Lehn N. Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Pantone-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Pantone-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Pantone-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;24(1):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

Corresponding author:

Prof. Dr. Udo Reischl
Institute for Clinical Microbiology and Hygiene, University
Hospital Regensburg (UKR), Franz-Josef-Strauß-Allee 11,
93053 Regensburg, Germany, phone:
+49-(0)941-944-6450
udo.reischl@ukr.de

Please cite as

Reischl U, Schneider W, Holzmann T, Ehrenschrwender M, Hiergeist A, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, Splettstößer W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2014 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab.* 2014;5:Doc03. DOI: 10.3205/lab000013, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000133

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2014-5/lab000013.shtml>

Published: 2014-07-01

Copyright

©2014 Reischl et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.en>). You are free: to Share – to copy, distribute and transmit the work, provided the original author and source are credited.