

# Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Juni 2019 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik

## Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

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

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

Universitätsklinikum Bonn,  
Deutschland

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

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

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

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

Wie bei allen anderen Ringversuchen erfolgt die Anmeldung zu ausgewählten Teilen der Reihe „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ über die Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in Medizinischen Laboratorien (INSTAND e.V.), Düsseldorf (<https://www.instand-ev.de>). Nach Abschluss des jeweiligen Ringversuchs werden die Ergebnisse der einzelnen Teilnehmer dort zentral erfasst, und anhand von individuellen Bewertungskriterien werden die schriftlichen Zertifikate erstellt. Zusätzlich stehen für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe weiterer Informationen auch im Internet unter <http://www.udo-reischl.de>, Unterpunkt „INSTAND-Ringversuche (PCR/NAT)“, sowie auf der

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

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 19 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „Highlights“.

So wurden beispielsweise im aktuellen **RV 539 MRSA/cMRSA** eine der vier Proben mit einer Mischung von **MSSA** und **mecA-positiven S. haemolyticus**-Isolaten versetzt. Zudem befand sich in einer Probe ein MRSA-Patientenisolat mit der etwas selteneren **SCCmec Typ V** Genkassette. Erfreulicherweise wurden diesmal auch bei dieser methodisch etwas anspruchsvolleren Konstellation relativ wenig falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse berichtet und die DNA von MRSA/cMRSA ließ sich mit den meisten der kommerziellen und Inhouse-PCR-Testsysteme zuverlässig nachweisen.

In einer der 4 Einzelproben des aktuellen Ringversuchs **RV 535: Borrelia burgdorferi** befanden sich relativ hohe Mengen der Spezies *Borrelia lusitaniae*. Offenbar bereitete der zuverlässige PCR-gestützte Nachweis dieser dem *B. burgdorferi sensu lato*-Komplex zugehörigen Spezies nur einem sehr geringen Teil der Teilnehmer (bzw. den von ihnen eingesetzten Testsystemen) gewisse Probleme. Etwas Hintergrundinformation zu dieser Borrelien-Spezies finden Sie in dem ringversuchsspezifischen Teil dieser Diskussion.

Beim **RV 537: Salmonella enterica** befanden sich diesmal in zwei der drei positiven Proben relativ geringe Mengen an Zielorganismen, die bei der Hälfte der Teilnehmer offenbar unter der Nachweisgrenze der individuell eingesetzten Testsysteme lag. Wir haben daraus gelernt und berücksichtigen diese Beobachtung natürlich in den kommenden Ringversuchsrunden.

Mit der Auswahl eines etwas breiteren Spektrums von relevanten Carbapenemase-Genen bestätigte sich im Rahmen des Ringversuchs **RV 544 Carbapenemase-Gene** erneut die Vermutung, dass viele der derzeit verwendeten kommerziellen sowie Inhouse-Testsysteme zur molekularen Carbapenemase-Detektion noch gewisse Lücken hinsichtlich der Abdeckung von unterschiedlichen Carbapenemase-Genen aufweisen. Im aktuellen Ringversuch scheint dies insbesondere für GIM-1 zu gelten. Das

*Citrobacter freundii*-Isolat mit GIM-1 wurde lediglich von 18 der insgesamt 90 Teilnehmer detektiert.

Im Umfeld der molekularen Testung von Carbapenemase-Genen unterstützt uns Frau Dr. Agnes Anders vom NRZ für gramnegative Krankenhauserreger weiterhin bei der Auswahl von relevanten „interessanten“ klinischen Isolaten.

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

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

- Der Ringversuch **RV 543: *Francisella tularensis*** wurde bereits in der vorherigen Ringversuchsrunde November 2018 um den Zielorganismus ***Brucella spp.*** erweitert und wird zukünftig routinemäßig als kombinierter Ringversuch **RV 543 *F. tularensis* & *Brucella spp.*** angeboten.
- Für die externe Qualitätssicherung zukünftig kommerziell verfügbarer (und damit wohl auch vermehrt eingesetzter) **PCR/NAT-gestützter Nachweisverfahren für Urogenital-Infektionen** haben wir seit Mai 2019 einen neuen Ringversuch routinemäßig etabliert, der vom Konzept her jeweils einige der nachfolgenden Erreger in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen innerhalb des 4-er Panels enthält: **RV 547 „Urogenital-Panel“** zum Nachweis von ***Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*** und ggf. ***Treponema pallidum***.

Nach 19 Teilnehmern beim Pilotringversuch im November 2018 haben sich diesmal bereits 57 Teilnehmer registriert. Wir werden uns nach Kräften bemühen, der hohen Nachfrage auch mit ausreichenden Mengen an Probenmaterial nachzukommen, und sind sehr neugierig, wie sich die Auswertung der berichteten Ergebnisse zukünftig gestalten wird.

Vorab auch noch eine Anmerkung zu den statistisch ermittelten und in den jeweiligen Tabellen 3 aufgeführten Leistungsdaten von kommerziellen PCR/NAT-Testsystemen. Auffällig bei vielen der aktuellen aber auch bei einigen der früheren Ringversuche ist das unterschiedlich gute Abschneiden von Teilnehmern mit ein und demselben kommerziellen, vorkonfektionierten und teilweise auch automatisierten und/oder kartuschenartig geschlossenen Testsystemen.

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

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

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

## Untersuchungsergebnisse Juni 2019

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: *Salmonella enterica* ser. enteritidis (Proben # 1915371 und # 1915372), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1915404), *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 1915412), *Clostridium difficile* (Probe # 1915454), *Gardnerella vaginalis* (Probe # 1915471) sowie *Ureaplasma urealyticum* (Probe # 1915471).

Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Auswertung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen. An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, dass zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind, und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten „grenzwertig positiven“ Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von „durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten“ eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 10- bis 50-fache der unteren

Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (z.B. 50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende Realtime-PCR-Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

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

Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung und/oder auf mangelnde Spezifität der eingesetzten Testsysteme zu betrachten.

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Tabelle 1 (Anhang 1) zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tabelle 2 (Anhang 1) nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen, und in Tabelle 3 (Anhang 1) nach der absoluten Anzahl der richtig-positiven und richtig-negativen Ergebnisse sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum „Gelegenheitsanwender“ abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen Realtime-PCR-Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR-Testsysteme) auch unter der Internetadresse <http://www.udo-reischl.de>; Unterpunkt „Auswertung der Ringversuche“ und natürlich auch über die Webseite von INSTAND e.V. (<https://www.instand-ev.de>) als pdf-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion sowie deren tatkräftige Unterstützung bei der Konzeption und dem Aufbau neuer Ringversuche bedanken.

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

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Ringversuchen zum kombinierten NAT-gestützten *C. trachomatis*- und Gonokokken-Nachweis. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils zwei Proben mit einer relativ hohen Menge an *C. trachomatis* (# 1915301 und # 1915302,  $\sim 5 \times 10^5$  IFU/mL). Eine Probe (# 1915303) war mit ca.  $5 \times 10^5$  CFU/mL an *N. gonorrhoeae* und eine Probe mit einer 10-fach niedrigeren Mengen an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1915304;  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) versetzt.

Trotz der relativ geringen Erregermenge in manchen der vier unterschiedlich zusammengesetzten positiven Proben und der gleichzeitigen Anwesenheit von *C. trachomatis*- und *N. gonorrhoeae*-DNA führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive als auch für negative Befunde.

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

Die beiden *C. trachomatis*-positiven Proben # 1915301 und # 1915302 des aktuellen Ringversuchs wurden diesmal mit relativ hohen Mengen an entsprechenden Zielorganismen versetzt, und unter den von insgesamt 264 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* befand sich lediglich jeweils ein falsch-negatives Ergebnis für beide Proben. Erwähnenswert sind jedoch die 5 falsch-positiven Ergebnisse für *C. trachomatis*-DNA bei der Probe # 1915303 und die 3 falsch-positiven Ergebnisse bei der Probe # 1915304. Hierbei handelt es sich vermutlich um Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung der gleichzeitig prozessierten relativ stark CT-positiven Proben # 1915301 und # 1915302. Den betroffenen Laboratorien sollten diese Ergebnisse Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufbereitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die zwei ebenfalls relativ stark positiven Proben # 1915303 und # 1915304 (*N. gonorrhoeae*; ca.  $5 \times 10^5$  bzw.  $5 \times 10^4$  CFU/mL) diesmal lediglich von einem der insgesamt 263 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis für Probe # 1915303 und von 3 Teilnehmern falsch-negative Ergebnisse und drei als „fraglich“ klassi-



fizierte Ergebnisse für die Probe # 1915304 mitgeteilt. Bei den insgesamt lediglich 4 für GO falsch-negativen Ergebnissen handelt es sich vermutlich um Ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“, da von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen hier durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden.

Da die hier beobachteten Sensitivitäts- und Spezifitätsprobleme angesichts der großen Teilnehmerzahl nur marginale Ausmaße haben, sich offensichtlich nicht auf bestimmte Testkonzepte eingrenzen lassen und sich auch mehr oder weniger sporadisch durch das ganze Portfolio der eingesetzten Testsysteme ziehen, kann dem großen Rest des Teilnehmerfeldes erneut eine erfreulich gute analytische Sensitivität und Spezifität ihrer CT- und GO-spezifischen NAT-Testsysteme sowie der angewandten Prozeduren zur Probenaufarbeitung und -prozessierung attestiert werden.

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

Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden sowohl die *C. trachomatis*- als auch die *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen von allen der 10 Teilnehmer mit RNA-basierten Gen-Probe Testsystemen in den 4 ausgesandten Proben erfolgreich nachgewiesen und die entsprechenden Zertifikate erlangt.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von 263 der insgesamt 264 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt. Unabhängig von der Art des verwendeten Testsystems soll in diesem Zusammenhang auch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in Gegenwart von relativ hohen Mengen an Zielorganismen (bzw. deren Nukleinsäure) die interne Kontrollreaktion aufgrund der „Konkurrenzsituation“ mit der Amplifikation der eigentlichen Zielsequenz durchaus

negativ ausfallen kann, obwohl keine Inhibition der PCR-Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 1) nicht zwischen dem spezifischen Nachweis von Chlamydien und Gonokokken differenziert wurde. Mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme wurden insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Um eine detaillierte Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen, wurden diesmal zusätzlich die Tabellen 4 bis 7 (Anhang 1, S. 2–3) angefertigt. In den Tabellen 4 und 5 sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in den Tabellen 6 und 7 nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet.

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

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: BD Max CT/GC/TV assay (15x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* Real-TM (5x), QIAGEN artus CT/NG QS-RGQ Kit (3x), Urethritis basic von fast-track Diagnostics (4x), Urethritis plus von fast-track Diagnostics (1x), Seegene Allplex STI Essential Assay (5x), Seegene STI 7 Detection (3x), Seegene Anyplex™ II STI-7 Detection (3x), GeneProof *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* PCR Kit (4x), GeneProof CT/NG/MG multiplex PCR Kit (1x), EUROIMMUN Euroarray STI-11 (4x), Hologic Aptima Combo 2 assay (2x), BIORON RealLine single und multiplex CT/NG Kits (2x), AmpliSens *C. trachomatis*- und *N. gonorrhoeae*-screen-FRT PCR Kit (1x), Mikrogen Diagnostik Kits (7x), Aptima Combo 2 assay CT/GC (1x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), Immundiagnostik MutaPlex (1x) und Liferiver *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* Real Time PCR Kit (1x).

