

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2015 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik

Zusammenfassung

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

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

Udo Reischl¹
Wulf Schneider¹
Martin Ehenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Wolf Splettstößer⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Martin Kaase⁸

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

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

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

4 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

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

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

Universitätsklinikum Bonn,
Deutschland

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Nach erfolgreicher Etablierung dieser neuen Ringversuchs-Serie wollen wir hier auch für Kolleginnen und Kollegen, die bisher noch nicht an diesen Ringversuchen teilgenommen haben, die Ergebnisse der aktuellen Ringversuche für den 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 burnetti**, **Bacillus anthracis**, **Francisella tularensis**, **Pneumocystis jirovecii** (vorm. **P. carinii**) und der **molekularen Resistenztestung für Carbapenemase-Gene bei Enterobacteriaceae** sowie die beiden neu ins Programm aufgenommenen Ringversuche zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von **Clostridium difficile (Toxingene)** und **VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken)** darstellen und kurz diskutieren.

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

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

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

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 16 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „Highlights“: so wurde beispielsweise im aktuellen **RV 535 Borrelia burgdorferi** eine Probe mit der Spezies **Borrelia miyamotoi** versandt, die von vielen unserer Ringversuchsteilnehmer fälschlicherweise als PCR-positiv getestet wurde. Als weiteres „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 539 MRSA/cMRSA** ein **SCCmec-Kassettyp V-positives MRSA-Isolat** ausgesandt, das erwartungsgemäß nur von ca. drei Viertel der Teilnehmer mit ihren MRSA-spezifischen PCR-Testsystemen detektiert werden konnte. Auch wenn solche SCCmec-Kassettypen derzeit zumindest in unseren Breiten noch eher selten beobachtet werden, so soll mit der Mitführung dieses Isolats bei den Teilnehmern und innerhalb der Leserschaft dieser Ringversuchsdiskussion zumindest das Bewusstsein für das mögliche Vorkommen solcher MRSA-Isolate geweckt werden.

Die Aussendung des **B. anthracis Stamm Pasteur** (positiv für das Virulenzplasmid pXO2 und die *B. anthracis*-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker *rpoB* und *dhp61*, jedoch negativ für das lethal- und edema-factor, sowie protective antigen-*(pagA)*-tragende Virulenzplasmid pXO1) in einer der 4 Proben des Ringversuchs RV 542: *Coxiella burnetii* & *B. anthracis* führte ebenfalls zu „interessanten“ Ergebniskonstellationen innerhalb der Teilnehmerschaft. Nach dem sehr erfolgreichen Verlauf der Proberingversuchsrunden im November letzten Jahres werden unsere **neuen Ringversuche** zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von:

- **Clostridium difficile Toxingenen (RV 545)**, sowie
- **Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) (RV 546)**

nun in das reguläre Ringversuchsprogramm „Bakterien-genom-Nachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. aufgenommen und zukünftig halbjährlich angeboten.

Und hier noch eine kurze Anmerkung in eigener Sache: neben dem stellvertretenden Ringversuchsleiter Herrn PD Dr. Wulf Schneider unterstützen uns bei der Konzeption und Auswertung der zahlreichen Ringversuche zum

Bakterien- und Pilzgenomnachweis PCR/NAT noch zwei weitere Kollegen aus unserem Hause: Herr Dr. Dr. Martin Ehrenschwender und Herr Dr. Andreas Hiergeist. Allerherzlichsten Dank für ihre spontane Bereitschaft sowie ihr ehrenamtliches Engagement für unsere gemeinsamen Bemühungen zur externen Qualitätssicherung molekularbiologischer Nachweisverfahren in der infektiologischen Diagnostik.

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

Untersuchungsergebnisse Mai 2015

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

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 1515302 und Probe # 1515314), *Bordetella pertussis* (Probe # 1515322), *Borrelia miyamotoi* (Probe # 1515351), *Legionella pneumophila* (Probe # 1515361), *Salmonella enterica* (Probe # 1515372), sowie *Francisella tularensis* (Probe # 1515433). Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze, u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker, für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, dass zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind, und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten „grenzwertig positiven“ Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von „durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten“ eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR-Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

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

Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der 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. Die Tabellen 1 (siehe Anhang 1) zeigen dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in den Tabellen 2 (siehe Anhang 1) nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen, und in den Tabellen 3 (siehe Anhang 1) nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt.

Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum „Gelegenheitsanwender“ abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

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

zusammengesetzten positiven Proben führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive, als auch für negative Befunde.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt jeweils eine Probe mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis* (# 1515302, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL), und zwei Proben mit einer 10-fach höheren Menge an *C. trachomatis* (# 1515301 und # 1515304, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL), eine Probe (# 1515302) mit ca. 1×10^5 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* sowie eine Probe mit 10-fach höherer Menge an *N. gonorrhoeae*-Zielorganismen (# 1515303; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL).

Der Übersichtlichkeit halber werden wir bei diesem kombinierten Ringversuch (CT/NG) die Ergebniskonstellation zukünftig in **7 getrennten Tabellen** (siehe Anhang 1, S. 1-3) darstellen. Damit wird die diagnostische Performance der jeweiligen Testsysteme beim Nachweis von CT und NG aussagekräftiger (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; siehe Anhang 1, S. 2-3).

Auch wenn die schwach positive Probe # 1515302 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis*-Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 210 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 4 falsch-negative Ergebnisse.

Bei den beiden ca. 10-fach stärker CT-positiven Proben # 1515301 und # 1515304 des aktuellen Ringversuchs wurden von den 210 Teilnehmern diesmal nur insgesamt 3-mal falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Da hier von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchweg korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den falschen Ergebnissen vermutlich um Ringversuchstypische „sporadische Ausreißer“.

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die beiden positiven Proben # 1515302 und # 1515303 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^5 bzw. 1×10^6 CFU/mL) diesmal nur von einem der insgesamt 209 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken-DNA mitgeteilt. Bei den beiden GO-negativen Proben wurden jedoch von 2 bzw. 8 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse berichtet. Dieser im Vergleich zu früheren Ringversuchsrunden doch überraschend hohe Anteil an falsch-positiven Ergebnissen deutet auf Kontaminationsergebnisse bei der Probenaufbereitung und -abarbeitung hin. Den betroffenen Laboratorien sollten diese Ergebnisse Anlass geben, ihren individuellen diagnostischen Workflow hinsichtlich der Kontaminationssicherheit während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Angesichts der mit 1×10^3 bzw. 1×10^4 IFU/mL ehrlicherweise nicht als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in den CT-positiven Proben

1515301, # 1515302 und # 1515304 sowie 1×10^5 bzw. 1×10^6 CFU/mL an Zielorganismen in den GO-positiven Proben # 1515302 und # 1515303 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern ebenfalls Anlass zur Optimierung ihrer jeweiligen spezifischen NAT-gestützten Testsysteme geben.

Da sich das hier beobachtete „Sensitivitätsproblem“ offensichtlich nicht auf bestimmte Testkonzepte eingrenzen lässt und sich sporadisch durch das ganze Portfolio der eingesetzten Testsysteme zieht, kann dem großen Rest des Teilnehmerfeldes erneut eine erfreulich gute analytische Sensitivität und Spezifität ihrer CT- und GO-spezifischen NAT-Testsysteme sowie der angewandten Prozeduren zur Probenaufarbeitung und -prozessierung attestiert werden.

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

Ich glaube, es ist auch für den Leser dieser Ringversuchsdiskussion weitgehend nachvollziehbar, dass wir als Organisatoren von Testkonzept- und Testplattform-übergreifenden Ringversuchen bei der Konfektionierung unserer Probenmaterialien leider nicht jede Besonderheit im Abarbeitungsprotokoll von kommerziellen Testsystemen berücksichtigen oder unterschiedliche Arten von Ringversuchsprobenmaterial 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 Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen, wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden, von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden sowohl die *C. trachomatis*- als auch die *Neisseria gonorrhoeae*-Zielorganismen von fast allen der 8 Teilnehmer mit RNA-basierten Gen-Probe Testsystemen erfolgreich nachgewiesen.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 209 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

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

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

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType CT (10x), HAIN Lifescience FluoroType NG (9x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (2x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (4x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (3x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (4x), Amplex Hyplex STD *Chlamydia* und *Neisseria* (2x), Urethritis basic von fast-track Diagnostics (3x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (2x), Aptima Combo 2 assay CT/GC (1x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex ELISA (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (2x), Bioron RealLine *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* (1x), AmpliSens *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* (1x), Genetrac DK-CHT *C. trachomatis* DNA Detection Kit (1x), Genetrac DK-NG *N. gonorrhoeae* DNA Detection Kit (1x), Sacace *N. gonorrhoeae* Real-TM (2x), Sacace *C. trachomatis* Real-TM (2x) und Seegene Anyplex™ II STI-7 Detection (6x).

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

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal eine Probe mit ca. 1×10^4 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1515312), eine Probe mit ca. 1×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis* (# 1515314), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1515311 und # 1515313), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 4) der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden von den insgesamt 121 Teilnehmern bei den zwei positiven und den zwei negativen Proben überwiegend korrekte Ergebnisse mitgeteilt.

Von einem Teilnehmer wurde das Ergebnis bei der positiven Probe # 1515312 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.

Bei den beiden negativen Proben # 1515311 und # 1515313, die ausschließlich nicht infizierte Humanzellen und *Escherichia coli* enthielt, sollten die falsch-positiven Ergebnisse bei den vier betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres DNA-Isolierungsprozesses bzw. des jeweiligen *Chlamydia trachomatis*-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben. Bei der anzunehmenden sequenziellen Abarbeitung der 4 Einzelproben deutet diese Ergebniskonstellation sehr überzeugend auf Kontaminationsergebnisse bei der Probenaufbereitung durch Verschleppung von positivem Probenmaterial oder Nukleinsäure aus der Probe # 1515312 hin.

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

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

Inhibitionskontrollen wurden von allen 121 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen

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

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

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine Probe mit ca. 1×10^5 CFU/ml an *B. pertussis* (# 1515321), eine Probe mit ca. 1×10^4 CFU/ml an *B. pertussis* (# 1515323), sowie eine Probe mit ca. 1×10^3 CFU/ml an *B. pertussis* (# 1515322). Die Probe # 1515324 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Wie schon im letzten Ringversuch bereitete der Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA in den Proben # 1515321 und # 1515323 den Teilnehmern keine allzu großen Schwierigkeiten. In der Probe #1515321 mit einer Erregermenge von $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL wurden keine falsch-negative Ergebnisse berichtet. Allerdings wurden für die Probe # 1515323 (Erregermenge $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) sieben falsch-negative Ergebnisse berichtet. Bei einer Menge von 10^4 CFU/mL an *B. pertussis*-Zielorganismen (entspricht ca. 10^3 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ L) liegt man deutlich über den in früheren Ringversuchsrunden beobachteten unteren Nachweisgrenzen entsprechender PCR-Testsysteme. In der mikrobiologischen Praxis sind vor allem bei Rachenabstrichen gelegentlich auch geringe Erregermengen zu erwarten – daher sollten falsch-negative Ergebnisse bei dem betroffenen Teilnehmer durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung seines jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Erfreulicherweise wurden lediglich von zwei Teilnehmern die mit *Escherichia coli* versetzte Probe #1515324 als positiv für *Bordetella pertussis* eingestuft. Hierbei handelt es sich offensichtlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung.

Von den übrigen 150 der insgesamt 152 Teilnehmer wurden ausnahmslos richtig-negative Ergebnisse mitgeteilt.

Unter den insgesamt 608 mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich zudem 26 falsch-negative Ergebnisse für die schwach positive Probe #1515322 (10^3 CFU/mL an *B. pertussis*). Bei einer Menge von 10^3 CFU/mL an *B. pertussis*-Zielorganismen (entspricht ca. 10^2 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ l) nähert man sich offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe #1515322 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 5) gekennzeichnet.

Inhibitionskontrollen wurden von 150 der insgesamt 152 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme (58 Teilnehmer) oder auf dem Ergebnisformular nicht näher spezifizierte kommerzielle Testkits mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen (43 Teilnehmer) zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit (10x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP *B. pertussis* (5x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x), ARGENE Bordetella R-gene (2x), Attomol *Bordetella* Realtime LT (2x), SIMPLEXA Bordetella Universal Direct Assay (1x), fast-track Diagnostics Bordetella (1x), Meridian Bioscience illumigene Pertussis (1x), Ingenetix Bacto Real *B. pertussis* (1x), DYNEX Real Time PCR PneumoPlex (1x), Vircell Speed-oligo *Bordetella* (1x), BIO EVOLUTION real time PCR kit *B. pertussis/parapertussis* (1x), Qiagen RespiFinder RG Panel (1x) und Seegene Seeplex PneumoBacter ACE Detection (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 6) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine positive Probe eines Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1515333; 1×10^4 CFU/ml) und eine positive Probe eines Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* (# 1315331; 1×10^5 CFU/ml). Probe # 1515334 enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Campylobacter jejuni* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml) und Probe # 1515332 ausschließlich humanes Zellmaterial zusammen mit einer nennenswerten Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise wurden beide *H. pylori*-haltigen Proben (#1515331 und # 1515333) von allen der insgesamt 45 Teilnehmer ausnahmslos als richtig-positiv bewertet. Wie bereits in den letzten Ringversuchen zeigte sich erneut die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme mit hoher analytischer Sensitivität. Im

aktuellen Ringversuch wurde zudem die analytische Spezifität der verwendeten Testsysteme durch die Probe # 1515334 überprüft, welche mit *Campylobacter jejuni* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) eine mit *Helicobacter* spp. verwandte Spezies enthielt. Auch für diese Probe wurden erfreulicherweise bei keinem der Teilnehmer falsch-positive PCR/NAT-Ergebnisse durch Kreuzreaktionen o.ä. beobachtet. Inhibitionskontrollen wurden von allen 45 Teilnehmern durchgeführt und lediglich von einem Teilnehmer wurde ein Inhibitionsereignis bei einer der 4 Einzelproben beobachtet.

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

Bis auf 25 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 3 x RIDA-GENE *Helicobacter pylori* von r-Biopharm, angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in-house*-Testsysteme.

Wie in der Testbeschreibung des RV 533 vermerkt, konnten die Teilnehmer auf freiwilliger Basis auch die vermeintliche Clarithromycin-Resistenz der untersuchten *H. pylori*-Isolate mitteilen. Diese Spezialuntersuchung zur molekularbiologischen Resistenztestung erfolgt in der Regel über die Amplifikation und Sequenzierung von charakteristischen Bereichen, innerhalb der *H. pylori* 23S rDNA bzw. der Sequenzanalyse dieses Genombereichs, mittels Hybridisierungssonden. Ergebnisse wurden hier von 39 der insgesamt 45 Teilnehmer mitgeteilt, und mit Ausnahme eines einzigen Teilnehmers waren die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch durchweg korrekt.

RV 534: EHEC/STEC

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei unterschiedliche, aber relativ stark EHEC positive Proben: mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1515343: *E. coli*, *stx*_{2c}-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv) und mit ca. 1×10^4 CFU/mL (# 1515342: *E. coli*, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv) und eine Probe mit 1×10^5 CFU/ml eines ST-positiven

EHEC-Isolats (# 1515344). Probe # 1515341 enthielt einen *E. coli*-Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ).

In diesem Ringversuch waren keine „exotischen“ Shiga-Toxin-Genen vertreten, sodass, begründet auf die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC, bei allen Proben durchwegs hohe Richtigkeitsquoten – sowohl für positive, als auch für negative Befunde – verzeichnet werden konnten. Die beiden EHEC-haltigen Proben # 1515342 bzw. # 1515343 wurden von 128 bzw. 129 Teilnehmern als richtig-positiv berichtet. Eine naheliegende Erklärung für die zwei falsch-negativen sowie ein fragliches Ergebnis bei der *stx*₁-, *stx*₂-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1515342 und das eine falsch-negative Ergebnis bei der *stx*_{2c}-, *hly*- und *eae*-positiven Probe # 1515343 gibt es aus Sicht der Ringversuchsauswertung nicht. Eventuell decken die eingesetzten Testkonzepte der entsprechenden Teilnehmer nicht das gesamte zu erwartende Spektrum an „üblichen“ *stx*-1 und *stx*-2 Genen ab. Die Probe # 1515341 (*E. coli*-Stamm, *eae*-, *hlyA*-negativ) wurde diesmal von allen der insgesamt 130 Teilnehmern korrekterweise als negativ befundet. Probe # 1515344, welche in der aktuellen Ringversuchsrunde ca. 1×10^5 CFU/ml eines ST-positiven EHEC-Isolats enthielt, wurde erfreulicherweise von nahezu allen der insgesamt 130 Teilnehmer korrekt als negativ für EHEC/STEC befundet.

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

Neben *in-house*-Testsystemen werden zunehmend vorkonfektionierte kommerzielle Assays eingesetzt. In den Richtigkeitsquoten zeigte sich keine Über- bzw. Unterlegenheit eines Systems, was für die breite Etablierung PCR-/NAT-gestützter Testsysteme spricht. Inhibitionskontrollen wurden von 128 der 130 Teilnehmer durchgeführt, Inhibitionsereignisse wurden in keinem Fall beobachtet. Zudem wurden von 112 Teilnehmern die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin-Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, großteils korrekt. Lediglich zwei Teilnehmer berichteten hier unkorrekte Ergebnisse. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: RealStar EHEC PCR Kit von Altona diagnostic (3x), TIB Molbiol EHEC Toxin Gene *stx*₁ und *stx*₂ (3x), Sacace EHEC Real-TM (1x), AmpliGnost Verotoxin 1/2 (Differenzierung) PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x) und fast-track Diagnostics (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 vier unterschiedliche Borrelien-Spezies an die Teilnehmer versandt. Das aktuelle Set an Ringversuchproben enthielt jeweils eine Probe mit ca. 1×10^5 Organismen/mL an *Borrelia bavariensis* (# 1515352), eine Probe mit ca. 1×10^5 Organismen/mL an *Borrelia garinii* Ospa Typ 8 (# 1515353), eine Probe mit ca. 1×10^4 Organismen/mL an *Borrelia kurtenbachii* (# 1515354) und eine Probe mit ca. 1×10^3 Organismen/mL an *Borrelia miyamotoi* (# 1515351).