## RV 531: Chlamydia trachomatis

Das Probenet des aktuellen Ringversuchs enthielt diesmal zwei Proben mit ca.  $5 \times 10^5$  IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1915312 und # 1915314), eine Probe mit ca.  $5 \times 10^4$  IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1915313), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1915311), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 (Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den 66 Teilnehmern bei der *C. trachomatis*-negativen Probe # 1915311 lediglich ein falsch-positives Ergebnis und bei den drei *C. trachomatis*-positiven Proben (# 1915312, # 1915313 und # 1915314) diesmal durchwegs korrekt positive Ergebnisse für *C. trachomatis*-DNA mitgeteilt.

Die markante Übereinstimmung der aktuellen Ergebniskonstellation mit den Beobachtungen und hervorragenden Richtigkeitsquoten vorhergegangener Ringversuche mit ähnlicher Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen kann erneut als Beleg für eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz der eingesetzten Testsysteme sowie der aktuellen Kits und automatisierten Testplattformen zur Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Prozessierung angesehen werden. Bei dem einen falsch-positiven CT-Ergebnis für Probe # 1915311 handelt es sich vermutlich um ein Kontaminationsereignis bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung der gleichzeitig prozessierten CT-positiven Proben. Wie bereits bei den vorhergegangenen Ringversuchsauswertungen bei solchen Konstellationen erwähnt, sollten diese Ergebnisse den betroffenen Laboratorien Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Auch wenn mit ca.  $5 \times 10^4$  IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial der Probe # 1915313 die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht erreicht oder unterschritten sein sollte, stehen mit den Rückstellproben des Ringversuchs RV 531 Mai 2019 den Teilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität wieder geeignete Sets zur Überprüfung und Optimierung ihrer jeweiligen NAT-gestützten Testsysteme zur Verfügung. Angesichts der nach wie vor anhaltenden Diskussion um das „Pooling“ von entsprechendem Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

Inhibitionskontrollen wurden von allen der insgesamt 66 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem der Teilnehmer beobachtet. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten Inhouse-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchweg auf erfreulich hohem Niveau.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurden hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (5x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (1x), BD Max CT/GC/TV assay (2x), Seegene Allplex STI Essential Assay (1x), Sansure Biotech *C. tracho-*

*matis* DNA Fluorescence Diagnostic Kit (1x), EUROIMMUN Euroarray STI-11 (1x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (1x), Autoimmun Diagnostika GenID STD Kit (1x), AmpliSens *C. trachomatis* (1x) und Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (1x).

## RV 532: Bordetella pertussis

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1915322; *B. pertussis*,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella bronchiseptica* (# 1915324 mit  $1 \times 10^5$  CFU/mL), und eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella parapertussis* (# 1915321 mit  $1 \times 10^5$  CFU/mL) als zum Zielorganismus verwandte Spezies. Die Probe # 1915323 enthielt diesmal keine Bordetellen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Wie schon im letzten Ringversuch bereitete der Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in der Probe # 1915322 den Teilnehmern keine allzu großen Schwierigkeiten. Bei einer Erregermenge von  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL wurden hier nur von drei der insgesamt 169 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse berichtet und einer der Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis als „fraglich“. 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  $\mu$ 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 den betroffenen Teilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung seines jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Für die Proben # 1915321 und # 1915324 mit jeweils ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL an *Bordetella parapertussis* und *Bordetella bronchiseptica* (IS481-negatives Isolat) wurden insgesamt 5 falsch-positive Ergebnisse beobachtet und auch die nur mit *Escherichia coli* versetzte Probe # 191533 wurde von drei Teilnehmern als (falsch-)positiv für *Bordetella pertussis* befundet. Hierbei handelt es sich offensichtlich um mangelnde analytische Spezifität der eingesetzten *B. pertussis*-spezifischen PCR/NAT-Testsysteme und/oder eventuell auch um laborinterne Kontaminationsereignisse oder Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Von den übrigen 166 der insgesamt 169 Teilnehmer wurden ausnahmslos richtig-negative Ergebnisse mitgeteilt.

Von einem Teilnehmer wurde das Ergebnis bei der positiven Probe # 1915322 als „fraglich“ klassifiziert. **Anmerkung des Ringversuchsleiters:** bei der Mitteilung von fraglichen Ergebnissen werden die entsprechenden Zertifikate nur dann erteilt, wenn diese Teilnehmer bei den übrigen 3 Proben des Ringversuchs korrekte Ergebnisse angegeben haben.

Inhibitionskontrollen wurden von 168 der insgesamt 169 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (9x), Altona diagnostic RealStar *Bordetella* PCR Kit (3x), HAIN Lifescience FluoroType *Bordetella* (9x), Mikrogen ampliCube Respiratory Panel 2 (6x), Quidel Solana *Bordetella* complete Assay (4x), Luminox ARIES *Bordetella* Assay (2x), BioGX *Bordetella* PCR Kit (2x), Sacace Biotechnologies *B. pertussis/B. parapertussis/B. bronchiseptica* Real-TM (2x), fast-track Diagnostics *Bordetella* (1x), AmpliSens *Bordetella* multi FRT PCR Kit (1x), Ingenetix BactoReal *B. pertussis/B. parapertussis* (1x), Attomol *Bordetella* Realtime LT (1x), DiaSorin Simplexa *Bordetella* direct Kit (1x), ARGENE *Bordetella* r-gene (1x), Meridian Bioscience illumigene *Pertussis* (1x), BioEvolution RT PCR kit *B. pertussis/parapertussis* (2x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x) und Hologic Panther Fusion *Bordetella* Assay (1x).

## RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt Probe # 1915331 des aktuellen Ringversuchs eine relativ hohe Menge an Clarithromycin-resistenten *H. pylori* ( $\sim 10^5$  Organismen/mL). Die Probe # 1915333 enthielt das gleiche Isolat in einer etwa zehnfach geringeren Menge ( $\sim 10^4$  CFU/mL). Probe # 1915334 enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter mustelae* ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) und Probe # 1915332 ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden beide mit *H. pylori*-Zielorganismen versetzte Proben (# 1915331 und # 1915333) diesmal von allen Teilnehmern ausnahmslos als richtig-positiv bewertet, was damit einer Richtigkeitsquote von 100% entspricht. 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 # 1915334 überprüft, welche mit *Helicobacter mustelae* ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) eine „non-pylori“ *Helicobacter*-Spezies enthielt. Für diese Probe wurden sieben falsch-positive Ergebnisse berichtet, wobei falsch-positive Ergebnisse hier zum Anlass genommen werden sollten, die Speziespezifität der von den betroffenen Anwendern verwendeten PCR/NAT-Testsysteme zu überprüfen. Probe # 1915332 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. Inhibi-

tionskontrollen wurden von 51 der insgesamt 52 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsergebnisse 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 Inhouse-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 Inhouse-Testsystemen und kommerziellen Assays auszumachen.

Bis auf 29 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 3x Light-Mix *Helicobacter* Kit von TIB Molbiol, 1x *H. pylori* Real TM von Sacace Biotechnologies und 1x Modular diagnostic Kit *H. pylori* von VIASURE CerTest angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. Inhouse-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 45 der insgesamt 52 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines einzigen Teilnehmers waren die Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

## RV 534: EHEC/STEC

Wie 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-Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen).

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei unterschiedliche, aber relativ stark EHEC-positive Proben: mit ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL (# 1915343: *E. coli*, *stx*<sub>2c</sub>-, *eae*-, *hlyA*- und O26:H11-positiv) und mit ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL (# 1915341: *E. coli*, *stx*<sub>1</sub>-, *stx*<sub>2</sub>-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv) sowie eine Probe mit  $1 \times 10^4$  CFU/mL eines EPEC-Isolats (# 1915342, *eae*-positiv) und eine Probe mit  $1 \times 10^4$  CFU/mL eines EIEC-Isolats (# 1915344). 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-positiven Proben # 1915341 bzw. # 1915343 wurden jeweils von 139 bzw. 137 der insgesamt 139 Teilnehmer als richtig-positiv berichtet. Eine naheliegende Erklärung für die einzelnen falsch-negativen Ergebnisse bei der *stx*<sub>1</sub>-, *stx*<sub>2</sub>-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1915341 und der *stx*<sub>2c</sub>-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1915343 gibt es aus Sicht der Ringversuchsauswertung nicht.

Sowohl das EPEC-Isolat in Probe # 1915342 (*E. coli*, *eae*-positiv, *hlyA*-negativ) als auch das EIEC-Isolat in Probe # 1915344 wurde jeweils von 136 bzw. 138 der insgesamt 139 Teilnehmer korrekterweise als negativ befundet. Die insgesamt 4 falsch-positiven EHEC-Ergebnisse bei den beiden letztgenannten Proben konnten wir auch nach (manueller bzw. visueller) Durchsicht der entsprechenden Ergebnisbögen nicht genauer auflösen.

Die wenigen Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für die beiden positiven EHEC-Proben verwenden vermutlich Testsysteme mit geringerer analytischer Sensitivität oder verlieren etwas Sensitivität beim Aufschluss des Probenmaterials. Insgesamt gesehen sollte das aber nicht weiter schlimm sein, da in den meisten der teilnehmenden Laboratorien ein NAT-gestützter Nachweis von Shiga-Toxin-Genen im Umfeld der EHEC-Diagnostik primär als Kulturbestätigungstest eingesetzt wird. Bei zukünftigen Ringversuchen werden wir uns bemühen, dass die meisten der positiven Proben wieder relativ hohe Mengen an Zielorganismen enthalten und der Schwerpunkt somit auf einer Abprüfung der analytischen Spezifität der eingesetzten Testsysteme liegt und weniger auf der dabei erzielten unteren Nachweisgrenze.

Neben Inhouse-Testsystemen werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle Assays eingesetzt. In den Richtigkeitsquoten zeigte sich keine Über- bzw. Unterlegenheit eines Systems, was für die breite Etablierung PCR-/NAT-gestützter Testsysteme spricht. Inhibitionskontrollen wurden von 137 der 139 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsereignisse wurden in keinem Fall beobachtet. Zudem wurden von 122 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 drei Teilnehmer berichteten hier falsche Ergebnisse.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: BD Max Enteric Bacterial Panel (6x), Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Bacteria II Assay (6x), Altona diagnostic RealStar EHEC PCR Kit (4x), TIB Molbiol LightMix modular *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub>/*eae* (6x), TIB Molbiol EHEC Toxin Gene *stx*<sub>1</sub> und *stx*<sub>2</sub> (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Mast Isoplex VTEC (1x), Biomerieux BioFire GI Panel (1x), Mikrogen ampliCube (1x), Amplex

eazyplex EHEC complete (1x) und Biomerieux FILMARRAY GI Panel (1x).

## RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

Daher wurden bei der Konzeption des Ringversuchs diesmal drei unterschiedliche Borrelien-Spezies an die Teilnehmer versandt. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit ca.  $5 \times 10^5$  Organismen/mL an *Borrelia recurrentis* (# 1915351), eine Probe mit ca.  $5 \times 10^5$  Organismen/mL an *Borrelia garinii* OspA Typ 7 (# 1915352), eine Probe mit ca.  $5 \times 10^5$  Organismen/mL an *Borrelia lusitaniae* (# 1915354) sowie eine Probe ohne Zielorganismen, die jedoch eine relativ hohe Menge an *Treponema phagedenis* enthielt (# 1915353,  $\sim 1 \times 10^5$  Organismen/mL).