Nochmals eine **kurze Rekapitulation**: Schon die 21 verschiedenen, dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zugehörigen Spezies können erhebliche Problem für den PCR-/NAT-gestützten Nachweis darstellen. Die im Probenet enthaltene *B. kurtenbachii* wurde erst kürzlich als neue Spezies identifiziert. Bislang wurde sie ausschließlich in den USA in Zecken und Wirten nachgewiesen, noch nie bei humanen Erkrankungen. Mit **B. miyamotoi** wird die Gesamtsituation noch weiter kompliziert: Diese erst vor Kurzem als humanpathogen beschriebene Borrelienspezies wurde bereits 1994 in *Ixodes persulcatus* Zecken aus Japan entdeckt. *B. miyamotoi* gehört zu den Rückfallfieber-Borrelien – nicht zu *B. burgdorferi* s.l. -, wird aber interessanterweise durch dieselben Schildzeckenspezies wie *B. burgdorferi* übertragen, während Rückfallfieber-Borrelien normalerweise Lederzecken oder Läuse als Vektor benutzen. Wirte für *B. miyamotoi* sind wahrscheinlich Kleinsäuger und Vögel. Erkrankungen des Menschen durch *B. miyamotoi* wurden erstmals 2011 in Russland beschrieben, im Gefolge auch in den USA, Europa und Japan. Symptome der Erkrankung umfassen insbesondere Fieber, Schüttelfrost, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie Schwindel. Bei insgesamt unspezifischer Symptomatik wird die Diagnose akut mittels gefärbtem Blutaussstrich oder PCR gestellt. Weitere diagnostische Methoden umfassen Antikörpernachweis, Anzucht und Mäuse-Inokulationsversuche. Therapiert wird mit Doxycyclin oder, in schwereren Fällen, mit Ceftriaxon oder Penicillin G. Bei insgesamt noch sehr geringen Fallzahlen dürfen die Angaben noch als vorläufig und wenig substantiiert betrachtet werden. **Allerdings ist zu betonen, dass speziell in Ixodes-Zecken B. miyamotoi in vielen Regionen Europas mittels PCR regelhaft nachweisbar sind. In Deutschland u.a. in Sachsen, im Siebengebirge, im Rheintal und in verschiedenen Regionen in Bayern.**

Nach dieser knappen Auffrischung zu den Ringversuchsergebnissen: die Detektion von *Borrelia garinii* in der Probe mit relativ hoher Erregerlast (# 1515353 mit $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL) bereitete nahezu keinem der 128 Teilnehmer Probleme.

Borrelia bavariensis in der positiven Probe # 1515352 ($\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL) wurden bei 125 (98%) der

insgesamt 128 Teilnehmer von den jeweils eingesetzten Borrelien-spezifischen PCR/NAT Testsystemen erfasst und korrekterweise als positiv befundet, lediglich 2 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis und ein Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis als „fraglich“. Probe # 1515354 mit ca. 10^4 *B. kurtenbachii*-Zielorganismen/mL wurde von 121 (94%) der Teilnehmer als richtig positiv erkannt und 7 Teilnehmer berichteten ein falsch negatives Ergebnis. Immerhin noch 88 (68%) der Teilnehmer identifizierten die Probe # 1515353 mit ca. 10^3 *B. miyamotoi*-Zielorganismen/mL als richtig negativ, während 36 Teilnehmer diese Probe mit der nur sehr selten anzutreffenden Borrelien-Spezies, die auch nicht zum *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex gehört, falsch als positiv beurteilten und 4 weitere Teilnehmer ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifizierten. **Dieses Ergebnis unterstreicht einmal mehr die Vorstellung, dass positive PCR-Ergebnisse sinnvollerweise bis auf Speziesebene identifiziert werden sollten.**

Aufgrund der genetischen Verwandtschaft zwischen *B. miyamotoi* und „echten“ Mitgliedern des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr wahrscheinlich. Laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung sind natürlich ebenfalls möglich und sollten ggf. kontrolliert und korrigiert werden.

Um die Wahrscheinlichkeit für mögliche Kontaminationsereignisse während der Prozessierung und DNA-Präparation bei der *B. miyamotoi*-positiven Probe # 1515351 möglichst gering zu halten, haben wir diese übrigens bewusst am Anfang des aktuellen 4er-Sets positioniert ...

Interne oder externe Inhibitionskontrollen wurden von allen 128 Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse der PCR-Reaktion wurden im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie bei den vorhergehenden Ringversuchsrunden haben auch diesmal wieder ungefähr knapp die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*)-Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet, kommerzielle Testsysteme wurden von 70 der 128 Teilnehmer eingesetzt.

Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen (Sensitivität zwischen 99 und 100%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*)-Testsystemen (durchschnittliche Sensitivität ca. 97%) zu beobachten. Dennoch kann angemerkt werden, dass von den sieben Teilnehmern, die ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe # 1515354 mit relativ geringer Erregerlast berichteten, fünf davon durch *in-house*-Testsysteme generiert wurden. Gegebenenfalls sollte also die Sensitivität der hauseigenen Testsysteme überprüft werden.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (5x), HAIN Lifescience FluoroType *Borrelia* (5x), BIORON RealLine Borrelien Kit (3x), Diarella *Borrelia* real time PCR kit LC von Gerbion (3x), EliGene *Borrelia* LC von Elisabeth Pharmacon (2x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (2x), Immundiagnostik MutaGEL *Borrelia* (1x), Sacace *B. burgdorferi* Real-TM (1x), Genetrac DK-BB *B. burgdorferi* DNA Detection Kit (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (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 4er-Sets können daher typischerweise auch relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila*-DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 9) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1515363 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1515362 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1515361 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an Zielorganismen (*L. pneumophila* SG2, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). Probe # 1515364 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Diese wurde erfreulicherweise von 103 der insgesamt 105 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila*-DNA befundet. Zwei Teilnehmer berichteten ein falsch-positives Ergebnis. Da diese Probe lediglich *E. coli*-Zellen enthielt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des entsprechenden Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich. Vermutlich ist das falsch-positive Ergebnis hier durch laborinterne Kontaminationsereignisse bzw. Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung bedingt.

Die relativ stark positive Probe # 1515363 mit ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* SG2 wurde von 101 Teilnehmern korrekterweise als positiv interpretiert. Die vier falsch-negativen Ergebnisse beruhen vermutlich

eher auf anwendungstechnischen Problemen als auf unzureichender analytischer Sensitivität. Die etwa 10-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila*-Zielorganismen in Probe # 1515362 (ca. 10^4 CFU/mL) konnte noch von 87 Teilnehmern korrekt als positiv identifiziert werden, zudem wurden 17 falsch-negative Ergebnisse und ein fragliches Ergebnis berichtet. Um die Grenzen der analytischen Sensitivität auszuloten, enthielt die Probe #1515361 eine sehr geringe Menge an Erregern (ca. 10^3 CFU/mL). Für diese Probe wurden nur 37 richtig-positive Ergebnisse der insg. 105 Teilnehmer berichtet. Neben 66 falsch-negativen Ergebnissen wurden 2 fragliche berichtet.

Aufgrund der geringen Erregeranzahl in Probe #1515361 wurden die berichteten Negativergebnisse nicht als „falsch-negativ“ gewertet. Allerdings sollte der aktuelle Ringversuch und insbesondere ein falsch-negatives Ergebnis in Probe #1515362 zum Anlass genommen werden, die analytische Sensitivität des verwendeten Testsystems kritisch zu hinterfragen.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 61 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila*-DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Signifikante Unterschiede bezüglich der analytischen Sensitivität zwischen kommerziellen und selbstentwickelten Testsystemen (von 45 Teilnehmern verwendet) fanden sich nicht. Inhibitionskontrollen wurden offenbar von 104 der 105 Teilnehmer durchgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden nicht berichtet.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit von (10x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x), Mikrogen Diagnostik Lpn-050 Kit (3x), fast-track Diagnostics FTD Respiratory pathogens 33 (3x), r-Biopharm RIDAGENE *Legionella* (3x), Gerbion diarella *Legionella* real time PCR Kit LC und TM (2x), Seegene Seplex PneumoBacter ACE detection (1x), Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (1x), Congen Sure Aqua *L. pneumophila* (1x) und Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x).

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1515374; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1515373; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (#1515372; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1515371), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-

gestützten Analysesystemen führte diesmal bei 3 der 4 Proben des Ringversuchssets zu tadellosen Richtigkeitsquoten von 100%. Bezüglich der analytischen Sensitivität wurde es erst bei Probe #1515372 ($\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL) „interessant“. Nur mehr 17 der 22 Teilnehmer berichteten hier ein positives Ergebnis. 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.

Da in der aktuellen Ringversuchsrunde keine falsch-positiven Befunde mitgeteilt wurden, deutet dies, im Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden, auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt, signifikante Inhibitionsereignisse wurden für keine der Proben berichtet. Kommerzielle Testsysteme kamen in 14 Fällen, selbstentwickelte Testsysteme in 9 Fällen zum Einsatz.

Signifikante Unterschiede bezüglich Sensitivität oder Spezifität waren nicht zu erkennen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: r-biopharm RIDAGENE Bacterial Stool Panel (8x), Congen Sure Food Salmonella PLUS (2x), Congen Fast Food Salmonella ONE (1x), Mikrogen Diagenode Gastroenteritis (1x), TIB Molbiol LightMix Salmonella (1x), BD Max Enteric Panel (1x), fast-track Diagnostics (1x), Diarella *Salmonella* real time PCR Kit von Gerbion (1x) und Gastroplex Bac real time PCR Kit von Gerbion (1x).

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer *Listeria*-Spezies 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 *Listeria*-Spezies in der einen oder anderen Probe zu finden sein. So wie im Fall der Probe # 1515383, die diesmal relativ hohe Mengen an *L. ivanovii* enthielt. Probe # 1515384 enthielt eine sehr hohe Menge an *L. monocytogenes* (ca. 5×10^6 CFU/mL), von allen der insgesamt 35 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1515381 enthielt mit ca. 5×10^5 CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Erfreulicherweise wurde auch die Probe #1515382, welche ausschließlich *E. coli* ent-

hielt, 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.

Wie bereits in vorangegangenen Ringversuchsrunden wurden von den Teilnehmern ganz überwiegend *Listeria monocytogenes*-spezifische Testsysteme eingesetzt. Dies spiegelte sich in der Probe # 1515383 wider, welche eine relativ hohe Menge an *L. ivanovii* (1×10^5 CFU/mL) enthielt. Kein Teilnehmer berichtete diese Probe korrekt als positiv. Im Umkehrschluss spricht diese Datenlage jedoch für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung: hält ein Teilnehmer lediglich ein **L. monocytogenes-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben, und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Von allen 35 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: AmpliGnost *L. monocytogenes* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Sacace *L. monocytogenes* Real-TM (1x), Biotech *L. monocytogenes* Real time PCR (1x), DYNEX Real Time PCR MeningoPlex (1x), Gastroplex Bac real time PCR Kit von Gerbion (1x) und Diarella *Listeria* real time PCR Kit TM von Gerbion (1x).

RV 539: MRSA

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

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

Dass aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCC*mec*-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCC*mec*-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCC*mec*-Kassette vorhandene *mecA*-Gens versandt. 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 eher seltener vorkommender MRSA-Stamm mit SCC*mec*-Kassette vom Typ V.

Wie in Tab. 1 (Anhang 1, S. 12) der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1515394 diesmal ein Gemisch aus einem *S. aureus*-Isolat (MSSA, PVL-negativ, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; *mecA*-positiv, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL), die Probe # 1515392 ein CA-MRSA-Patientenisolat (MRSA; PVL-positiv, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), Probe # 1515391 eine relativ hohe Menge eines **Methicillin-resistenten *S. aureus*-Patientenisolats SCC*mec* TypV** (MRSA; PVL-negativ; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und die Probe # 1515393 ein Methicillin-sensibles *Staphylococcus epidermidis*-Isolat ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml).

Erfreulicherweise wurden im aktuellen Ringversuch bei der positiven (CA-)MRSA Probe # 1515392 von nahezu allen der 318 Teilnehmer durchweg korrekt positive PCR/NAT-Ergebnisse mitgeteilt. Der technische oder methodische Hintergrund der 5 falsch-negativen Ergebnisse 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 1×10^4 CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1515392 den betroffenen Ringversuchsteilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben. Im Vergleich zu früheren Ringversuchen mit vergleichbarer Probenkonstellation wurde bei Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies in Probe # 1515394 diesmal eine erfreulicherweise hohe Richtigkeitsquote erzielt. Von 292 der insgesamt 318 Teilnehmer wurde dieses Gemisch mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als „MRSA-negativ“ befundet, weitere 8 Teilnehmer haben ihr Ergebnis bei dieser Probe als „fraglich“ klassifiziert. Von 5 dieser 8 Teilnehmer mit fraglichem Befund wurde explizit die Verwendung eines PCR-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruht. Da mit dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA*-Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall „fraglich“ auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis. Die restlichen Teilnehmer berichteten bei dieser Mischung aus einem MSSA-Isolat und einer Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies falsch-positive Ergebnisse für MRSA. Diesen 18 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 1415392 ist dringend anzuraten, ihre Testsysteme zu überprüfen bzw. die methodische Eignung ihres jeweiligen Testkonzepts zu hinterfragen. In der mikrobiologischen Praxis wird relativ häufig die gleichzeitige Anwesenheit einer Methicillin-resistenten (also *mecA*-positiven) Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies und eines Methicillinempfindlichen (also *mecA*-negativen) *S. aureus*-Isolats in dem entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. In diesem Fall würden die Testsysteme der letztgenannten 18 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 # 1515394 in Tab. 3 (Anhang 1, S. 12) nach Testkonzepten differenziert betrachtet, dann wird schnell ersichtlich dass alle der derzeit etablierten SCC*mec*-basierten Testsysteme bei diesem Gemisch korrekterweise MRSA-negative Befunde liefern (da das *S. aureus*-Genom der MSSA-Komponente ja *de facto* keine integrierte SCC*mec*-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 # 1515391 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 264 der insgesamt 318 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 # 1515391 auch nicht als „falsch-negativ“ bewertet.

Bei der Probe # 1515393, die ausschließlich Koagulase-negative Staphylokokken (*S. epidermidis*; *mecA*-positiv, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nur von einem der 318 Teilnehmer ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beobachtet. Hier liegt (auch angesichts der sequenziellen Folge direkt nach der MRSA-positiven Probe #1515392) das Auftreten eines sporadischen laborinternen Kontaminationsereignisses oder einer Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung 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 meines Erachtens keiner weiteren Diskussion.

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

Abgesehen von der besagten Probe mit dem 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 molekularbiologischen PVL-Testung wurden von 74 der insgesamt 318 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 unterin Linde und Lehn [2] oder Witte et al. [3]. Ein gut evaluiertes *real-time 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 *real-time PCR* Testsysteme für den zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis von PVL-Genen bei MRSA- und MSSA-Isolaten verfügbar (z.B. von r-biopharm oder von TIB Molbiol).

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience Genoquick MRSA (3x), HAIN Lifescience Genotype MRSA (3x), HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (2x), VELA diagnostics Sentosa SA Direct MRSA Test (1x), AmpliSens MRSA (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA combi (1x) und Amplex easyplex MRSA (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 14) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1515401; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml) und eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1515402; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1515403 und # 1515404), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Aus den in der Tab. 2 (siehe Anhang 1, S. 14) aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch mit einer Ausnahme alle Teilnehmer die Zielorganismen

men in der positiven Probe # 1515401 (ca. 10^5 IFU/mL) sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Auch die zehnfach geringere Menge an Zielorganismen der Probe # 1515402 konnte von 123 der 127 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Da in vorausgegangenen Ringversuchen auch noch etwa zehnfach geringere Erregerlasten (ca. 10^3 IFU/mL) sicher detektiert werden konnten, sollte ein falsch-negatives Ergebnis der *C. pneumoniae*-haltigen Proben sicherlich zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems und ggfs. auch die Prozessabläufe bei der Probenaufarbeitung zu hinterfragen.

Für die Proben ohne Zielorganismen # 1515403 und #1515404 (*Escherichia coli*) wurde erfreulicherweise nur ein einziges falsch-positives Ergebnis berichtet. Hierbei dürfte es sich am ehesten um eine sporadische laborinterne Kontamination bzw. eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung handeln. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR-Testsysteme mit DNA von *E. coli* erscheinen eher als unwahrscheinlich.

Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern durchgeführt und eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde dabei in keiner Probe beobachtet. Selbstentwickelte *in-house* NAT-Testsysteme zur Detektion von *C. pneumoniae*-DNA wurden von 44 Labors eingesetzt, kommerzielle Assays wurden von 81 Teilnehmern verwendet.

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

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 14 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 11 Teilnehmern der Diagenode MP/CP Kit und von 2 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit angegeben. Unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit (10x), GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (10x), Biomerieux Argene Chla/Myco pneumo r-gene (5x), Seegene Pneumobacter (3x), fast-track Diagnostics FTD Atypical CAP Kit (2x), Immundiagnostik MutaPLATE *C. pneumoniae* (1x), Vircell Speed-oligo *Chlamydomphila pneumoniae* (1x), AmpliSens *C. pneumoniae* (1x), r-biopharm *C. pneumoniae* (1x), fast-track Diagnostics FTD Respiratory pathogens 33 (1x), DYNEX Real Time PCR PneumoPlex (1x), Respira DNA real time PCR kit von Gerbion (1x), Genetrac DK-CP *C. pneumoniae* DNA Detection Kit (1x) und Ingenetix Bacto Real *Chlamydomphila pneumoniae* (1x).

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 15) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1515413 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^6$ Genomkopien/mL) und Probe # 1515411 mit einer etwa fünffach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL). Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzuprüfen, enthielt Probe # 1515414 (*Mycoplasma genitalium*; $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL) diesmal nennenswerte Mengen an einer zu dem Zielorganismus verwandter Mykoplasmen-Spezies. Probe # 1515412 enthielt ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Mit zwei bzw. drei Ausnahmen konnten die 139 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae*-Zielorganismen in den relativ stark positiven Proben # 1515413 und # 1515411 zuverlässig nachweisen.