Nochmals eine **kurze Rekapitulation**: Schon die Tatsache, dass mittlerweile mehr als 20 verschiedene dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörige Spezies beschrieben sind, impliziert erhebliches Problempotential für den PCR-/NAT-gestützten Nachweis von *B. burgdorferi*. *B. garinii* ist eine seit Langem bekannte, gesichert humanpathogene Spezies, die weit verbreitet in Europa und Asien vorkommt und häufig bei disseminierten Infektionen gefunden wird. Dagegen ist die Humanpathogenität für *B. lusitaniae* nicht gesichert. Diese Spezies findet sich relativ häufig in Zecken aus dem westlichen Mittelmeerraum incl. Nord-Afrika, wurde aber auch in anderen europäischen Ländern nachgewiesen. Als Wirte konnten Eidechsen identifiziert werden. Obwohl *B. lusitaniae* seit etwa 30 Jahren bekannt ist, existieren bislang lediglich zwei Humanisolate, beide aus Portugal und beide von atypischer Hauterkrankung. Nachdem bei eigenen Untersuchungen zur Sensitivität verschiedener Amplifikationsprotokolle der Nachweis dieser Spezies z.T. erhebliche Probleme bereitete, ist das Ergebnis des vorliegenden Ringversuchs – von 108 der insgesamt 121 Teilnehmer richtig positiv befundet – besonders erfreulich, sollte aber für die Teilnehmer mit negativem Ergebnis Anlass sein, den eingesetzten Test für den Nachweis von *B. lusitaniae* zu verbessern.

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



Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen:

Der zuverlässige Nachweis von *Borrelia garinii* in der Probe mit relativ hoher Erregerlast (# 1915352 mit  $\sim 5 \times 10^5$  Organismen/mL) bereitete nahezu keinem der 121 Teilnehmer signifikante Probleme. Da hier von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei dem einen falsch-negativen Ergebnis vermutlich um einen ringversuchstypischen „sporadischen Ausreißer“.

Auch für die negative Probe # 1915353, die lediglich eine relativ hohe Menge an *Treponema phagedenis* ( $1 \times 10^5$  Organismen/mL) enthielt, wurde nahezu von allen Teilnehmern ein korrekt-negatives PCR/NAT-Ergebnis berichtet. Für die beiden übrigen Proben # 1915353 (*Borrelia recurrentis*,  $5 \times 10^5$  Organismen/mL) und # 1915354 (*Borrelia lusitaniae*,  $5 \times 10^5$  Organismen/mL) wurden jedoch deutlich höhere Raten an falschen PCR/NAT-Ergebnissen beobachtet.

Die *Borrelia lusitaniae*-Zielorganismen konnten dabei nur von 108 Teilnehmern mit ihren *B. burgdorferi*-spezifischen Testsystemen erkannt werden, und beim Vorliegen von nennenswerten Mengen an *Borrelia recurrentis* lieferten die PCR/NAT-Testsysteme von 24 Teilnehmern offenbar ein (falsch-)positives Ergebnis. Zumindest bei Probe # 1915354 (*Borrelia lusitaniae*) sollten falsch-negative Ergebnisse den betroffenen Teilnehmern Anlass zur gelegentlichen Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Möglicherweise ist hier die Gesamtsensitivität des analytischen Workflows und/oder die Spezifität bzw. Abdeckung der unterschiedlichen Borrelien-Spezies des verwendeten PCR-NAT-Assays unzureichend.

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionseignisse der PCR-Reaktion wurden im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie bei den vorhergehenden Ringversuchsrunden haben auch diesmal weniger als die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (Inhouse-)Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet, kommerzielle Testsysteme wurden von 70 der 121 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (Inhouse-) Testsystemen zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den insgesamt 43 falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen für die Proben # 1915351 (*B. recurrentis*) und # 1915354 (*B. lusitaniae*) 31 davon durch Inhouse-Testsysteme generiert wurden. Gegebenfalls sollte also die Sensitivität und/oder Spezifität mancher der hauseigenen Testsysteme überprüft werden. Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsys-

teme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Mikrogen alphaCube *Borrelia* (5x), HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (4x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (4x), BIORON RealLine Borrelien Kit (3x), Sacace Biotechnologies *B. burgdorferi* Real-TM (2x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (1x), Diarella *Borrelia* real time PCR kit LC von Gerbion (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), Demeditec GenFlow *Borrelia* plus PCR (1x) und Attomol *B. burgdorferi* Realtime LT (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 erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal nur eine *Legionella pneumophila*-positive Probe # 1915361, die mit einer Menge von ca.  $10^5$  CFU/mL an *L. pneumophila*-Serogruppe 1 versetzt war. Die Probe # 1915364 des aktuellen Sets enthielt ca.  $10^5$  CFU/mL an *Legionella gormanii* und Probe # 1915363 enthielt eine ca. zehnfach geringere Menge an *L. gormanii* ( $10^4$  CFU/mL). Die dritte für den entsprechenden Zielorganismus „negative“ Probe # 1915362 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*.

Die relativ stark positive Probe # 1915361 mit ca.  $10^5$  CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG1 wurde dabei von allen bis auf einen der insgesamt 123 Teilnehmer korrekterweise als positiv befundet.

Auch die „richtig-negative“ Probe # 1915362 (nur *E. coli*) wurde noch von 121 der 123 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Zwei Teilnehmer berichteten bei dieser Probe jedoch ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila*. Die betroffenen Laboratorien sollten mögliche laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während ihrer individuellen Probenextraktion und -abarbeitung ggf. kontrollieren und bestmöglich korrigieren.

Die beiden mit relativ hohen Mengen an *Legionella gormanii* ( $\sim 1 \times 10^5$  bzw.  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) versetzten Proben # 1915364 bzw. # 1915363 wurden von 108 bzw. 114 der insgesamt 123 Teilnehmer mit ihren *L. pneumo-*

*phila*-spezifischen PCR-/NAT-Testsystemen korrekt als negativ befundet. Jeweils 15 bzw. 9 Teilnehmer berichteten bei diesen beiden Proben ein falsch-positives Ergebnis für *L. pneumophila*-DNA, was auf eine Kreuzreaktion bzw. mangelnde Speziespezifität der Zielsequenz zurückzuführen sein dürfte. Sechs dieser Teilnehmer gaben jedoch im Kommentarfeld des Befundbogens explizit an, ein *Legionella* spp. Genus-spezifisches Testsystem für die Analysen zu verwenden. Da mit dieser Art von Testsystemen offenbar nicht zwischen den einzelnen *Legionella*-Spezies unterscheiden werden kann oder soll, ist in diesen Fällen „positiv“ nachvollziehbarerweise auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis.

Vor allem Inhouse-Realtime-PCR-Protokolle mit ribosomalen Zielsequenzen zeigten in der Vergangenheit immer wieder Probleme bei der Speziespezifität. Bei Verwendung von nested Block-Cycler PCR-Protokollen zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und optionaler DNA-Sequenzierung sollte jedoch der Fehler eher auf Anwenderseite gesucht werden (beispielsweise Kontaminationsereignisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung), da seriös etablierte 16S rDNA-sequenzbasierte Testkonzepte in jedem Fall die Unterscheidung zwischen *Legionella gormanii* und *Legionella pneumophila* erlauben sollten.

Inhibitionskontrollen wurden von 122 der 123 Teilnehmer durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden offenbar nicht beobachtet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 86 von 123 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (7x), GeneProof *L. pneumophila* PCR Kit (6x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Mikrogen ampliCube Respiratory Panel 1 (4x), Mikrogen Diagenode Legionella (1x), ARGENE Kits (3x), fast-track Diagnostics Atypical CAP (2x), fast-track Diagnostics Bacterial pneumonia CAP (1x), Biologig Atypical Pneumonia-1 Assay (2x), Biologig Ready-Max B-CAP Assay (1x), Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (2x), Sacace Biotechnologies *L. pneumophila* Real-TM (2x), BioGX ATYP (2x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x), AnDiatec Quidel *L. pneumophila* (1x) und ELITechGroup *L. pneumophila* Q-PCR Alert Amplimix (1x).

## RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1915373; *Salmonella enterica* ser. enteritidis,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), zwei mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1915371; *Salmonella enterica* ser. enteritidis,  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL und # 1915372; *Salmonella enterica* ser. enteritidis,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL), sowie eine

Probe ohne Zielorganismen (# 1915374), 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 zumindest bei einer der drei *Salmonella enterica*-positiven Proben des Ringversuchssets zu hohen Richtigkeitsquoten. Bei Probe # 1915373, die diesmal ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL an Salmonellen enthielt, berichteten zumindest 25 der insgesamt 28 Teilnehmer korrekterweise ein positives PCR/NAT-Ergebnis für *Salmonella enterica*-DNA. Bezüglich der analytischen Sensitivität wurde es bei den aktuellen Proben # 1915371 ( $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL) und # 1915372 ( $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL) jedoch „interessant“. Nur mehr 18 bzw. 16 der 28 Teilnehmer konnten hier ein positives Ergebnis beobachten. Auch in vorausgegangenen Ringversuchen waren bei relativ niedrigen Erregerlasten immer wieder falsch-negative Ergebnisse berichtet worden, was im Einzelfall eine Überprüfung der eingesetzten Testsysteme nach sich ziehen sollte. Offenbar lagen wir diesmal mit zwei der drei positiven Proben (ungewollt) ein wenig unter der durchschnittlichen Nachweisgrenze von routinemäßig evaluierten und funktionierenden Testsystemen, die erfahrungsgemäß etwa bei  $5 \times 10^3$  CFU/mL liegt. Daher wurden die Ergebnisse der Probe # 1915372 mit ca.  $10^3$  CFU/mL als „edukativ“ klassifiziert und, ungeachtet des verwendeten Testsystems, bei der Erstellung der Zertifikate nicht als „falsch-negativ“ bewertet. Alle 3 Teilnehmer, die in der aktuellen Ringversuchsrunde leider kein Zertifikat erhielten, hatten bei allen 4 Proben negative Ergebnisse für *Salmonella enterica*-DNA angegeben. Da in der aktuellen Ringversuchsrunde keine falsch-positiven Befunde für die negative Probe # 1915374 (unmittelbar nach den drei positiven Proben innerhalb des Probensets) mitgeteilt wurden, deutet dies, im Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden, zumindest auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsergebnissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden für keine der Proben berichtet. Kommerzielle Testsysteme kamen in 21 Fällen, selbstentwickelte Testsysteme in 8 Fällen zum Einsatz.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von den Teilnehmern u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol LightMix Modular (2x), TIB Molbiol LightMix Salmonella (1x), BD Max Enteric Bacterial Panel (4x), Seegene Allplex Gastrointestinal Panel Bacteria 2 Assay (2x), Mikrogen Diagenode Gastroenteritis Bacteria Panel I (1x) und Mikrogen ampliCube Gastroenteritis Bacteria Panel I (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, wie in dieser Ringversuchsrunde, auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein.

Im aktuellen Probenstet befanden sich diesmal zwei Proben # 1915381 (ca.  $1 \times 10^6$  CFU/mL) und # 1915384 (ca.  $5 \times 10^4$  CFU/mL), die relativ hohe Mengen an *L. monocytogenes*-Zielorganismen enthielten und von allen der insgesamt 43 Teilnehmer korrekt erfasst wurden. Erfreulicherweise wurde auch die Probe #1915382, welche ausschließlich *E. coli* enthielt, von allen Laboratorien als „negativ“ befundet, was für eine sehr gute Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden Laboratorien spricht.