Für die zweite „negative“ Probe, welche mit $\sim 10^4$ Genomkopien/mL *Mycoplasma genitalium*, einer dem Zielorganismus verwandten Bakterienspezies versetzt war, wurden von 5 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse berichtet, 134 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. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, für keine der ausgesandten Proben wurden Inhibitionsereignisse berichtet. Selbstentwickelte PCR-/NAT-Testsysteme kamen bei 51 Teilnehmern zum Einsatz, während 86 Teilnehmer kommerzielle Testsysteme verwendeten. Die Richtigkeitsquoten lagen bei *in-house* und vorkonfek-

tionierten Assays auf vergleichbarem Niveau. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (10x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit (9x), fast-track Diagnostics FTD Atypical CAP Kit (4x), r-Biopharm RIDAGENE *M. pneumoniae* (3x), Biomerieux Argene Chla/Myco pneumo r-gene (2x), Vircell Speed-oligo *Mycoplasma pneumoniae* (1x), Immunodiagnostik MutaREAL *M. pneumoniae* (1x), Seegene PneumoBacter ACE detection (1x), Ingenetix Bacto Real *Mycoplasma pneumoniae* (1x) und DYNEX Real Time PCR PneumoPlex (1x).

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

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Coxiella burnetii* ($\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1515423 und $\sim 1 \times 10^6$ Genomkopien/mL in Probe # 1515422), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* „Pasteur“ Isolats ($\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1515421), eine Probe mit DNA des *Bacillus anthracis* UR-1 Isolats ($\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1515423), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1515424), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

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

***Coxiella burnetii*:** Wie bereits im vorausgegangenen Ringversuch gestaltet sich auch in der aktuellen Runde die Ergebnislage erfreulich einfach. Sowohl die etwas stärker positive Probe # 1515422 mit ca. 10^6 Genomkopien *C. burnetii*/mL als auch die zweite positive Probe # 1515423 des Probesets (ca. 5×10^4 Genomkopien/mL) wurde von allen der insgesamt 27 Teilnehmern 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 # 1515424 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie der zweiten „negativen“ Probe # 1515421, welche ca. 1×10^5 Genomkopien/mL *Bacillus anthracis*-DNA enthielt, wurden ebenfalls durchwegs korrekt negative Ergebnisse berichtet. Mit 22 diagnosti-

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

***Bacillus anthracis*:** Die Ergebnislage des Ringversuchs „*Bacillus anthracis*-DNA“ ist ebenfalls relativ schnell dargestellt. Alle 17 Teilnehmer konnten mit ihren jeweils vor Ort etablierten *B. anthracis*-spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die beiden negativen Proben ohne entsprechende Zielorganismen # 1515422 (nur *C. burnetii* mit ca. 10^6 Genomkopien/mL und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie # 1515424 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) korrekt als negativ befunden.

Ebenfalls von allen der 17 Teilnehmer wurden korrekt positive Ergebnisse für die Probe # 1515423 (*B. anthracis*-Stamm UR-1, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL und *C. burnetii* $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL) berichtet. Die zweite „positive“ Probe (# 1515421) enthielt den ***B. anthracis*-Stamm Pasteur**: dieser ist zwar **positiv für das Virulenzplasmid pXO2 und die *B. anthracis*-spezifischen chromosomalen Sequenzmarker rpoB und dhp61**, jedoch (im Gegensatz zum Stamm UR-1) **negativ für das „lethal- und edemafactor, sowie protective antigen-(pagA)-“ tragende Virulenzplasmid pXO1**. 15 der 17 Teilnehmer berichteten für diese Probe korrekt positive Befunde. Die beiden Teilnehmer mit falsch-negativen 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*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 18) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben: Probe # 1515434 mit relativ hoher

Menge an Zielorganismen (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1515432 mit ca. zehnfach geringerer Menge (*F. tularensis* spp. *holarctica*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und Probe # 1515433 mit ca. $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL an *F. tularensis* spp. *holarctica*. Im Ringversuchspenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1515431), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Ähnlich wie bei vorausgehenden Ringversuchen haben auch hier alle der 17 Teilnehmer die relativ stark positive *F. tularensis* spp. *holarctica*-Probe # 1515434 sowie mit einer Ausnahme die etwa 10-fach geringer konzentrierte Probe # 1515432 mit ihren NAT-gestützten Testsystemen korrekt identifizieren. Die Probe mit der geringsten Erregermenge ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) konnte noch von 15 der 17 Teilnehmer korrekt als positiv befundet werden. Die zwei falsch-negativen Bewertungen sollten Anlass geben, das verwendete Testsystem bzgl. Sensitivität zu evaluieren und ggfs. zu optimieren.

Die *F. tularensis*-negative Probe # 1515431 wurde von allen Teilnehmern erfreulicherweise durchgehend als negativ befundet. Die gesamte Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorherigen Ringversuchen und spricht erneut für ein gutes Funktionieren sowohl der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme, als auch der implementierten laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

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

RV 544: Carbapenemase-Gene

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 19) der Auswertung dargestellt, enthielt das aktuelle Set drei Proben mit Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae*: Probe # 1515441 enthielt *Klebsiella pneumoniae*-Zielorganismen mit den Genen für NDM-1 und OXA-232 (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL), Probe # 1515442 enthielt *Klebsiella*

pneumoniae-Zielorganismen mit dem KPC-3 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL) und Probe # 1515444 enthielt ein *Serratia marcescens*-Isolat mit dem VIM-1 Gen (ca. 1×10^7 Genomkopien/mL). Die vierte Probe # 1515443 war als eine Art von Negativkontrolle ausgelegt – sie enthielt lediglich *E. coli* ohne Carbapenemase-Gene.

Alle Teilnehmer stellten ein Carbapenemase-Gen in den Proben # 1515441 und # 1515442 fest; aus diesem Grunde wurden alle Ergebnisse als richtig gewertet. Jedoch erkannte ein erheblicher Teil der Teilnehmer nicht, dass in Probe # 1515441 **zwei Carbapenemase-Gene** enthalten waren. Zwei Teilnehmer gaben fälschlicherweise kein positives Ergebnis für NDM an und immerhin 25 Teilnehmer (46,3%) erkannten nicht das OXA48-like Gen in der Probe: **OXA232**. Es ist bekannt, dass einige OXA48 ähnliche Carbapenemasen wie OXA181 und OXA232 in einigen kommerziellen Testsystemen nicht erkannt werden. **Da diese OXA48-Varianten jedoch aktuell vermehrt nach Europa importiert werden, sollte sich jeder Nutzer im Klaren darüber sein, ob der im Labor verwendete molekulare Test solche OXA48-Varianten detektieren kann oder nicht.** Ein Teilnehmer berichtete bei Probe # 1515442 ein falsch-positives Ergebnis für VIM zusätzlich zum korrekten Ergebnis für KPC.

In der aktuellen Ringversuchsrunde wurden erfreulicherweise von allen 54 Teilnehmern korrekte Ergebnisse für die „positiven“ Proben # 1515441 und # 1515442 berichtet. Dies ist insofern besonders erfreulich, als dass bei der letzten Ringversuchsrunde 3 Teilnehmer am Nachweis des KPC-3 Gens (diesmal enthalten in Probe # 1515442) scheiterten. Die anscheinend erfolgten Nachbesserungen haben somit offensichtlich Früchte getragen. Auch die Probe # 1515444 (*Serratia marcescens* VIM-1, $\sim 1 \times 10^7$ Genomkopien/mL) wurde von 52 der 54 Teilnehmer als „Carbapenemase-positiv“ klassifiziert. Die beiden falsch-negativen Ergebnisse sollten zum Anlass genommen werden, die Performance des verwendeten Testsystems sowie die laborinternen Prozesse der Probenaufbereitung und -abarbeitung zu überprüfen. Gleiches sollte zwingend für die 2 falsch-positiven Befundberichte zur Probe # 1515443 gelten, welche nur *E. coli* enthielt. Bedenkt man, welche Konsequenzen aus klinischer Sicht der molekulare Nachweis eines Carbapenemase-bildenden Keims haben kann, sollten maximale Anstrengungen unternommen werden, falsch-positive Befunde (beispielsweise durch Kreuzkontamination bei der Abarbeitung) zu vermeiden.

Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Direktnachweis von Carbapenemase-Genen aller Teilnehmer enthielten jeweils eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet. Selbstentwickelte in-house NAT-Testsysteme zur Detektion von Carbapenemase-Genen wurden von 14 der insgesamt 54 teilnehmenden Laboratorien eingesetzt, alle anderen Labors verwendeten kommerzielle Testkonzepte. Aufgrund der leider noch nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine

seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in-house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen.

Insgesamt waren die Richtigkeitsquoten in der aktuellen Ringversuchsrunde gut, jedoch wurde den freiwilligen Angaben zum detektierten Gen nach zu urteilen die OXA48-Variante OXA232 von etlichen Teilnehmern übersehen.

RV 545: *Clostridium difficile*

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 20) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1515451 und # 1515454 mit einer relativ hohen Menge an *Clostridium difficile*, ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1515452 und # 1515453), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die beiden *Clostridium difficile* enthaltenden Proben # 1515451 und # 1515454 wurden erfreulicherweise von 87 bzw. 85 der 88 teilnehmenden Laboratorien korrekt als „positiv“ befundet. 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 bei falsch-positiven Ergebnissen für die lediglich *E. coli*-enthaltende Probe # 1515453. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Testsysteme mit *E. coli* erscheint unwahrscheinlich, da die ebenfalls nur *E. coli*-enthaltende Probe # 1515452 von allen Teilnehmern korrekt als „negativ“ berichtet wurde. Somit sind am ehesten Kreuzkontaminationen im Prozess der Probenbearbeitung ursächlich für die falsch-positiven Ergebnisse. Inhibitionskontrollen wurden von allen Teilnehmern mitgeführt, signifikante Inhibitionsergebnisse wurden für keine der Proben berichtet. Wie in Tab. 3 (siehe Anhang 1, S. 20) angegeben, verwendeten der Großteil der Teilnehmer kommerzielle Testsysteme, während selbstentwickelte Testkonzepte in 11 Laboratorien zum Einsatz kam. In dieser ersten Ringversuchsrunde zeigten sich zwischen den kommerziellen Testsystemen und den Eigenentwicklungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität, wobei dieser erste Ringversuch zugegebenermaßen nur eine Momentaufnahme darstellt und die Ergebnisse weiterer Runden

für eine verlässlichere Beurteilung abgewartet werden sollten.

RV 546: VRE

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

Wie in Tab. 1 (siehe Anhang 1, S. 21) dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben zwei positive Proben: Probe # 1515461 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*Enterococcus faecalis* van A resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), Probe # 1515463 mit ca. gleicher Menge (*Enterococcus faecium* van B resistent, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und Probe # 1515464 mit ca. $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL an *Enterococcus faecalis*. Im Ringversuchprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1515462), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt. Erfreulicherweise wurden die beiden „positiven“ Proben # 1515461 und # 1515463 (je ca. $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) mit vanA bzw. vanB tragenden Enterokokken mit lediglich einer Ausnahme von allen Teilnehmern als „VRE-positiv“ klassifiziert. Besonders erfreulich ist, dass alle eingereichten vanA/vanB-Differenzierungen korrekt waren. Auch die beiden „negativen“ Proben # 1515462 und # 1515464 mit *E. coli* waren mit jeweils nur einer Ausnahme als „VRE-negativ“ berichtet worden. Obgleich es sich wahrscheinlich um sporadische Kontaminationsergebnisse handelt, sollten falsch-positive VRE Nachweise stets zum Anlass genommen werden, die laborinternen Prozesse der Probenaufbereitung und -abarbeitung kritisch zu evaluieren, um (Kreuz-)Kontaminationen auf ein absolutes Minimum zu reduzieren.

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

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

Dieser im Jahr 2013 neu in unser Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch RV 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ ist **ausschließlich** für

die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum **Direktnachweis von Pneumocystis jirovecii-DNA** in geeigneten klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4er-Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set zwei positive Proben (siehe Tab. 1; siehe Anhang 1, S. 22): eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1515602; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 1×10^6 Organismen/mL), eine Probe mit einer geringeren Menge (# 1515603; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 5×10^4 Organismen/mL), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1515601 und # 1515604) aber mit *E. coli* und einer Suspension aus humanen Zellen.

Auffällig im Vergleich zur vorausgegangenen Ringversuchsrunde waren zunächst die Ergebnisse der „negativen“ Proben # 1515601 und # 1515604, welche lediglich *E. coli*, nicht jedoch den Zielorganismus enthielten. Die 4 fraglichen Ergebnisse für Probe # 1515601 und weiteren 2 fraglichen Ergebnissen für Probe # 1515604 sollten Anlass geben, die laborinterne Testdurchführung und ggfs. die Performance des verwendeten Testsystems zu überprüfen. Bei den „positiven“ Proben wurde Probe # 1515602 mit $\sim 1 \times 10^6$ Organismen/mL von 84 der 85 Teilnehmer richtig klassifiziert. Deutlich schlechter war die Ergebnislage für die schwächer positive Probe # 1515603 (ca. 5×10^4 Organismen/mL). Nur 77 teilnehmende Laboratorien berichteten ein korrektes, positives Ergebnis. Neben 4 falsch-negativen wurden auch 4x „fraglich“ auf dem Ergebnisbogen protokolliert. Angesichts der mit mehr als 10^4 Organismen/mL nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten diese falsch-negative Ergebnis den betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihrer entsprechenden NAT-gestützten Testsysteme geben. Interessant war bei dieser Probenaussendung auch, dass (im Vergleich zu vorausgegangenen Ringversuchen) eine bemerkenswerte Anzahl an Inhibitionseignissen mitgeteilt wurde. Die „Häufung“ von beobachteten Inhibitionseignissen in den beiden negativen Proben # 1515601 und # 1515604 kann im Rahmen des aktuellen Ringversuchs jedoch auch durch die relativ geringe Menge an humanem Zellmaterial verursacht worden sein. Viele der Teilnehmer (inklusive das diagnostische Labor des Ringversuchsleiters) verwenden den semiquantitativen PCR-Nachweis einen human *housekeeping*-Gens als Surrogat-Indikator für die erfolgreiche Isolierung von DNA aus dem klinischen Probenmaterial und die Abwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der resultierenden Template-DNA-Präparation. Um diesen für die Teilnehmer ggf. irritierenden Effekt abzumildern werden wir uns in zukünftigen Ringversuchsrunden bemühen, auch die *Pneumocystis jirovecii*-negativen Proben mit suffizienten Mengen an humanem Zellmaterial zu versetzen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: r-Biopharm RIDAGENE *Pneumocystis jirovecii* (2x), AmpliSens *Pneumocystis jirovecii* FRT (1x) und Ingenetix MycoReal *Pneumocystis* (1x).

Danksagung

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

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

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2015-6/lab000019.shtml>

1. Anhang1_lab000019.pdf (339 KB)
Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ Mai 2015

Literatur

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

Korrespondenzadresse:

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

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2015-6/lab000019.shtml>

Veröffentlicht: 30.06.2015

Copyright

©2015 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/>.

Bitte zitieren als

Reischl U, Schneider W, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, Splettstößer W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2015 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitätssich Med Lab.* 2015;6:Doc04.
DOI: 10.3205/lab000019, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000193

Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: discussion of the Mai 2015 distribution for external quality assessment of nucleic acid-based protocols in diagnostic medical microbiology by INSTAND e.V.

Abstract

This contribution provides a report on 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.

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

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

Udo Reischl¹
Wulf Schneider¹
Martin Ehrenschwender¹
Andreas Hiergeist¹
Matthias Maaß²
Eberhard Straube³
Dimitrios Frangoulidis⁴
Gregor Grass⁴
Wolf Spletstößer⁴
Volker Fingerle⁵
Andreas Sing⁵
Enno Jacobs⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷
Martin Kaase⁸

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

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

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

4 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

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

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

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

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

Brief discussion of the current results

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

Examination results Mai 2015

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

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

The current set of QC samples contained two samples with almost identical amounts of *C. trachomatis* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL; sample # 1515301 and sample # 1515304), one sample with $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* (# 1515302) and two samples with various amounts of *N. gonorrhoeae* organisms ($\sim 10^5$ CFU/mL in sample # 1515302 and $\sim 10^6$ CFU/mL in sample # 1515303).

Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target cells in the positive sample 1515302, only 4 false-negative results were observed among the *Chlamydia trachomatis*-specific results, reported by the 209 participants. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by only 3 of the 210 participants for samples # 1515302 and # 1515303, which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of 1×10^5 CFU/mL and 1×10^6 CFU/mL respectively. Also false-positive results for the two GO-negative samples were reported by 10 participants.

Since the amount of target organisms in CT-positive samples # 1515301, # 1515302, # 1515304, and NG-positive samples # 1515302 and # 1515303 could not be considered as "extremely low", false negative results should encourage the participants to review and optimize their CT- and GO specific NAT-based assays.

Inhibition controls were included by all of the 210 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 the 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 two positive samples: # 1515314 with $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms and sample # 1515312 with $\sim 1 \times 10^4$ IFU/mL of *C. trachomatis* target organisms. Samples # 1515311 and # 1515313 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

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

For the *C. trachomatis*-negative samples # 1515311 and # 1515313 containing only non-infectious human cells and *E. coli*, 4 false-positive results were observed among the 121 participants.

Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the "negative" sample 3 by target organism or PCR products of the positive sample "2" is obvious. So false positive results should encourage the affected participants to review and optimize their DNA extraction procedure and their CT-specific NAT-based test system. For sample # 1515312, results were classified as "questionable" by one participant. For questionable results, certificates are only issued when correct results are reported by the participant for the remaining 3 samples of RV 531.

This striking match of the current results with observations and accuracy rates in the last years can be considered as an evidence for a high reliability and consistency of the applied assays and overall sample processing. Run controls were performed by all of the 121 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 121 participants.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1515321; 1×10^5 CFU/mL), one sample with an approximately tenfold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1515323; 1×10^4 CFU/mL), one sample with an approximately hundredfold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1515322 with $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1515324).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. All of the 152 participants reported correct positive results for the sample # 1515321 (*B. pertussis*, 1×10^5 CFU/mL). Sample # # 1515323, which contained $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *Bordetella pertussis*, was correctly tested by 145 of the 152 participants, but 7 of the participating laboratories observed negative results for *B. pertussis* DNA. The amount of 10^4 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms is significantly above the previously observed lower limit of detection for the corresponding PCR assays or test systems. False-negative or questionable results should therefore lead to re-evaluations of the assay sensitivity. Sample # 1515324 contained only *E. coli*. All but two 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 specificity of the used PCR/NAT test system. For sample # 1515322 (10^3 CFU/mL of *B. pertussis*) 26 false-negative results were observed. With an amount of 10^3 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms we obviously touched the lower limit of detection of appropriate test systems. Given the relatively small amount of target organisms in the sample # 1515322 reported results were not included in the assessment for the certificates. This is also characterized by the two gray shaded boxes in Tab. 2 (Attachment 1, p. 5).