Da von einem Großteil der Teilnehmer die ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen PCR/NAT-Testsystemen angegeben wurde, ist der hohe Anteil an negativen Ergebnissen für die Probe # 1915383 (*L. innocua*, ca.  $5 \times 10^4$  CFU/mL) nicht weiter verwunderlich und konsequenterweise auch nicht als falsch-negativ für den eigentlichen Zielorganismus „*Listeria* spp.“ dieses Ringversuchs zu bewerten. Im Umkehrschluss spricht diese Datenlage 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.

Von allen 43 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Sacace Biotechnologies *L. monocytogenes* Real-TM (3x), Progenie RealCycler *Listeria* spp. (2x), Biologix Meningitis Panel-1 (1x), fast-track Diagnostics Real Time Neonatal sepsis (1x), Biomerieux BioFire FILMARRAY Meningitis/Encephalitis Panel (1x), Biomerieux easyMAG (1x), QIAGEN mericon *Listeria* spp Kit (1x) und Amplex eazyplex CSF direct (1x).

## RV 539: MRSA

Zuerst einmal, wie gehabt, eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für den **Direktnachweis von MRSA-DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise Nasen- oder Wundabstrichen) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 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 diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von MRSA etabliert haben bzw. im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie an dieser Stelle bereits mehrfach thematisiert, basieren einige der derzeit etablierten eigenentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum Direktnachweis von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern, Staphylokokkenspezies-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen in der entsprechenden Nukleinsäurepräparation. Da sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken das *mecA*-Gen für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Aussagekraft dieser PCR-gestützten Testsysteme für den Direktnachweis von MRSA aus nativem Patientenmaterial eingeschränkt, wenn beim Patienten eine gleichzeitige Besiedelung mit *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. SCC*mec*-basierte PCR-Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCC*mec*-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCC*mec*-Kassette im *S. aureus*-Genom als Zielsequenz verwenden.

Dass aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCC*mec*-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCC*mec*-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCC*mec*-Kassette vorhandenen *mecA*-Gens versandt. Auch wenn wir uns im Rahmen dieser Ringversuchsserie zum Ziel gesetzt haben, primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, befand sich im aktuellen Ringversuch neben einer Mischung aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken mit *mecA*-Gen und einem typischen



CA-MRSA-Patientenisolat aber auch wieder ein in unseren Breiten derzeit noch (bzw. Gott sei Dank) eher seltener vorkommender MRSA-Stamm mit SCCmec-Kassette vom Typ V.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1915392 diesmal ein **Gemisch aus einem S. aureus-Isolat** (MSSA, PVL-negativ,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) **und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies** (*S. haemolyticus*; mecA-positiv,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), die Probe # 1915394 ein CA-MRSA-Patientenisolat (MRSA; PVL-positiv,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), Probe # 1915393 eine relativ hohe Menge eines **Methicillin-resistenten S. aureus-Patientenisolats SCCmec Typ V** (MRSA; PVL-negativ;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) und die Probe # 1915391 ein Methicillin-sensibles *Staphylococcus epidermidis*-Isolat ( $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL).

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der positiven (CA-)MRSA Probe # 1915394 von nahezu allen der 293 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 2 falsch-negativen Ergebnisse und einem als „fraglich“ klassifizierten Ergebnis bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen. Möglicherweise wurden 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  $1 \times 10^5$  CFU/mL nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1915394 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 (*S. haemolyticus*) in Probe # 1915392 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 270 der insgesamt 293 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere 2 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von einem dieser beiden Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruht. Da mit dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA*-Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall „fraglich“ auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis. Die restlichen Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Diesen 21 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe

# 1915392 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 21 Teilnehmer vermutlich fälschlicherweise einen Hinweis auf das Vorliegen einer MRSA-Infektion bzw. -Besiedelung anzeigen (mit allen hinlänglich bekannten Konsequenzen für den betroffenen Patienten!). Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 1915392 in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 12) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird schnell ersichtlich, dass alle der derzeit etablierten SCCmec-basierten Testsysteme bei diesem Gemisch korrekterweise MRSA-negative Befunde liefern (da das *S. aureus*-Genom der MSSA-Isolats ja de facto keine integrierte SCCmec-Kassette aufweist).

Insgesamt betrachtet spricht die Ergebnislage jedoch für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Auch diesmal scheinen die SCCmec-basierten Testkonzepte wieder einen gewissen analytischen Vorteil gegenüber Testsystemen mit einer getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA*-Gen zu besitzen.

Wie aber in einigen der vorhergegangenen Ringversuche bereits mehrfach diskutiert, haben auch die erstgenannten Testkonzepte gewisse Limitationen. Dies wird im Rahmen des aktuellen Ringversuchs mit der Probe # 1915393 erneut auf eindrucksvolle Weise aufgezeigt. Denn das hier versandte MRSA-Isolat besitzt eine (in unseren Breiten derzeit noch eher seltener vorkommende bzw. anzutreffende) **SCCmec-Kassette vom Typ V**, deren terminale Nukleinsäuresequenz sich deutlich von den typischerweise anzutreffenden MRSA-Isolaten mit SCCmec-Kassettentyp I bis IV unterscheidet. Hier wurden lediglich von 248 der insgesamt 293 Teilnehmer richtig-positive Ergebnisse mitgeteilt. Zugegebenermaßen ist dieser SCCmec-Typ unter den MRSA-Patientenisolaten noch relativ selten und die Ergebniskonstellation dieses Ringversuchs sollte den diagnostischen Wert von SCCmec-basierten PCR-Testkonzepten in der mikrobiologischen Praxis nicht schmälern. Ungeachtet des verwendeten Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die Probe # 1915393 auch nicht als „falsch-negativ“ bewertet.

Bei der Probe # 1915391, die ausschließlich Koagulase-negative Staphylokokken (*S. epidermidis*; mecA-positiv,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL) und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs dennoch von 2 der 293 Teilnehmer ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beobachtet. Hier liegt (angesichts der sequenziellen Folge als erste der vier Einzelproben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets) das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontaminationsereignisses

oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung nicht unmittelbar nahe. Wie bereits mehrfach im Rahmen dieser ausführlichen Ringversuchsdiskussionen erwähnt, sind solche „Ausreißer“ bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit nahezu 300 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen unseres Erachtens keiner weiteren Diskussion.

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

Abgesehen von der besagten Probe mit dem SCCmec-Typ V-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 und/oder überprüfen wollen, ob ihr spezifisches Testsystem MRSA mit SCCmec Typ V erfassen kann, 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 74 der insgesamt 293 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt, und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diese diesmal durchweg korrekt. Nähere Informationen zu der, nach wie vor hochaktuellen, cMRSA- bzw. CA-MRSA-Problematik finden sich beispielsweise in Linde et al. [2] und Witte et al. [3]. Ein gut evaluiertes Realtime-PCR-Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten findet sich beispielsweise in Reischl et al. [4]. Mittlerweile sind auch schon einige kommerzielle Realtime-PCR-Testsysteme für den zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis von PVL-Genen bei MRSA- und MSSA-Isolaten verfügbar (z.B. von r-biopharm oder von TIB Molbiol).

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (2x), Diarella MRSA real time PCR Kit TM von Gerbion (2x), Amplex eazyplex MRSA plus (2x), r-biopharm RIDAGENE PVL PCR (1x), GeneProof MRSA PCR Kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA combi (1x), Q-Bioanalytic Kit (1x), Congen SureFast MRSA 4Plex (1x) und Abacus Diagnostica GenomEra MRSA/SA Multi Swab assay kit (1x).

## RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1915403; *C. pneumoniae*,  $\sim 5 \times 10^6$  IFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1915401; *C. pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^5$  IFU/mL), eine Probe mit geringer Menge (# 1915404; *C. pneumoniae*,  $\sim 5 \times 10^3$  IFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1915402; nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen).

Den in Tabelle 2 (Anhang 1, S. 14) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch erfreulicherweise alle Teilnehmer die Zielorganismen in zwei der insgesamt drei positiven Proben # 1915401 (ca.  $1 \times 10^5$  IFU/mL) und # 1915403 (ca.  $5 \times 10^6$  IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten.

Die etwas geringere Menge an *C. pneumoniae*-Zielorganismen in der Probe # 1915404 (ca.  $5 \times 10^3$  IFU/mL) konnte noch von 137 der insgesamt 139 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Auch für die Probe ohne Zielorganismen # 1915402 (*Escherichia coli*) berichteten alle bis auf drei Teilnehmer ein korrektes negatives 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 drei falsch-positiven Ergebnissen für die Probe # 1915402 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. Inhibitionskontrollen wurden von 138 der insgesamt 139 Teilnehmer durchgeführt und eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde in keiner der versandten Proben beobachtet. Selbstentwickelte Inhouse-NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 44 Laboratorien eingesetzt, alle weiteren Teilnehmer vertrauten auf kommerzielle Assays.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: GeneProof

*C. pneumoniae* PCR Kit (10x), ARGENE Chla/Myco pneumo r-gene (8x), Mikrogen ampliCube (6x), fast-track Diagnostics Kits (6x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (5x), Sacace Biotechnologies *C. pneumoniae* Real-TM (4x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae* (3x), BioGX ATYP (3x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (2x), BioMerieux *C. pneumoniae* + *M. pneumoniae* r-gene Kit (2x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (1x), Pneumonia für EASY-PLEX 384 System (1x), RespiFinder SMART (1x), Ingenetix Bacto Real *Chlamydomydia pneumoniae* (1x) und Euroclone Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit (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 Tabelle 1 (Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1915413 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL) und Probe # 1915412 mit einer niedrigen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL). Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielt Probe # 1915411 (*Mycoplasma genitalium*;  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL) diesmal nennenswerte Mengen an einer zu dem Zielorganismus verwandten Mykoplasmen-Spezies. Probe # 1915414 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Alle 158 Teilnehmer konnten die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1915413 zuverlässig nachweisen, bei der schwächer positiven Probe # 1915412 war dies noch 153 Teilnehmern möglich. Für die Probe #1915414 ohne Zielorganismus erreichten uns zwei falsch-positive Ergebnisse, ansonsten wurde diese Probe korrekt als „negativ“ klassifiziert. Wie auch in vorausgegangenen Ringversuchsrunden wurden diesmal wieder einige (4) falsch-positive Ergebnisse für die zweite „negative“ Probe (# 1915411,  $\sim 10^5$  Genomkopien/mL *Mycoplasma genitalium*) berichtet, 154 Labors befundeten diese Probe korrekt als negativ.

Bei den falsch-positiven Ergebnissen könnte es sich eventuell um sporadische laborinterne Kontaminationsergebnisse 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. Mit einer Ausnahme wurden von allen Teilnehmern Inhibitionskontrollen mitgeführt, für keine der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsereignisse berichtet. Selbstentwickelte PCR-/NAT-Testsysteme kamen bei 45 Teilnehmern zum Einsatz, während in den anderen Laboratorien kommerzielle Testsysteme verwendet wurden.