For the detection of *B. pertussis*, most participants used self-developed (in-house) test systems with inhibition and/or positive controls. Therefore, 53 participating laboratories used IS481 insertion sequence, 9 the pertussis toxin coding gene and 2 ribosomal genes. Run controls were performed by 150 of 152 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 relatively high amount of target organisms. Sample # 1515331 contained approximately 1×10^5 CFU/ml of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain, and sample # 1515333 contained approximately 1×10^4 CFU/ml of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*.

The availability of well evaluated NAT-based assays and the relatively high amount of target organisms in the two *Helicobacter pylori*-positive samples (#1515331: $\sim 1 \times 10^5$

CFU/mL and # 1515333: $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) led to positive predictive values of 100%. Also for the *Helicobacter pylori*-negative sample #1515332 correctly negative PCR/NAT-results were reported by all the participating laboratories.

Sample # 1515334 of the current distribution contained a culture suspension of *Campylobacter jejuni* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), which was correctly reported "negative" by all of the 45 participants. This indicates an overall good analytical specificity of the used PCR test systems.

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 39 of the 45 participants. With one exception, the results were correct.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed previously, the challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenic factors (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1515342 (*E. coli*, 1×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive) and # 1515343 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-negative, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive). The other two EHEC-negative samples contained an ETEC strain (sample # 1515344; 1×10^5 CFU/mL) and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1515341).

All participants correctly reported negative results for sample # 1515341, containing only *E. coli* K12. The second EHEC/STEC-"negative" sample (#1515344), containing a significant amount of an ST-positive ETEC isolate was also reported PCR-negative by all but one participant. For the EHEC/STEC-positive samples # 1515342 and 1515343, the availability of well-established NAT-based assays and strategies for molecular differentiation resulted in consistently high accuracy rates. Sample # 1515342 was correctly reported positive by 128 of the 130 participants and 129 of the 130 participants detected the target organism in the EHEC/STEC-positive sample # 1515343 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 112 of the 130 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 21 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, *B. kurtenbachii*, an only recently delineated *B. burgdorferi* s.l. species which so far was only described from ticks and hosts in the USA was included in the actual panel. For specificity testing, *B. miyamotoi* was included. This species was first described in 1994 from Japan, belongs to the relapsing fever group spirochetes but is transmitted by the same hard ticks as *B. burgdorferi* s.l.. *B. miyamotoi* meanwhile was detected from Ixodes ticks from the USA, Asia and Europe. In 2011 first human cases were described from Russia, later on from the USA, Japan and Europe. Symptoms comprise fever, chills, headache, muscleache, arthralgias and nausea. Diagnosis relies on stained blood smears and PCR. For therapy doxycyclin is recommended, in more severe cases ceftriaxone or penicillin G.

The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia bavariensis* (# 1515352; $\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL), one sample with *Borrelia garinii* OspA type 8 (sample # 1515353; $\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL), one sample with *Borrelia kurtenbachii* (sample # 1515354; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL) and one sample with a very low amount of *Borrelia miyamotoi* (sample # 1515351; $\sim 1 \times 10^3$ organisms/mL).

With the exception of seven false-negative results for sample # 1515354 (containing the lowest amount of *Borrelia* target organisms), one false-negative result for sample # 1515353 (1×10^5 organisms/mL) and two false-negative and one questionable results for sample # 1515352 (1×10^5 organisms/mL) all participants reported correct results for the three positive samples. The false-negative results should prompt re-evaluation of the assay sensitivity.

The *B. burgdorferi* sensu lato complex “negative” sample # 1515351 containing $\sim 1 \times 10^3$ organisms/mL of *Borrelia miyamotoi* was classified false-positive by 36 and “questionable” by four laboratories. Potentially, this is either due to cross-reactivity with this genetically very closely related spirochete or due to a contamination during sample preparation or analysis.

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

RV 536: *Legionella pneumophila*

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

In order to assess the analytical sensitivity of certain *Legionella pneumophila*-specific PCR assays, the current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Legionella pneumophila* serogroup 2: sample # 1515363 (1×10^5 CFU/ml), sample # 1515362 (1×10^4 CFU/ml) and sample # 1515361 (1×10^3 CFU/ml). Sample # 1515364 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ($\sim 1 \times 10^5$ and $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) samples # 1515363 and #1515362 were correctly tested positive by 101 and 87 of the 105 participating laboratories, respectively. Sample # 1515364, which contained only *E. coli*, was classified as false-positive by 2 laboratories. As cross reaction is unlikely, accidental contamination during the process of sample preparation and analysis is most likely to be causative. Therefore, the workflow during the process should be re-checked. All but one participant included inhibition controls in their test systems. No significant inhibitions of the PCR-/NAT reactions were reported.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Salmonella enterica* serovar Typhi: sample # 1515374 contained $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL, sample # 1515373 contained $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL and sample # 1515372 contained $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL. Sample # 1515371 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. All participants reported correct results for samples #1515371, #1515373 and #1515374. Sample #1515372, containing $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL *Salmonella enterica* serovar Typhi was correctly identified as “positive” by 17 of the 22 participants. Reporting a false-negative result for this sample should prompt a thorough re-evaluation of the performance of

the test system. Inhibitory events in the PCR-/NAT reaction were not detected by any of the participants.

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1515382; only *E. coli* cells), two samples positive for *L. monocytogenes* (# 1515384 with $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL and # 1515381 with $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) and one sample with *Listeria ivanovii* (# 1515383) as *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. The *Listeria monocytogenes* containing samples (# 1515381 and # 1515384) were correctly reported positive by all participants. In addition, the "negative" *E. coli* containing sample # 1515382 was also identified as negative by all laboratories. Most of the participants used *Listeria monocytogenes*-specific assays, which is reflected by the high number of "false-negative" results for sample # 1515383, containing 1×10^5 CFU/mL *L. ivanovii*. However, as noted in the report form, participants using *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT assays may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. In this case, (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species do not negatively affect issuing the corresponding QC certificates. In sum, the current results indicate a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA DNA in typical clinical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs, so the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a background of human cells and other components. It is therefore important to note that NAT assays designed mainly for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set.

Sample # 1515394 of the current distribution contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL) and a CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-positive, $\sim 5 \times 10^3$ CFU/mL).

Correct (negative) results were reported by 292 of the 318 participating laboratories. Most of the 8 participants who reported "questionable" for sample # 1515393 indicated the use of assay concepts for the independent detection of the *mecA* gene and a *S. aureus* species marker gene (where "questionable" is the expected and correct classification for this mixed sample). Some of the 18 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 (# 1515393) contained an oxacillin-sensible CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-negative, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). Correct (negative) results were reported by 317 of the 318 participating laboratories. Assuming a sequential processing of the 4 individual samples of the current set, a contamination event of the "negative" sample 3 by target organisms or PCR products of the positive sample "2" is obvious. The false positive result should encourage the affected participant to review and optimize his DNA extraction procedure and/or the MRSA specific NAT-based test system.

Sample # 1515392 contained a typical cMRSA or CA-MRSA isolate (MRSA, PVL-positive, spa:t 310; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) which tested positive with the MRSA-specific assays in 313 participating laboratories.

One sample of the current set (# 1515391) contained a relatively high number of an "atypical" **methicillin-resistant *S. aureus* SCC *mec TypV*** 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 SCC*mec*-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 78 of the 318 participating laboratories and within the current distribution, the results for the molecular PVL testing were correct in all but one case. Additional information can be found at Linde and Lehn [2] or Witte et al. [3] A well evaluated protocol for the detection of PVL-positive PVL isolate can be found at Reischl et al. [4].

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

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

will fail due to the low number of *C. pneumoniae* infected cells in individual samples of the QC set.

The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1515401 was spiked with $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml of *C. pneumoniae*, whereas sample # 1515402 contained an approximately ten fold lower amount of *C. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml). Only *E. coli* and human cells were present in sample # 1515403 and sample # 1515404.

As depicted in Tab. 2 (Attachment 1, p. 13), with one exception all participants reported correct results for the positive sample # 1515401. 123 of the 127 participants also reported correct positive results for sample # 1515402. For the samples #1515403 and # 1515404, both containing only *E. coli*, only one participant reported a false-positive result. Overall, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the 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* ($\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1515413 and an approximately fivefold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL) was present in sample # 1515411. Sample # 1515414 was designed to monitor assay specificity: it contained a considerable amount of *M. genitalium* ($\sim 10^4$ genome copies/mL) as a related species to the target organism. The set was completed by sample # 1515412, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Similar to the result constellations observed with past distributions of our external quality assessment schemes for *Mycoplasma pneumoniae* PCR/NAT detection, the availability of well-established commercial or in-house PCR/NAT-assays has led to a high percentage of correct results. With the exception of one laboratory, all 139 participants correctly reported sample # 1515412 as negative. The *Mycoplasma pneumoniae* containing samples (#1515411, $\sim 10^6$ genome copies/mL and

1415413, $\sim 5 \times 10^5$ genome copies/mL) were correctly reported by 136 and 137 of the 139 participants, respectively. Sample # 1515414 contained *M. genitalium* ($\sim 10^4$ genome copies/mL), and was erroneously reported positive by five laboratories. This may indicate lacking species-specificity of the test systems and trigger further investigations.

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

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

The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *Coxiella burnetii* organisms ($\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL in sample # 1515423 and $\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL in sample # 1515422), one sample with $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL of *Bacillus anthracis* (sample # 1515423) and one sample with $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL of a *Bacillus anthracis* Pasteur Strain (sample # 1515421). Sample # 1515424 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

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

***Coxiella burnetii*:** The relatively high amount ($\sim 10^6$ genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms in sample # 1515422 was correctly reported by all participants, as well as the twenty-fold lower concentration of the pathogen in sample #1515423. The two “negative” samples (#1515424 contained only *E. coli* and #1515421 contained only *B. anthracis*) were correctly reported negative by all 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. All 17 participants correctly reported a positive result for sample # 1515423 ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL). The second “positive” sample # 1515421 contained $\sim 1 \times 10^5$ 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 patho-

genicity marker *pagA*. In addition, all participants correctly reported negative results for the two “negative” samples # 1515424 (containing *E. coli* and human cells) and # 1515422 (containing $\sim 10^6$ genome copies of *C. burnetii* in a suspension of human cells).

After this very successful round of external quality assessment, “standardized samples” are now available for colleagues who are interested in obtaining *B. anthracis* DNA positive material for assay validation purposes. Requests for backup samples should be addressed to the EQAS coordinator (U. Reischl).

RV 543: *Francisella tularensis*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *F. tularensis* DNA in typical sample material**. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis holarctica* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1515434, an approximately tenfold lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1515432, and an approximately hundred fold lower amount (1×10^3 CFU/mL) was present in sample # 1515433.

Similar to QC samples from past distributions, the positive sample # 1515434 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL of *Francisella tularensis holarctica*) was correctly tested positive by all of the 17 participating laboratories. Even with pathogen amounts of $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL and $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL (samples #1515432 and #1515433), 16 and 15 out of 17 labs were able to detect *Francisella* DNA, respectively. As no false-positive result was observed for the “negative” sample # 1515431, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions measures to prevent deleterious contamination events. Overall, these results corroborate the lower limits of detection observed in our previous EQAS distributions. Although the number of participating laboratories is still not very high, the results of the present distribution indicate that the lower limit of detection is about or slightly below 10^4 organisms/mL when using currently employed and well evaluated PCR/NAT-based assay concepts for the detection of *F. tularensis* DNA.

RV 544: Carbapenemase genes

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

ally 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 Tab. 1 (Attachment 1, p. 19), the current set contained three samples with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: sample # 1515441 contained *Klebsiella pneumoniae* with NDM-1 and OXA-232 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL), sample # 1515442 contained an *Klebsiella pneumoniae* isolate with a KPC-3 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL) and sample # 1515444 contained a *Serratia marcescens* strain harbouring a VIM-1 gene ($\sim 1 \times 10^7$ genome copies/mL). The fourth sample # 1515443 was designed as negative control – it contained only *E. coli* without carbapenemase genes.

All participants detected a carbapenemase gene in the NDM-1 and OXA-232 positive *K. pneumoniae* sample (# 1515441) as well as the KPC-3 positive *K. pneumoniae* sample (# 1515442) and thus all results were evaluated as correct. However, a considerable proportion of participants did not detect the presence of two carbapenemase genes in the sample # 1515441. Two participants reported false-negative results for *bla*_{NDM} and as much as 25 participants (46.3%) did not detect the OXA48 like gene (OXA232). **It is known that some OXA48 like genes such as OXA181 and OXA232 are missed in certain commercial test systems.** As these OXA48 variants are increasingly imported into Europe **any user should be fully aware if the molecular tests used in their laboratory is able to detect such OXA48 variants.** One participant reported a false-positive result for VIM in addition to the correct KPC result in the KPC3 positive *K. pneumoniae* sample (# 1515442).

For sample # 1515444, containing a carbapenem-resistant *S. marcescens*, two false-negative results were reported. This definitively demands intensive trouble-shooting. It might be possible that the DNA yield after preparation from lyophilised EQA-samples is lower than from bacterial colonies. Additionally, two false-positive results were observed in the sample without target organisms (# 1515443), containing only human cell material and *E. coli*. In this case, the workflow in the laboratory should be re-assessed and effective mechanisms to prevent cross-contamination during sample preparation and analysis should be implemented. In-house NAT assays were used for the detection of carbapenemase coding genes by 14 of the 54 participating laboratories, while all others quoted the use of commercial test systems or kits on the result form. As these commercial test system were not specified by all of the participants, a detailed comparisons between commercial kits and the heterogeneous group of proprietary (in-house) test systems with respect to sensitivity, specificity or susceptibility to contamination events is not yet possible. Overall, a very good diagnostic performance for KPC and NDM was observed.

However, the OXA48 variant OXA232 was missed by a high proportion of participants.

RV 545: *Clostridium difficile*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *C. difficile* DNA in typical sample material**. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained two samples with similar amounts ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) of *Clostridium difficile* organisms (sample # 1515451 and in sample # 1515454). Samples # 1515452 and # 1515453 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

The *C. difficile* containing samples # 1515451 and # 1515454 were correctly reported as "positive" by 87 and 85 of the 88 participating laboratories, respectively. False-negative results should prompt a thorough evaluation of the test system and the workflow. The latter is definitely warranted for the two participants reporting false-positive results for sample # 1515453, containing only *E. coli*, but no target organism. Cross-reaction of the applied test system with *E. coli* DNA is unlikely, as the second "negative" sample # 1515452, which also contained *E. coli* DNA, was correctly reported "negative" by all participants. Therefore, cross-contamination during the process of sample preparation and analysis is most likely to be causative. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 546: VRE

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

Sample # 1515461 of the current set contained a relatively high amount of *Enterococcus faecalis* vanA ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1515463 contained a similar amount of *Enterococcus faecium* vanB ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Sample # 1515464 contained *Enterococcus faecalis* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and sample # 1515462 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. Of the 30 participating laboratories, 30 and 29 correctly

reported positive results for the samples # 1515461 and 1515463, respectively. Of note, 29 participants reported dedicated vanA/vanB identification for these two samples, which were all correct. We were pleased to see that also for the "negative" samples #1515462 and # 1515464, all but one participant reported correct results. A false-positive result in the analysis of these samples should once again prompt evaluation of the test system and/or the workflow in the laboratory. This is especially important when considering the impact of molecular VRE detection on the clinical management of patient. All participants included controls to detect inhibitions of the PCR reaction. Significant inhibitory events were not reported.

RV 560: *Pneumocystis jirovecii*

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

The latest set of QC samples contained two positive specimens (Tab. 1; see Attachment 1, p. 22). A relatively high amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) was present in sample # 1515602 and an approximately tenfold lower amount of *Pneumocystis jirovecii* ($\sim 5 \times 10^4$ organisms/mL) was present in sample # 1515603. The set was completed by sample # 1515601 and sample # 1515604, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

Sample # 1515602, which contained the highest amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) and sample # 1515604 with a twenty-fold lower concentration of *P. jirovecii*, were reported "positive" by 87 and 77 of the 85 participating laboratories, respectively. Although this could be due to a loss of template DNA during pre-analytical sample preparation procedures or other reasons, observation of false-negative results should give reason to check the diagnostic workflow, consider improving the sensitivity and/or analysing the species coverage of the individual assay concept. Interestingly, four laboratories reported a questionable result for sample # 1515601, containing only *E. coli*. Additionally, two laboratories also reported questionable results for the second "negative" sample # 1515604. This should definitely prompt investigations regarding all processes involved in sample preparation and analysis and the participants with false-negative results should be encouraged to optimize their NAT assays.

The yet limited number of participants in the trials RV 542 to RV 546 and RV 560, together with an incomplete

reporting of the assays and manufacturers applied, do not allow a serious evaluation of the quality of either commercial tests or the very heterogeneous in-house PCR/NAT assays in regard to analytical sensitivity, analytical specificity, susceptibility to contamination, or simply the “overall performance”. In this regard we would like to encourage the participants to complete the protocol as good as possible.

Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2015-6/lab000019.shtml>

1. Anhang1_lab000019.pdf (339 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)” Mai 2015

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, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;24(1):1-5. DOI: 10.1007/s10096-004-1262-x
4. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Feb;26(2):131-5. DOI: 10.1007/s10096-007-0254-z

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, Schneider W, Ehrenschwender M, Hiergeist A, Maaß M, Straube E, Frangoulidis D, Grass G, Splettstößer W, Fingerle V, Sing A, Jacobs E, Reiter-Owona I, Kaase M. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2015 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2015;6:Doc04. DOI: 10.3205/lab000019, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000193

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2015-6/lab000019.shtml>

Published: 2015-06-30

Copyright

©2015 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/>.