Die Richtigkeitsquoten lagen bei Inhouse- und vorkonfektionierten Assays auf vergleichbarem Niveau.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 51 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt: LightMix *M. pneumoniae* [n=15], Autoimmun Diagnostika CAP Bacteria Kit [n=3], AmpliGnost MP PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe [n=6], Diagenode MP/CP [n=6], r-Biopharm RIDAGENE *M. pneumoniae* [n=9] und GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit [n=12], sowie „andere kommerzielle Testsysteme“ [n=57]. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: fast-track Kits (7x), Mikrogen ampliCube Respiratory Panel 1 (6x), Sacace Biotechnologies *M. pneumoniae/C. pneumoniae* Real-TM (5x), Seegene Allplex Respiratory Panel 4 (5x), ARGENE *Ch/Myco. pneumoniae* (4x), Biolegio ReadyMax B-CAP Assay (4x), AmpliSens *M. pneumoniae/C. pneumoniae*-FRP PCR Kit (3x), BioGX ATYP (2x), Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel (2x), Euroclone Duplica Real Time *M. pneumoniae* Detection Kit (1x), Alethia Mycoplasma PCR (1x), PathoFinder RespiFinder 2Smart (1x) und Ingenetix Bacto Real *Mycoplasma pneumoniae* (1x).

## RV 542: Coxiella burnetii & Bacillus anthracis

Auch hier wieder eine Anmerkung vorweg: Der kombinierte Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii* & *Bacillus anthracis* ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an C. burnetii- und B. anthracis-DNA** aus geeigneten klinischen 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 *C. burnetii* ( $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL in Probe # 1915422 und  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL in Probe # 1915421), eine Probe mit DNA des *B. anthracis*-„Pasteur“-Isolats



( $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL in Probe # 1915423), eine Probe mit DNA des *B. anthracis*-UR-1-Isolats ( $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL in Probe # 1915421), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1915424), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt. Der Übersichtlichkeit halber haben wir uns bei diesem kombinierten Ringversuch entschlossen, die Ergebnislage für die beiden unterschiedlichen Erreger auch in zwei getrennten Tabellen darzustellen: für *C. burnetii* in den Tabellen 2 und 3 (Anhang 1, S. 16) sowie für *B. anthracis* in den Tabellen 4 und 5 (Anhang 1, S. 17).

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Life Technologies LSI VetMAX Absolute quant. *C. burnetii* (4x), Altona diagnostics RealStar Anthrax PCR Kit (2x), Progenie RealCycler *Coxiella burnetii* (2x), AmpliSens *B. anthracis*-FRT (1x), AmpliSens *C. burnetii*-FRT (1x), VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit (1x), Master Diagnostica Chips (1x) und Gerbion Diarella Q-fieber (1x).

**Coxiella burnetii:** Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich klar. Sowohl die etwas stärker positive Probe # 1915422 mit ca.  $10^5$  Genomkopien *C. burnetii*/mL als auch die zweite positive Probe # 1915421 des Probesets (ca.  $5 \times 10^4$  Genomkopien/mL) wurde von allen der insgesamt 53 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 # 1915424 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie der zweiten „negativen“ Probe # 1915423, welche ca.  $1 \times 10^4$  Genomkopien/mL *B. anthracis*-DNA enthielt, wurden ebenfalls mehrheitlich korrekt-negative Ergebnisse berichtet.

Mit 42 diagnostischen Labors, welche Inhouse-Testsysteme zum spezifischen Nachweis von *C. burnetii* verwenden, waren die selbstentwickelten Assays den vorkonfektionierten kommerziellen Testkits zahlenmäßig überlegen. Mit zwei Ausnahmen enthielten die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetii*-DNA aller Teilnehmer eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Lediglich von zwei Teilnehmern wurden bei je 2 Einzelproben des 4-er Sets Inhibitionsereignisse beobachtet.

**Bacillus anthracis:** Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Mit nur einer Ausnahme konnten alle 28 Teilnehmer mit ihren jeweils vor Ort etablierten *B. anthracis*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die beiden negativen Proben ohne entsprechende Zielorganismen # 1915422 (nur *C. burnetii* mit ca.  $10^5$  Genomkopien/mL in einer Suspension aus humanen Zellen) sowie # 1915424 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) korrekt als negativ befunden.

Ebenfalls von allen der 28 Teilnehmer wurden korrekt positive Ergebnisse für die Probe # 1915421 (*B. anthracis*-Stamm UR-1,  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL und *C. burnetii*  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL) berichtet.

Die zweite „positive“ Probe (# 1915423) enthielt den **B. anthracis-Stamm Pasteur**: dieser ist zwar positiv für das Virulenzplasmid **pX02** und die **B. anthracis-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker rpoB und dhp61**, jedoch (im Gegensatz zum Stamm UR-1) **negativ für das „lethal- und edema-factor, sowie protective antigen-(pagA)-tragende Virulenzplasmid pX01**. 24 der 28 Teilnehmer berichteten für diese Probe korrekt positive Befunde. Die vier Teilnehmer mit falsch-negativem bzw. fraglichem Ergebnis sollten den Ringversuch zum Anlass nehmen, die Performance der verwendeten Testsysteme sowie die laborinternen Prozessabläufe zu evaluieren.

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

## RV 543: Francisella tularensis & Brucella spp.

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben (Tabelle 1, Anhang 1, S. 18) enthielt zwei Proben mit ähnlichen Mengen an *F. tularensis* subsp. *holarctica*-DNA ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL in Probe # 1915431 und # 1915432), zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Brucella melitensis*-DNA ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL in Probe # 1915434 und  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL in Probe # 1915432), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1915433), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Master diagnostica Tick-borne bacterial flow chip (1x), AmpliSens *Brucella*-FRT (1x) und Biotecon Diagnostics foodproof *Brucella* Detection Kit (1x).

**Francisella tularensis:** Kurz und knapp: alle 33 Teilnehmer haben sowohl die beiden positiven Proben (# 1915431 und # 1915432) als auch die beiden negativen Proben (# 1915433 und # 1915434) korrekt klassifiziert. Inhibitionskontrollen wurden durchwegs mitgeführt, jedoch keine inhibitorischen Ereignisse berichtet.

**Brucella spp:** Hier das gleiche Bild wie bei *Francisella tularensis*: Alle ausgesandten Proben wurden von allen

30 Teilnehmern korrekt als positiv (# 1915432 und # 1915434) oder negativ (# 1915431 und # 1915433) berichtet. Mit einer Ausnahme wurden Inhibitionskontrollen mitgeführt, Inhibitionsereignisse wurden jedoch nicht beobachtet.

## RV 544: Carbapenemase-Gene

Der seit 2015 in das reguläre Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommene Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Carbapenemase-Gene“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zur molekularen Resistenztestung bzw. dem Direktnachweis von charakteristischen Carbapenemase-Genen aus DNA-Präparationen von Reinkulturen an Enterobacteriaceae** konzipiert. Zum orientierenden Herantasten an die technische Eignung und die „Praktikabilität“ der versandten Probenmaterialien werden wir uns in den ersten Runden dieses methodisch anspruchsvollen Ringversuchs zur molekularen Resistenztestung auf die Abprüfung eines kleinen Spektrums der derzeit häufigsten Carbapenemase-Gene bei *Enterobacteriaceae* beschränken: KPC, VIM, OXA-48-ähnliche Gene, GES-Carbapenemasen, NDM, IMP und GIM.

Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 20) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1915441 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit dem KPC-3-Gen (ca.  $1 \times 10^6$  Genomkopien/mL), Probe # 1915442 enthielt *Citrobacter freundii*-Zielorganismen mit dem GIM-1-Gen (ca.  $1 \times 10^7$  Genomkopien/mL) und Probe # 1915444 enthielt *Serratia marcescens*-Zielorganismen mit dem VIM-1-Gen (ca.  $1 \times 10^7$  Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 1915443 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

87 der 90 Teilnehmer stellten erfreulicherweise ein Carbapenemase-Gen in der Probe # 1915441 fest. Für die Probe mit VIM-1-positiver *Serratia marcescens* (# 1915444) wurden mit einer Ausnahme korrekte Ergebnisse berichtet. Hoch lag die Richtigkeitsquote auch für die Probe # 1915443, hier berichteten 88 Teilnehmer die Probe als „Carbapenemase-negativ“. Schwächen zeigten sich bei der Detektion der GIM-1-positiven *Citrobacter freundii* in Probe # 1915442, die 72 Teilnehmern „durchrutschte“. Grund hierfür ist möglicherweise, dass das GIM-1-Gen gerade in einigen „Multiplex“-Testformaten nicht enthalten ist.

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

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Seegene Allplex Entero-DR Assay (3x), Autoimmun Diagnostika Gen

ID Carbapenemase (2x), AmpliGnost Carbapenemase PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x) und MAST Isoplex creart (1x).

## RV 545: Clostridium difficile

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Clostridium difficile“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an Clostridium difficile-DNA** aus geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert.

Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 21) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben drei positive Proben. Probe # 1915452 mit einer relativ hohen Menge an *Clostridium difficile*, ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), Probe # 1915451 mit ca. zehnfach geringerer Menge ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), Probe # 1915454 mit ca. hundertfach geringerer Menge ( $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1915453), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden „positiven“ *Clostridium difficile*-Proben # 1915451 und # 1915452 wurden erfreulicherweise von 168 bzw. 167 der 168 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ klassifiziert. Falsch-negative Ergebnisse sollten auch hier zum Anlass genommen werden, das verwendete Testsystem bzgl. analytischer Sensitivität und Spezifität zu evaluieren und auch die laborinternen Prozesse der Probenaufbereitung und -abarbeitung kritisch zu hinterfragen. Letzteres gilt insbesondere für Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen für die lediglich *E. coli*-enthaltende Probe # 1915453. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, am ehesten sind Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich. Die Probe mit dem geringsten Gehalt an *Clostridium difficile* (# 1915454,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL) konnte noch von 145 Teilnehmern als positiv klassifiziert werden. Die Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis sollten dies zum Anlass nehmen, die Sensitivität des verwendeten Testsystems zu evaluieren. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden für keine der Proben berichtet.

Wie in Tabelle 3 (Anhang 1, S. 21) angegeben, verwendete der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme. In dieser Ringversuchsrunde zeigten sich (vergleichbar mit der vorausgegangenen) zwischen den kommerziellen Testsystemen und den Eigenentwicklungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Altona diagnostic RealStar *C. difficile* PCR Kit (7x), r-Biopharm RIDAGENE CD Toxin A/B (6x), r-Biopharm RIDAGENE Hospital Stool Panel (4x), Meridian Bioscience illumigene *C. diffi-*

cile (3x), HAIN Lifescience Kits (6x), AmpliGnost *C. difficile* Toxin A und B von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (2x), Seegene Allplex GI Bacteria Assay (3x), Cobas Liat *C. diff* (2x), Abacus Diagnostica GenomEra *C. difficile* (1x), Illumipro *C. difficile* (1x) und Quidel Solana *C. difficile* Toxines (1x).

## RV 546: VRE

Der Ringversuch „Bakteriengenomnachweis PCR/NAT Vancomycin-resistente Enterokokken“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an DNA Vancomycin-resistenter Enterokokken** aus geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Wie in Tabelle 1 (Anhang 1, S. 22) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben drei Vancomycin-resistente Enterococcus-Stämme: Probe # 1915461 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen *Enterococcus faecalis* **vanA**-resistent,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), Probe # 1915462 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen *Enterococcus faecium* **vanB**-resistent,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) und Probe # 1915463 (*Enterococcus gallinarum* **vanA**- und **vanC**-resistent,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL). Im Ringversuchprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1915464), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Erfreulicherweise wurden die beiden „positiven“ Proben # 1915461 und # 1915462 mit vanA- bzw. vanB-tragenden Enterokokken mit lediglich einer Ausnahme von allen Teilnehmern als „VRE-positiv“ klassifiziert. Auch der vanA- und vanC-tragende *E. gallinarum* (# 1915463) wurde zuverlässig als VRE identifiziert. Wie bereits im vorangegangenen Ringversuch waren alle eingereichten vanA/vanB-Differenzierungen korrekt.

Aus Sicht der Krankenhaushygiene und der Auswirkungen auf das Patientenmanagement mag der Nachweis eines intrinsisch Vancomycin-resistenten *Enterococcus gallinarum* aufgrund der (zumeist) chromosomalen Kodierung des Resistenzgens unproblematisch erscheinen, und ein positiver Befund nicht immer ein klassischer „VRE im Sinne der Krankenhaushygiene“ sein. Im Falle einer Infektion mit dem Erreger kommt dem korrekten Nachweis einer Vancomycin-Resistenz natürlich eine hohe Bedeutung zu. Einige Testsysteme bieten neben dem Nachweis von vanA/B/C-Resistenzgenen auch Informationen über die zugehörige Enterokokken-Spezies und können bei bestimmten Befundkonstellationen die Interpretation erleichtern bzw. das erforderliche Hygienemanagement eines Patienten konkretisieren.

Die „negative“ Probe # 1915464 war erfreulicherweise durchwegs als „VRE-negativ“ berichtet worden. Bei den eingesetzten Testsystemen zeigt sich in den letzten Jahren ein Trend hin zu kommerziell erhältlichen, vorkonfektionierten Systemen. Unterschiede in Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu Inhouse-Assays waren jedoch

nicht zu erkennen. Insgesamt war die Ergebnislage dieser Probenaussendung sehr erfreulich.

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: GeneProof VRE PCR Kit (2x), BioGX auf BD Max (1x), Roche LightCycler VRE Detection Kit (1x), AmpliGnost Vancomycin A/B Resistenz differenz. von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), VIASURE Vancomycin Resistente Real Time PCR Detection Kit (1x) und Seegene (1x).

## RV 547: Urogenital panel

Nach intensiven Vorarbeiten zum Proben-Design, zur praktischen Umsetzung und der Aussendung von zwei sogenannten „Piloten“ wird der komplexe Ringversuch RV 547 „Urogenital-Panel“ in der aktuellen Ringversuchsrunde erstmalig im Rahmen des regulären Ringversuchsprogramms von INSTAND e.V. durchgeführt und die Ergebniskonstellation hier diskutiert. Das überaus heterogene Spektrum an eingesetzten Testsystemen erschwert natürlich nach wie vor eine strukturierte und übersichtliche Auswertung der auf den Report-Formularen mitgeteilten Ergebnisse. Daher haben wir im Vergleich zu den übrigen Ringversuchen der hier diskutierten Ringversuchsreihe „Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT“ die Tabelle 2 (Anhang 1, S. 23) etwas modifiziert. Dort ist der Übersicht halber nun die Anzahl an positiven und negativen Ergebnissen für die in den jeweiligen Proben anwesenden Pathogene aufgeführt. Mit dieser Lösung sollte man eine einigermaßen informative Darstellung über das erfasste Erregerspektrum und über die Leistungsdaten einzelner Testsysteme erhalten können.

Im Großen und Ganzen haben die 57 aktuell registrierten Teilnehmer die Erreger in den 4 Einzelproben entsprechend den methodischen Möglichkeiten ihrer Testsysteme zufriedenstellend nachweisen können. Dies spricht zum einen für die Praktikabilität unseres innovativen Multiplex-Ringversuchskonzepts und zum anderen für die zuverlässige Erfassung der Zielorganismen innerhalb der jeweils testspezifisch abgedeckten Erregerspektren der eingesetzten kommerziellen oder eigenentwickelten PCR/NAT-Verfahren. Je ein Teilnehmer konnte in den Proben # 1915471 bzw. # 1915473 keine Zielorganismen nachweisen und bei einem weiteren Teilnehmer wurde die *Ureplasma urealyticum*-„Komponente“ in der Kombination mit *Gardnerella vaginalis* (Probe # 1915471) offenbar nicht zuverlässig detektiert.

Wie bereits in der vorhergehenden Ringversuchsdiskussion erwähnt, haben wir für die aktuelle und für kommende Aussendungen des RV 547 ein einfaches Schema in Form einer 7-stelligen Zahlenkombination entwickelt, über das die einzelnen Teilnehmer das erfasste Erregerspektrum ihrer individuellen Testsysteme und Multiplex-Assays auf dem Report-Formular vorab mitteilen. Für die Erteilung von Zertifikaten macht es nachvollziehbarerweise nur Sinn, dass diejenigen Parameter bewertet und testiert werden, die von den individuellen Teilnehmern



im Rahmen ihres diagnostischen Workflows prinzipiell auch als positiv bzw. negativ erfasst werden können.

Der Ringversuchsleiter ist natürlich stets für weitere konstruktive Kommentare und Vorschläge aus dem Teilnehmerkreis dankbar. Trotz des relativ vielfältigen Spektrums an unterschiedlichen Testsystemen und -konzepten werden wir uns nach Kräften bemühen, die Teilnehmer bei den zukünftigen Ringversuchsrunden mit aussagekräftigen Zertifikaten versorgen zu können.

Unter Code [20] „Multiplex Kit“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Seegene Allplex STI Essential Assay (9x), Seegene Allplex Genital ulcer Assay (1x), Seegene Anyplex STI-7 Detection (1x) und EUROIMMUN Euroarray STI-7 (1x).

Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: fast-track Diagnostics Urethritis plus (6x), r-Biopharm RIDAGENE STI Mycoplasma panel (5x), BIORON RealLine single und multiplex Kits (3x), BioGX Mycoplasma/Ureaplasma (2x), AmpliSens *C. trachomatis*, *Ureaplasma*, *M. genitalium* und *M. hominis* (1x), AmpliGnost Kits von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x) und Sacace Biotechnologies *T. pallidum* Real-TM (1x).

## RV 560: Pneumocystis jirovecii

Der Ringversuch Nr. 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum **Direktnachweis von *Pneumocystis jirovecii*-DNA** in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Das aktuelle Set enthielt zwei positive Proben (siehe Tabelle 1, Anhang 1, S. 24): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1915602; *Pneumocystis jirovecii*, ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 1915603; *Pneumocystis jirovecii*, ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1915601 und # 1915604) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Der Nachweis des Zielorganismus aus der stärker positiven Probe (# 1915602, ca.  $1 \times 10^5$  Genomkopien/mL) gelang allen 117 Teilnehmern. Probe # 1915603 mit einer zehnfach geringeren Erregermenge wurde diesmal immerhin noch von 114 der insgesamt 117 Teilnehmer korrekt als „positiv“ identifiziert. Für die Kolleginnen und Kollegen mit falsch-negativen/fraglichen Befunden in dieser Ringversuchsrunde bleibt unser Appell unverändert bestehen, die Sensitivität der verwendeten Testsysteme zu hinterfragen, da eine Erregermenge von  $1 \times 10^4$  nicht als „äußerst gering“ einzuschätzen ist.

Bei den Proben ohne Zielorganismen (# 1915601 und # 1915604), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurde im Rahmen des aktuellen Ringversuchs erfreulicherweise von keinem Teilnehmer ein falsch-positives bzw. fragliches Ergebnis berichtet (Tabelle 2, Anhang 1, S. 24). Insgesamt betrachtet sprechen die durchwegs

richtig-negativen Ergebnisse für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen im Teilnehmerkreis. Alle eingesetzten Testsysteme beinhalten offenbar auch Inhibitionskontrollen, und eine nennenswerte Inhibition wurde von keinem der Teilnehmer berichtet. Bei den verwendeten Testsystemen wurden von ca. einem Drittel Inhouse-Assays eingesetzt und bei zwei Drittel der teilnehmenden Laboratorien kamen kommerzielle Testsysteme zum Einsatz. Unterschiede in Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit waren nicht zu erkennen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Altona diagnostics RealStar *P. jirovecii* PCR Kit (8x), fast-track Diagnostics *P. jirovecii* PCR Kit (5x), Biologix Atypical Pneumonia-1 Assay (3x), BioGX *P. jirovecii* (1x) und Amplex eazyplex *P. jirovecii* (1x).

## Anhänge

Verfügbar unter

<https://www.egms.de/de/journals/lab/2020-11/lab000036.shtml>

1. Anhang1\_lab000036.pdf (685 KB)  
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ Juni 2019

## Literatur

1. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Straube E. Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT: Eine neue Ringversuchsserie 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; 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

**Korrespondenzadresse:**

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

**Bitte zitieren als**

Reischl U, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttler H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Juni 2019 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab. 2020;11:Doc01.  
DOI: 10.3205/lab000036, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000361

**Artikel online frei zugänglich unter**

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2020-11/lab000036.shtml>

**Veröffentlicht:** 16.03.2020

**Copyright**

©2020 Reischl et al. Dieser Artikel ist ein Open-Access-Artikel und steht unter den Lizenzbedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 License (Namensnennung). Lizenz-Angaben siehe <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

# Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: comprehensive discussion of the June 2019 distribution for external quality assessment of nucleic acid-based protocols in diagnostic medical microbiology by INSTAND e.V.

## Abstract

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

A highly desired scheme for external quality assessment schemes (EQAS) of molecular diagnostic methods in the field of medical microbiology was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. This segment of the INSTAND e.V. proficiency testing program is open for diagnostic laboratories worldwide. The concept of this EQAS scheme, which is in accordance to the German RiLiBÄK, part B3, is based on two validation rounds per year (spring and autumn) and a permanently expanding coverage of relevant bacterial or fungal pathogens.

Briefly, next to “simply negative” samples, the corresponding sets of QC specimens may contain some strong-positive samples, samples spiked with clinical variants or species closely related to the target organisms. Further information as well as the statistically documented and discussed results of the past rounds of this proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)” can be found at the INSTAND e.V. website (<https://www.instand-ev.de>). Although the preferred language of these documents is German, we aim to provide at least a brief discussion of the results and some key issues in English and keep the tables in a bilingual style.

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

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

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

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

4 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

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

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

7 Institute for Medical Microbiology, Immunology



and Parasitology (IMMIP),  
University of Bonn, Germany

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

## Brief discussion of the current results

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

## Examination results June 2019

### 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* ( $\sim 5 \times 10^5$  IFU/mL; # 1915301 and # 1915302), and two samples with different amounts of *N. gonorrhoeae* organisms ( $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL in sample # 1915303 and  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL in sample # 1915304).

As depicted in Table 2 (Attachment 1, p. 1), the reported results were almost correct for the two relatively strong *C. trachomatis*-positive samples and the two *C. trachomatis*-negative sample among the current set – only 8 false-positive and two false-negative results were observed among the 1056 results submitted by the 264 participating laboratories.

Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by one of the 264 participants for sample # 1915303, which contained a relatively high number of *N. gonorrhoeae* target organisms ( $5 \times 10^5$  CFU/mL), and by 3 participants for sample # 1915304 ( $5 \times 10^4$  CFU/mL). Fortunately, no false-positive results were reported for the GO-negative samples # 1915301 and # 1915302 of the current distribution. Since the amount of target organisms in the CT- and GO-positive samples of the current distribution could not be considered as “extremely low”, false-negative results and also false-positive results for either of the two target organisms should encourage the participant to review and

optimize their CT- and GO-specific NAT-based assays. Inhibition controls were included by 263 of the 266 participants and no inhibitory events were reported.

Tables 4 to 7 (Attachment 1, p. 2–3) were included this time to enable a detailed evaluation of the *C. trachomatis*- and GO-specific NAT components of combined GO/CT test systems. In Tables 4 and 5 (Attachment 1, p. 2), only the *C. trachomatis* (CT)-specific results, and in Tables 6 and 7 (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 three positive samples: # 1915312 and # 1915314 with  $\sim 5 \times 10^5$  IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms and sample # 1915313 with  $\sim 5 \times 10^4$  IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Sample # 1915311 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

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

For the *C. trachomatis*-negative sample # 1815313 containing only non-infectious human cells and *E. coli*, only one false-positive result was observed among the 66 participants.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the “negative” sample “1” by target organism or PCR product carry-over from the positive samples “2”, “3” and/or “4” might have occurred within the sample prep and amplification workflow of the affected laboratory. In general, the observation of false-positive and/or false-negative results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system.

However, this striking match of the current results with observations and accuracy rates 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 66 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 66 participants.

## RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1915322;  $1 \times 10^4$  CFU/mL), and three samples negative for the respective target organism: one negative sample containing *Bordetella parapertussis* (# 1915321;  $1 \times 10^5$  CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella bronchiseptica* (# 1915324 with  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), as well as one sample containing only human cells and *Escherichia coli* (# 1915323).

The availability of well-established commercial or in-house NAT assays has led to a high portion of correct results. Nearly all of the 169 participants reported correct-positive results for the sample # 1915322 (*B. pertussis*,  $1 \times 10^4$  CFU/mL). Three of the participating laboratories observed false-negative results for *B. pertussis* DNA in sample # 1915322. 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/NAT assays or test systems. False-negative or questionable results should therefore lead to re-evaluations of the assay sensitivity.

Samples # 1915324 and # 1915321 which contained  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*, respectively, were correctly tested negative by the majority of the 169 participants, but 3 (for sample # 1915324) and 2 (for sample # 1915321) of the participating laboratories observed false-positive results for *B. pertussis* DNA. Sample # 1915323 contained only *E. coli*. All but three participants correctly reported this sample as negative for *Bordetella pertussis*. The false-positivity issue is probably due to contamination events in the course of sample preparation or low analytical specificity of the used PCR/NAT test systems. For sample # 1915322, one result was classified as "questionable" by one participant. For questionable results, it should be noted that certificates are only issued when correct results are reported by the participant for the remaining 3 samples of RV 532.

For the detection of *B. pertussis* DNA, most participants used self-developed (in-house) test systems with inhibition and/or positive controls or "other" commercial tests. Therefore, 42 participating laboratories indicated the use of the IS481 insertion sequence, 7 the pertussis toxin coding gene, and 3 ribosomal genes as target. Run controls were performed by 168 of 169 participants, and no inhibition events were observed with the samples of the current distribution.

## RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained two samples with a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strain

isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study. Sample # 1915331 contained approximately  $5 \times 10^5$  CFU/mL and sample # 1915333 approximately  $5 \times 10^4$  CFU/mL of the respective target organisms. Sample # 1915334 contained culture suspensions of the related species *Helicobacter mustelae* ( $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL).

The availability of well-evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in the two *Helicobacter pylori*-positive samples (# 1915331:  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL and # 1915333:  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) led to positive predictive values of 100%.

One false positive result was observed among the 52 participants for sample # 1915332, which contained only a significant number of *E. coli* cells within our proprietary sample matrix. Of note, seven false-positive results were reported for sample # 1915334, containing  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL *Helicobacter mustelae*.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the "negative" sample "4" by target organism or PCR product carry-over from the positive sample "1" and/or "3" might have occurred within the sample prep and amplification workflow of the affected laboratories. In the current distribution, false-positive *H. pylori* results for sample # 1915334 could also be due to a lacking specificity of the applied test system. 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 45 of the 56 participants. All of the reported 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: # 1915341 (*E. coli*,  $1 \times 10^4$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>1</sub><sup>-</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>-</sup>, *eae*<sup>-</sup>, *hlyA*<sup>-</sup> and O157-positive) and # 1915344 (*E. coli*,  $1 \times 10^5$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>2c</sub><sup>-</sup> and *eae*-positive). The other two EHEC-negative samples contained an EPEC strain (sample # 1915342;  $1 \times 10^4$  CFU/mL) and an EIEC strain (sample # 1915344;  $1 \times 10^4$  CFU/mL).

All but 3 participants correctly reported negative results for sample # 1915342, containing no EHEC target organisms but only relatively high numbers of an *eae*-positive EPEC strain. The other "EHEC-negative" sample # 1915344, containing a significant amount of

EIEC isolate was also reported PCR-negative by all but one of the participants. For the EHEC/STEC-positive samples # 1915341 and # 1915343, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in consistently high accuracy rates. Sample # 1915341 was correctly reported positive by all of the 139 participants, and all but two of the 139 participants detected the target organisms in the EHEC/STEC-positive sample # 1915343 correctly. 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 126 of the 139 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 scheme (EQAS) also **other *B. burgdorferi* genotypes or genospecies will be present** in individual samples.

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

While *B. garinii* is a well-known human pathogenic species present in Europe and Asia, ***Borrelia lusitaniae*** is found in Europe – mainly western Mediterranean – in Ixodes ticks and in lizards as host. Though having been known for nearly 30 years, only two patient isolates exist so far – both from atypical skin diseases. Therefore, the human pathogenicity is not well assured. In Europe, this species is still extremely rare in ticks (detected by PCR only) and patients, but one isolate from a German patient with neuroborreliosis is available.

The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia recurrentis* (# 1915351;  $\sim 5 \times 10^5$  organisms/mL), one sample with *Borrelia garinii* OspA type 7 (sample # 1915352;  $\sim 5 \times 10^5$  organisms/mL) and one sample with *Borrelia lusitaniae* (sample # 1915354;  $\sim 5 \times 10^5$  organisms/mL). Sample # 1915353 contained no *Borrelia* organisms but a strain of *Tre-*

*ponema phagedenis*. With the exception of one false-negative result, all participants reported correct results for sample # 1915352 containing a high number of *B. garinii* target organisms. For the *Borrelia* spp.-negative sample # 1915353 (containing a high number of *Treponema phagedenis* organisms) of the current distribution, 118 correct-negative and 3 false-positive results for *B. burgdorferi* DNA were observed. About two thirds of all participants missed the detection of *B. lusitaniae* target organisms in sample # 1915354 and one third of all participants reported a false-positive PCR/NAT *B. burgdorferi* DNA result for the *B. recurrentis* organisms present in sample # 1915351 of the current distribution.

Admittedly, the current set of 4 samples contained some analytical challenges in good faith and with an educative background. But, as always, obtaining false-negative results should prompt thorough re-evaluation of the assay's specificity and/or sensitivity. 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. Looking at the species composition of the current panel, slight differences in test performance are getting apparent between commercially available kits and in-house assays for the diagnostic detection of *Borrelia burgdorferi* by PCR/NAT techniques.

## RV 536: *Legionella pneumophila*

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

The current set of QC samples contained only one positive sample with *Legionella pneumophila* serogroup 1 (# 1915361;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) next to two samples containing *Legionella gormanii* (# 1915364;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL and # 1915363;  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL). Sample # 1915362 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) sample # 1915361 was correctly tested positive by all but one of the 123 participating laboratories. Both of the *L. gormanii*-positive samples (# 1915363 and # 1915364) were correctly tested negative by 114 and 108 of the participants, respectively. Sample # 1915362, which contained only *E. coli*, was tested false-positive by 2 participants, whereas the remaining 121 participants reported correct-negative PCR/NAT results for *L. pneumophila* DNA. The overall result constellation with the sporadically observed false-positive results indicates that target DNA or amplicon contaminations may have occurred in the



analytical workflow of some participants, or that some of the applied *L. pneumophila*-specific PCR/NAT assay concepts may show analytical specificity problems. In general, the observation of false-positive or false-negative results should encourage the affected laboratories to review and optimize their DNA extraction procedures and/or their *L. pneumophila*-specific PCR/NAT test systems. All but two participants have implemented inhibition controls in their test systems and no inhibition events were observed among the samples of the current distribution.

## RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained three positive samples with *Salmonella enterica* serovar enteritidis: sample # 1915373 contained  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL, sample # 1915371 contained  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL and sample # 1915372 contained  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL. Sample # 1915374 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. All of the participants reported correct results for the negative sample # 1915374, and all but three participants reported correct-positive results for the *Salmonella enterica*-positive sample # 1915373 ( $1 \times 10^4$  CFU/mL). Due to the relatively low numbers of *Salmonella enterica* target organisms in samples # 1915371 ( $5 \times 10^3$  CFU/mL) and # 1915372 ( $1 \times 10^3$  CFU/mL) of the current distribution, about one half of the 28 participants reported false-negative results for the latter two samples. With an amount of  $5 \times 10^3$  CFU/mL or less of *S. enterica* target organisms, the lower limit of detection of appropriate test systems is obviously reached and so the results for sample # 1915372 were not considered in the course of issuing the certificates (indicated by the gray-shaded box in Table 2, Attachment 1, p. 10).

However, a negative PCR/NAT result for sample # 1915373 should prompt a thorough re-evaluation of the performance of the *S. enterica*-specific PCR/NAT test systems. Inhibitoric components in the sample matrix or other inhibition events during 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 (# 1915382; only *E. coli* cells), two samples positive for *L. monocytogenes* (# 1915381 with  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL and # 1915384 with  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) and one sample with *Listeria innocua* (# 1915383) as *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. The results discussion of the current distribution is easy: all of the 43 participating laboratories detected the *Listeria monocytogenes* target organisms in the two (relatively strong) positive samples # 1915381 and # 1915384. In addition, the “negative” *E. coli*-containing sample # 1915382 was identified as negative by all laboratories. The majority of participants used *Listeria monocytogenes*-specific PCR/NAT assays, which is reflected by the high number of “false-negative” results for

sample # 1915383. 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 (like *L. innocua* in sample # 1915383 of the present distribution) 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.

Sample # 1915392 of the current distribution contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL) and a CoNS strain (*S. haemolyticus*; *mecA*-positive,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL).

Correct-(negative) results were reported by 270 of the 293 participating laboratories. The two participants who reported “questionable” for sample # 1915392 indicated the use of assay concepts for the independent detection of the *mecA* gene and an *S. aureus* species marker gene (where “questionable” is the expected and correct classification for this mixed sample). Some of the 21 participants who reported (false-)positive MRSA PCR results listed the use of in-house or commercial assay concepts relying on the quantitative detection of the *mecA* and *S. aureus* target genes.

One sample of the current set (# 1915391) contained an oxacillin-sensible CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-negative,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL). Correct-(negative) results were reported by 291 of the 293 participating laboratories. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the “negative” sample 1 by target organisms or PCR products of the positive samples “3” and “4” is not really obvious, but cannot be ruled out. Such false-positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedures and/or the MRSA-specific NAT-based test systems.

Sample # 1915394 contained a typical cMRSA or CA-MRSA isolate (MRSA, PVL-positive, *spa*: t310;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 290 participating laboratories.

One sample of the current set (# 1915393) contained a relatively high number of an “atypical” methicillin-

resistant *S. aureus* SCC mec Type V isolate (MRSA, PVL-negative,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL). As expected, the latter organisms were not reliably detected by a number of in-house SCCmec-based assay concepts, and they were also missed by some of the current commercial tests. Such isolates are admittedly rare and hence false-negative results were not counted in the course of issuing the certificates.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported correct PCR/NAT results for MRSA. 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 81 of the 293 participating laboratories and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were correct in all but two cases. Additional information can be found in Linde et al. [2] and Witte et al. [3]. A well-evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found in Reischl et al. [4].

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

## RV 540: Chlamydia pneumoniae

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *C. pneumoniae* in typical (clinical) sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials, we intended to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory specimens. Consequently, the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components. As a result, 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 three different amounts of *C. pneumoniae* organisms in the sample matrix: sample # 1915403 contained about  $5 \times 10^5$  IFU/mL, sample # 1915401 about  $1 \times 10^5$  IFU/mL and sample # 1915404 about  $5 \times 10^3$  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 # 1915402 of the current set.

As depicted in Table 2 (Attachment 1, p. 14), all participants reported correct results for two of the positive samples # 1915401 and # 1915403. All but one of the 139 participants also reported correct positive results for the slightly weaker *C. pneumoniae*-positive sample

# 1915403. Only three of the 139 participating laboratories reported false-positive results for the *C. pneumoniae*-“negative” sample # 1915402 (*E. coli*). Again, such false-positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedures and/or the *C. pneumoniae*-specific NAT-based test systems. 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

A general note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *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 # 1915413 and a lower amount of *M. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL) was present in sample # 1915412. Sample # 1915411 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 # 1915414, 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 two laboratories, all participants correctly reported sample # 1915414 as negative. The *Mycoplasma pneumoniae*-containing samples (#1915413 and # 1915412) were correctly reported by 158 and 153 of the 158 participants, respectively. Sample # 1915411 contained *M. genitalium* ( $\sim 10^5$  genome copies/mL), and was erroneously reported positive by four laboratories. This may indicate lacking species specificity of the test systems and trigger further investigations.

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

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

The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *C. burnetii* organisms ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL in sample # 1915421 and  $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL in sample # 1915422), one sample with  $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL of *B. anthracis* (sample # 1915421) and one sample with  $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL of a *B. anthracis* Pasteur Strain (sample # 1915423). Sample # 1915424 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

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

***Coxiella burnetii*:** The relatively high amount ( $\sim 10^5$  genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1915422 was correctly reported by all participants, as well as the ten-fold lower concentration of the pathogen in sample #1915421. The two “negative” samples (#1915424 contained only *E. coli* and #1915422 contained only *B. anthracis*) were correctly reported negative by all but two participants. Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples, and a good correlation with the expected results was observed.

***Bacillus anthracis*:** The results for this newly introduced EQAS scheme are easily discussed. 27 of the 28 participants correctly reported a positive result for sample # 1915421 ( $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL). The second “positive” sample # 1915423 contained  $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL of *B. anthracis* strain “Pasteur”. This particular strain is positive for the virulence plasmid pXO2 and the *B. anthracis*-specific markers *rpoB* and *dhp61*, but does not harbor “lethal and edema factor” encoding plasmid pXO1 and is therefore also negative for the commonly used pathogenicity marker *pagA*. With one exception, all participants correctly reported negative results for the two “negative” samples # 1915424 (containing *E. coli* and human cells) and # 1915422 (containing  $\sim 10^5$  genome copies of *C. burnetii* in a suspension of human cells).

After this very successful round of external quality assessment, “standardized samples” are again available for colleagues who are interested in obtaining *B. anthracis*

DNA-positive material for assay validation purposes. Requests for backup samples should be addressed to the EQAS coordinator (U. Reischl).

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

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

The current set of QC samples (Table 1, Attachment 1, p. 18) contained two samples with similar amounts of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DNA ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL in sample # 1915431 and # 1915432), two samples with different amounts of *Brucella melitensis* DNA ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL in sample # 1915434 and  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL in sample # 1915432). Sample # 1915433 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

***Francisella tularensis*:** Similar to QC samples from past distributions, the positive samples # 1915431 ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *holarctica*) and # 1015432 (also  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL of *Francisella tularensis* spp. *holarctica*) were correctly tested positive by 33 of the 33 participating laboratories, respectively. None of the participants observed inhibition of the nucleic acid amplification reactions with the samples of the current distribution.

***Brucella* spp.:** The “positive” samples # 1915432 and # 1915434 were correctly reported by all participating laboratories. Additionally, the two samples without target organism (# 1915431 and #1915433) were correctly classified as “negative”. None of the participants observed an inhibition of the nucleic acid amplification.

## RV 544: Carbapenemase genes

The concept of this novel EQAS panel for the detection of carbapenemase genes is designed exclusively for the testing of NAT-based methods and protocols for molecular resistance testing or the direct detection of carbapenemase genes from DNA preparations of *Enterobacteriaceae* culture isolates.

Because of the methodologically challenging design of EQAs for the molecular resistance testing of the wide range of known carbapenemase coding genes in different bacteria, the panel is narrowed down to a small selection of the currently most common carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae*: KPC, VIM, OXA-48 like genes, GES carbapenemases, NDM, IMP, and GIM. As shown in Table 1 (Attachment 1, p. 20), the current set contained



three samples with different carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1915441 contained a *Klebsiella pneumoniae* with a KPC-3 gene ( $\sim 1 \times 10^6$  genome copies/mL), sample # 1915442 contained a *Citrobacter freundii* with a GIM-1 gene ( $\sim 1 \times 10^7$  genome copies/mL), sample # 1915444 contained *Serratia marcescens* with a VIM-1 gene ( $\sim 1 \times 10^7$  genome copies/mL). The fourth sample # 1915443 was designed as negative control and contained only *E. coli* without carbapenemase genes. 88 of the 90 participating laboratories reported sample # 1915441 (*K. pneumoniae* carrying a KPC-3 carbapenemase) as “carbapenemase-positive”. Notably, only 18 of the 90 participants were able to detect carbapenemase genes in sample # 1915442 (*C. freundii* carrying GIM-1). The third “positive” sample # 1915444 (containing *S. marcescens* with a VIM-1 gene) was correctly reported by 89 of the 90 participants. Additionally, 2 false-positive results were submitted for sample # 1915443, which contained carbapenemase-negative *E. coli* K12.

## RV 545: Clostridium difficile

A general note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of C. difficile DNA in typical sample material**. With the development and composition of the corresponding sample materials, we aim to mimic the situation of processing typical clinical samples. The lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained three *Clostridium difficile*-positive samples: sample # 1915452 with  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL, sample # 1915451 with  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL and sample # 1915454 with  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL. Sample # 1915453 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

The samples # 1915451 and # 1915452 containing relatively high amounts of *C. difficile* ( $1 \times 10^4$  CFU/mL and  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL) were correctly reported as “positive” by 168 and 167 of the 168 participating laboratories, respectively. The sample # 1915454 ( $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL) was correctly reported by 145 participants. False-negative results should prompt a thorough evaluation of the test system and the workflow. The latter is definitely warranted for the participants reporting false-positive results for samples # 1915453, containing only *E. coli*, but no target organism. As a cross-reaction of the applied test system with *E. coli* DNA is unlikely, probably cross-contamination during the process of sample preparation and analysis is causative. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

## RV 546: VRE

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

The current set of QC samples contained three vancomycin-resistant Enterococcus strains this time: *Enterococcus faecalis* vanA (# 1915461,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), an *Enterococcus faecium* vanB (# 1915462,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) and an *Enterococcus gallinarum* vanA- and vanC-positive strain (# 1915463,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL). Sample # 1915464 contained no target organisms but human cells and *E. coli* cells. All but one of the 59 participating laboratories reported correct results for the “positive” samples # 1915461 and # 1915462. The vanA- and vanC-positive *E. gallinarum* strain was also correctly reported as “vancomycin-resistant” by all participants. Of note, the reported dedicated vanA/vanB identifications for these two samples were all correct. We were pleased to see that also for the “negative” sample # 1915464, all participants reported correct “negative” results. This is especially important when considering the impact of molecular VRE detection on the clinical management of a patient. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

## RV 547: Urogenital panel

The concept of this novel EQAS panel for the detection of the most prominent urogenital pathogens was recently established to meet the demands of current and future multiplex PCR/NAT assay concepts. Making some helpful experiences during the pilot phase of two previous distributions, we are starting with our first “regular distribution” in the current round.

Regarding the statistical analysis, data presentation and results discussion, we are still in the learning phase to optimize the informative and intuitive depiction of the complex result constellations as well as developing a rational scheme for issuing individual certificates for the participants. The results reported by the 57 registered participants are depicted in Table 2 (Attachment 1, p. 23).

A good overall correlation between the expected results (Table 1, Attachment 1, p. 23) and the reported results was observed. The report forms of RV 547 distributions now contain an extra field for a simple 7-digit code, where participants have to specify the theoretical pathogen spectrum of their individual assay concepts. This extra information will help to consider and fairly assess the broad spectrum of different commercial and in-house PCR/NAT assays regarding species coverage, differentiation and multiplex capabilities.

## RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

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

The latest set of QC samples contained two positive specimens (Table 1, Attachment 1, p. 24). A relatively high concentration of *Pneumocystis jirovecii* ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) was present in sample # 1915602, whereas in sample # 1915603 *Pneumocystis jirovecii* ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) was present at an approximately ten-fold lower concentration. The set was completed by samples # 1915601 and # 1915604 which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

For sample # 1915602, which contained *P. jirovecii* target organisms ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) at a relatively high concentration, all of the 117 participants reported correctly positive results.

Sample # 1915603 of the current distribution, with a ten-fold lower concentration of *P. jirovecii*, was tested “positive” by all but two of the 117 participating laboratories, and one laboratory reported a “questionable” result. 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 in clinical samples with target organism loads around  $10^4$  CFU/mL should certainly trigger reassessment of the diagnostic workflow, sensitivity and/or specificity of the individual assay concept. The “negative samples” within the current distribution (# 1915601 and # 1915604, containing only *E. coli*) were correctly classified “negative” by all of our 117 participants, respectively. Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples, and a good correlation with the expected results was observed.

## Attachments

Available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2020-11/lab000036.shtml>

1. Anhang1\_lab000036.pdf (685 KB)  
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)” June 2019

## 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 Panton-Valentine Leukozidin [Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact of Panton-Valentine leukocidin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005 Oct 21;130(42):2397-401. DOI: 10.1055/s-2005-918583
3. Witte W, Bräulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24(1):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

### Corresponding author:

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

### Please cite as

Reischl U, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Baier M, Frangoulidis D, Grass G, von Buttlar H, Scholz H, Fingerle V, Sing A, Dumke R, Reiter-Owona I, Anders A. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Juni 2019 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2020;11:Doc01. DOI: 10.3205/lab000036, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000361

### This article is freely available from

<https://www.egms.de/en/journals/lab/2020-11/lab000036.shtml>

Published: 2020-03-16

### Copyright

©2020 Reischl et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License. See license information at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.